UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA

Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial

APROVECHAMIENTO DEL ORUJO DE UVA (*Vitis vinífera L.*) PARA LA OBTENCIÓN DE ETANOL POR VÍA HIDRÓLISIS ALCALINA Y ENZIMÁTICA.

TESIS

PRESENTADO POR:

HOSIN HUMIRI HUARAYA

ASESOR:

Sc. D. RENE GERMAN SOSA VILCA

Para obtener el Título Profesional de:

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

MOQUEGUA – PERU

2020

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MOQUEGUA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

REGISTRO N° 10

ACTA DE SUSTENTACIÓN

Los miembros del jurado que suscriben, reunidos para evaluar la sustentación de tesis presentada por: HOSIN HUMIRI HUARAYA

denominada: **Aprovechamiento del orujo de uva (vitis vinífera L.) para la obtención de etanol por vía hidrólisis alcalina y enzimática**, para cumplir con uno de los requisitos para optar el título profesional de INGENIERO AGROINDUSTRIAL.

Teniendo en consideración los méritos del referido trabajo, así como los conocimientos demostrados por el sustentante, se declara la tesis como:

APROBADO

Con la nota de : TRECE

En consecuencia, de todos los actuados el Tesista queda APTO para poder recibir el título profesional de INGENIERO AGROINDUSTRIAL, de conformidad con lo establecido en el reglamento de grados y títulos de la Universidad Nacional de Moquegua.

Moquegua 31 de julio del 2020

Dr. Elías Escobedo Pacheco
PRESIDENTE DE JURADO

MSc. Olimpia Llalla Córdova
PRIMER MIEMBRO DE JURADO

Ing. Jerónimo Sarco Burgos
SEGUNDO MIEMBRO DE JURADO

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradecer a Dios por ser mi fiel compañero, mi fuerza, mi apoyo y mi sostén, por ser quien me ha iluminado todo este proceso, por brindarme la sabiduría e inteligencia para poder tener mis estudios hasta el día de hoy.

A mis padres y familia que siempre estuvieron apoyándome contantemente en lo necesario y a mi hermano Abigael que desde el cielo siempre me cuida y me da fortaleza.

A mis amigos y compañeros que de alguna manera me alentaron para seguir y haber terminado este trabajo.

A mi asesor de tesis Sc.D. Rene Sosa Vilca por guiarme en la ejecución del proyecto y por sus sabios consejos.

Al Msc. Mario Roger Cotacallapa Sucapuca por sus sabios consejos y alentarme en este trabajo.

A la Universidad Nacional de Moquegua por el apoyo con el financiamiento del proyecto de Tesis; mediante el canon minero y regalías.

DEDICATORIA

A Dios por darme la fuerza para terminar este proyecto. A mis padres, mis hermanos, familiares y amigos quienes siempre me brindaron su apoyo, comprensión y cariño.

RESUMEN

Se recolectaron muestras de orujo de uva de la empresa Vitivinícola “Agroindustrias Campano”, con el objetivo de obtener etanol a partir de orujo de uva (*Vitis vinífera L.)* mediante las vías de hidrólisis alcalina y enzimática, las muestras fueron recolectadas al azar posteriormente fueron pesados y colocados en 24 frascos de vidrio de 2 litros, el tratamiento desarrollado por el método de hidrólisis alcalina se sometió a una solución con NaOH a 0.1N con un pH de 5, 6 y Temperatura de 50°C, 60°C, el tratamiento de hidrólisis enzimática se sometió en una solución de enzima celulosa Celluclast a 1.5% con un pH de 5, 6 y Temperatura de 50°C, 60°C por 24 h en ambos tratamientos, posteriormente se realizó la fermentación en medio anaeróbico en un baño maría herméticamente cerrado con una temperatura de 30°C por un periodo de 7 días, utilizando levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae.* Los resultados obtenidos mostraron el mejor tratamiento de la hidrólisis alcalina a un pH de 5 y con una temperatura de 50°C donde se obtuvo 34.610 g/L de un total de 200 gramos de muestra realizada, mientras para la hidrólisis enzimática el etanol obtenido fue 34.653 g/L a un pH de 6 y Temperatura de 60 °C, con un rendimiento de 16.83% para la hidrólisis alcalina y 24.97% para la hidrólisis enzimática respectivamente, consecuentemente se concluye que se puede obtener etanol a partir de residuos vitivinícolas utilizando métodos de hidrolisis. Sin embargo se necesita de más estudios que permitan desarrollar diferentes métodos en el cual se pueda incrementar rendimientos de etanol.

Palabras claves: Orujo de uva, hidrólisis, alcalina, enzimática, etanol.

SUMARY

Samples of grape pomace were collected from the Vitivinícola company "Agroindustrias Campano", with the aim of obtaining ethanol from grape pomace (*Vitis vinifera L*.) by means of the alkaline and enzymatic hydrolysis routes, the samples were subsequently randomly collected They were weighed and placed in 24 2-liter glass jars, the treatment developed by the alkaline hydrolysis method was subjected to a solution with 0.1N NaOH with a pH of 5, 6 and a temperature of 50°C, 60°C, The enzymatic hydrolysis treatment was subjected to a 1.5% Celluclast cellulose enzyme solution with a pH of 5, 6 and a temperature of 50°C, 60°C for 24 h in both treatments, subsequently fermentation was carried out in anaerobic medium in a hermetically sealed water bath with a temperature of 30°C for a period of 7 days, using commercial yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The results obtained showed the best treatment of alkaline hydrolysis at a pH of 5 and at a temperature of 50°C where 34,610 g / L of a total of 200 grams of sample were obtained, while for enzymatic hydrolysis the ethanol obtained was 34,653 g / L at a pH of 6 and a temperature of 60°C, with a yield of 16.83% for alkaline hydrolysis and 24.97% for enzymatic hydrolysis, respectively, consequently, it is concluded that ethanol can be obtained from wine residues using methods hydrolysis. However, more studies are needed to develop different methods in which ethanol yields can be increased.

Keywords: Grape pomace, hydrolysis, alkaline, enzymatic, ethanol.

INDICE

I. INTRODUCCIÓN 12
1.1. DESCRIPCIÓN Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA 13
1.2. ANTECEDENTES 14
1.3. OBJETIVOS 17
1.3.1. OBJETIVO GENERAL 17
1.3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS 17
1.4. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA 17
1.5. HIPÓTESIS 18
1.5.1. HIPÓTESIS GENERAL 18
1.5.2. HIPÓTESIS ESPECÍFICA 18
II. MARCO TEÓRICO 19
2.1. BASES TEORICAS 19
2.1.1 UVA 19
2.1.2. Producción de uva en la región de Moquegua 20
2.1.3. Orujo de uva 21
2.1.4. Tratamientos para la fragmentación de polisacáridos 26
2.1.5. Hidrólisis alcalina 28
2.1.6. Hidrólisis enzimática 30
2.1.7. Etanol 35
2.1.8. Fermentación alcohólica 36
2.1.9. Destilación 40
III. MÉTODO 41
3.1. Tipo y Nivel de Investigación 41
3.2. Operacionalización de variables 41
3.3. Población y muestra 41
3.4. Lugar de investigación 41
3.5. Instrumentos 42

3.6. Equipos de laboratorio 42
3.7. Materiales de laboratorio 42
3.8. Reactivos 43
3.9. Insumos 43
3.10. Metodología experimental 43
3.10.1 Metodología a seguir para la hidrólisis alcalina 44
3.10.2 Metodología a seguir para la hidrólisis enzimática 46
3.11. Procedimientos 48
3.11.1. Determinación de pH 48
3.11.2. Determinación del grado alcohólico 48
3.11.3. Determinación del rendimiento 48
3.11.4. Determinación de azucares reductores 48
3.11.5. Determinación de alcoholes por cromatografía de gases 49
3.11.6. Determinación de extractos extraíbles 49
3.11.7. Determinación de lignina 49
3.11.8. Determinación de celulosa 49
3.12. Análisis de datos 49
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES 51
4.1. PARAMETROS FISICOQUIMICOS IDEALES PARA LA OBTENCION DE ETANOL POR HIDRÓLISIS ALCALINA 51
4.1.1. Determinación de azucares reductores 51
4.1.2 Cuantificación de etanol por hidrólisis alcalina 53
4.2. PARAMETROS FISICOQUIMICOS IDEALES PARA LA OBTENCION DE ETANOL POR HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA 54
4.2.1. Determinación de azucares reductores 54
4.2.2. Cuantificación de etanol por hidrólisis enzimática 55
4.3. RENDIMIENTO DE ETANOL 56
4.3.1. Hidrólisis alcalina 56
4.3.2. Hidrólisis enzimática 58

V. CONCLUSIONES..... 60
VI. RECOMENDACIONES 61
VII. BIBLIOGRAFIA 62
VIII. ANEXOS 70

Índice de tablas

Tabla 1. Producción de uva en la región de moquegua del 2018. 20
Tabla 2. Composición química del orujo de uva..... 22
Tabla 3. Rendimiento del azúcar en la hidrólisis enzimática de algunos tratamientos previos. 31
Tabla 4. Comparación de las condiciones de tres procesos 35
Tabla 5. Rasgos importantes para el proceso de fermentación del bioetanol..... 39
Tabla 6. Operacionalización de variables 70
Tabla 7. Diseño estadístico de la investigación (arreglo factorial 2^3)..... 50
Tabla 8. Cuantificación de azúcares reductores (g/l) antes de la hidrólisis alcalina 51
Tabla 9. Cuantificación de azúcares reductores (g/l) después de la hidrólisis alcalina 51
Tabla 10. Cuantificación de etanol (g/l) en tratamientos de hidrólisis alcalina 53
Tabla 11. Cuantificación de azúcares reductores (g/l) antes de la hidrólisis enzimática 54
Tabla 12. Cuantificación de azúcares reductores (g/l) después de la hidrólisis enzimática 54
Tabla 13. Cuantificación de etanol (g/l) en tratamientos de hidrólisis enzimática55
Tabla 14. Rendimiento de etanol en tratamientos de hidrólisis alcalina 56
Tabla 15. Rendimiento de etanol en tratamientos de hidrólisis enzimática 58
Tabla 16. Lecturas realizadas con el espectrofotómetro a 490 mn 76
Tabla 17. Cálculo de la concentración de azúcares totales en las muestras hidrolizadas. 76
Tabla 18. Lecturas realizadas de cuantificación de etanol por cromatografía para hidrólisis alcalina 81
Tabla 19. Lecturas realizadas de cuantificación de etanol por cromatografía para hidrólisis enzimática..... 82
Tabla 20. Análisis de varianza (anova) de la cuantificación de etanol..... 86

Tabla 21. Análisis de varianza (anova) de azucares reductores antes de la hidrólisis 86
Tabla 22. Análisis de varianza (anova) de azucares reductores después de la hidrólisis 86
Tabla 23. Análisis de varianza (anova) de análisis físico químico del etanol “acidez total” 87
Tabla 24. Análisis de varianza (anova) de análisis físico químico del etanol “conductividad eléctrica” 87
Tabla 25. Análisis de varianza (anova) de análisis físico químico del etanol “hierro” 88
Tabla 26. Análisis de varianza (anova) de análisis físico químico del etanol “sodio” 88

Índice de figuras

Figura 1. Estructura de la celulosa y enlace formado 23
Figura 2. Estructura química de las unidades de las hemicelulosa 24
Figura 3. Estructura de la lignina. 25
Figura 4. Estructura química de azúcares reductores 26
Figura 5. Modo de acción de las enzimas celulolíticas. 34
Figura 6. Fermentación alcohólica. 37
Figura 7. Flujograma del procedimiento de hidrólisis alcalina 44
Figura 8. Flujo grama del procedimiento de hidrólisis enzimática. 46
Figura 9. Comparación de tratamientos de la hidrólisis alcalina 52
Figura 10. Comparación de tratamientos 55
Figura 11. Comparación de datos del rendimiento de etanol obtenidos por los dos tratamientos. 59
Figura 12. Curva de calibración 75
Figura 13. Curva de calibración de etanol 80
Figura 14. Comparación con estándar 81

Índice de anexos

Anexo 1. Operacionalización de variables 70
Anexo 2. Determinación de ph 71
Anexo 3. Determinación de grado alcohólico 71
Anexo 4. Determinación de rendimiento 72
Anexo 5. Determinación de azúcares reductores 73
Anexo 6. Cuantificación de etanol (g/l) por cromatografía de gases 76
Anexo 7. Determinación de extractivos totales 82
Anexo 8. Determinación de lignina 83
Anexo 9. Determinación de celulosa 84
Anexo 10. Análisis de varianza (anova) 86
Anexo 11. Fotografias 89

ABREVIATURAS

°C: Grados Celsius
g: Gramos
kg: Kilogramos
L: Litro
ml: Mililitros
µL: Microlitro
STD: Estándar
NaOH: Hidróxido de sodio
H_2SO_4: Ácido sulfúrico
CV: Coeficiente de variabilidad
HA: Hidrólisis alcalina
HE: Hidrólisis enzimática
pH: Potencial de hidrógeno
AR: Azúcares reductores
A: Absorbancia
T: Temperatura
T1: Temperatura a 50°C
T2: Temperatura a 60°C
pH1: Potencial de hidrogeniones a 5
pH2: Potencial de hidrogeniones a 6
HA1: Hidrólisis alcalina a pH: 5 y T° 50°C
HA2: Hidrólisis alcalina a pH: 6 y T° 50°C
HA3: Hidrólisis alcalina a pH: 5 y T° 60°C
HA4: Hidrólisis alcalina a pH: 6 y T° 60°C
HE1: Hidrólisis enzimática a pH: 5 y T° 50°C
HE2: Hidrólisis enzimática a pH: 6 y T° 50°C
HE3: Hidrólisis enzimática a pH: 5 y T° 60°C
HE4: Hidrólisis enzimática a pH: 6 y T° 60°C
T. reesei: Trichoderma reesei
A. niger: Aspergillus niger
GC: Cromatografía de gases

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente el biocombustible más utilizado es el etanol, cuya fermentación es una tecnología bastante antigua, los esfuerzos en investigación han sido logros incrementales en el rendimiento de los procesos convencionales.

La industria vitivinícola es un sector de gran importancia en muchos países, en el Perú se ha incrementado la producción de vinos y piscos en los últimos años principalmente debido al mayor poder adquisitivo y crecimiento en las exportaciones, a partir de ello en este rubro se generan subproductos o residuos vitivinícolas que causan la contaminación del medio ambiente de las regiones productoras; esto, si se aprovecharan lo útil que puedan tener como insumo para otros productos alternativos, la producción de etanol representa una de esas alternativas.

El etanol se obtiene a partir de diversos materias lignocelulosicos, es un combustible de origen vegetal que se produce a partir de la fermentación de la caña de azúcar, remolacha y otros vegetales con contenido de azúcar; por otra parte se puede obtener a partir del contenido de celulosa y hemicelulosa para convertir en azúcar por medio de hidrólisis ácida, alcalina o enzimática para su posterior conversión en etanol.

El objetivo de este trabajo de investigación es el aprovechamiento de orujo de uva (*Vitis vinífera L.)* para la obtención de etanol mediante hidrólisis alcalina y enzimática, de esta manera se puede afirmar que en la actualidad los subproductos o desechos agroindustriales se han convertido en la materia prima para generar productos con valor agregado como es, la producción de alcohol.

1.1. DESCRIPCIÓN Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Los problemas de la contaminación por el uso de los derivados del petróleo origina, la búsqueda de nuevas fuentes de energía como el bioetanol (Gómez, 2016), a partir de residuos agroindustriales (Muñoz, Pantoja, & Cuatin, 2014), las pocas alternativas, desde el punto de vista económico, social y nutricional, que en la actualidad se presentan para el aprovechamiento de los residuos agroindustriales, sumado a la falta de conciencia en la protección del medio ambiente provocan que estos sean mal manejados y se conviertan en fuentes de contaminación de los recursos naturales; suelo, agua y aire (Cury et al., 2017).

Los residuos agroindustriales es generado por diversas industrias, una de ellas es la industria vitivinícola que produce una gran cantidad de residuos orgánicos actualmente poco aprovechados, uno de ellos es, el orujo de uva que es generado después del proceso de elaboración de vino y pisco y estos mismos se desechan directamente en los suelos de los mismos viñedos (Paradelo, Moldes, & Barral, 2008).

La región de Moquegua cuenta con una gran tradición vitivinícola, según la Dirección Regional Agraria de Moquegua (MINAGRI, 2017), la producción de uva es cerca de 5,976.8 Tn por año, del cual el 35% es destinado para la elaboración de vino, 41% destinado para la elaboración de pisco, 18% es la producción de uva de mesa, y el 8% destinado para el consumo familiar. Por tanto, en el proceso de elaboración del vino y piscos el principal residuo que se genera es el orujo de uva, que representa el 15% del peso de la uva (Ruales *et al.* 2017). El orujo es la materia orgánica prensada que queda como desecho o subproducto a partir de la extracción del mosto de uva que está conformada por el hollejo (piel de la uva), las semillas y dependiendo del productor, el escobajo (Zheng *et al.*, 2012). Por lo cual esto se ha reutilizado tradicionalmente en diferentes procesos como en la obtención de licores mediante destilación como un aguardiente de orujo de uva, fertilizante, alimento para animales, obtención de compuestos de interés como extraer colorantes naturales, taninos del hollejo de uva, aceites de las pepitas de uva, etc. (Bayrak, 2013).

La industria vitivinícola produce una gran cantidad de residuos orgánicos actualmente poco aprovechados y se ha realizado poca investigación en esta área. El orujo de uva generado después del proceso de elaboración de vino se desecha directamente en los suelos por tener materia orgánica, potasio, baja

salinidad que contribuye en los viñedos del valle de Moquegua (Paradelo *et al*., 2008).

1.2. ANTECEDENTES

Senderos & Regueiro, (2014) en su trabajo de investigación “Producción de Bio- etanol por fermentación en estado sólido, sobre orujo de uva y de remolacha azucarera”. Nos señalan que la producción de etanol combustible a partir de residuos agroindustriales es una alternativa válida en los últimos tiempos para poder sustituir los combustibles de origen fósil. El orujo de uva es el residuo más abundante después de la producción de vino. La fermentación en estado sólido (FES) es una de las tecnologías que hoy en día permite transformar los residuos agroindustriales en diversos bio-productos, entre ellos está el etanol donde estudia sobre la obtención de etanol a escala laboratorio mediante la fermentación en estado sólido con levadura Sacharomyces cerevisiae en orujo de uva y remolacha azucarera. Las condiciones de tratamiento fueron azúcares 16.5% (p/p) a un pH: 4.5. Los cultivos fueron inoculados con 103 células/gramo de orujo y se incubaron en ambiente anaeróbico a 28°C durante 96 horas. En los resultados se muestra que para la fermentación en estado sólido (FES), existe la mayor concentración de etanol a las 48 horas y rendimientos superiores al 80%, en base a los consumos de azucares fermentables.

Linares, (2018) en su trabajo de investigación “Producción de bioetanol a partir de subproductos de la industria vitivinícola utilizando orujo de uva blanca” Usando orujo de uva blanca para producir bioetanol, se utilizaron métodos de tratamiento térmico, químico y enzimático para degradar los polisacáridos existentes y aumentar la producción de etanol del proceso. Se utilizó orujo de uva blanca de la variedad Chardonnay, y el residuo de vino blanco proviene de Bodega Monteviejo, ubicada en Weiss, Tunuyán, Mendoza. Vista Flores; antes de procesar, se seca en horno a 40 ° C. El tratamiento de hidrólisis realizado incluye: temperatura (25 ° C, 55 ° C, 97 ° C), ácido sulfúrico (concentración entre 1M y 0.06M) y enzimas pectolíticas (0.062 a 0.5 gramos de enzima por gramo de orujo seco). Las variables evaluadas son: 1) azúcar reductor (método del ácido 3,5-dinitrosalicílico) y 2) etanol (método de densidad), el procesamiento estadístico de los datos se realiza mediante análisis de varianza utilizando el software "Statgraphics Centurion XV". La hidrólisis realizada al orujo puede producir los mejores resultados, incluida la inmersión en agua destilada a 97 °C durante 1 hora, luego agregar 0.5 g de pectinasa por gramo de orujo seco y dejarlo reposar a 45°C

durante un minuto. 20 horas. La suspensión resultante se fermentó usando levadura *Saccharomyces cerevisiae* a 28°C, y el rendimiento de etanol por tonelada de orujo seco procesado fue de 434 litros.

Espinosa, (2013) menciona en su trabajo de investigación “Obtención de etanol mediante hidrólisis alcalina, enzimática y fermentación a partir del excedente orgánico del banano variedad *Musa paradisiaca*” se realizó por hidrólisis alcalina, hidrólisis enzimática y un posterior proceso fermentativo, en la cual al residuo biomásico del banano se sometió a una hidrólisis alcalina con NaOH en diferentes concentraciones a 1,5; 2 y 2,5 mol/L y a tres temperaturas como a 50, 70 y 90°C en un determinado tiempo para provocar el acceso a la celulosa. Y así mismo para la hidrólisis enzimática se realizó usando enzimas celulosas a diferentes concentraciones: 1,5; 2 y 3% p/p a tres diferentes pH: 5; 5.5 y 6. Mientras los azucares reductores obtenidos con la hidrólisis se fermentaron usando *Sacharomyces Cerevisae* para luego poder obtener alcohol etílico. En la cual se obtuvo como resultado final que las mejores condiciones corresponde a una concentración de hidróxido de sodio de 2 mol/L y a una temperatura de 70°C, en concentración de enzimas al 2% y pH: 5 a las cuales se obtiene un rendimiento de etanol del 39.39%.

Yineth Piñeros, (2009) en su trabajo de investigación “Evaluación de la producción de etanol a partir de cascarilla de arroz pre tratada con NaCl, mediante hidrólisis y fermentación simultanea”, como objetivo fue evaluar la obtención de etanol desde la cascarilla de arroz por medio de un proceso de hidrólisis y fermentación simultánea, donde la cascarilla de arroz es pre tratada con NaCl (6.25%) por dos horas a 100 rpm y 30°C para el proceso de lignificación química y este tratamiento favorece al acceso de las enzimas a la celulosa que se adicionó una combinación de celulasas que incluía Celluclast (1.5 ml. Novo) y Viscozyme (0.1 ml. Novo) y dejaron actuar por 18 horas a 50°C y 100 rpm el material a tratarse, la fermentación se realizó con una adición de 3% de levadura por 48 horas manteniendo una temperatura de 30°C con una agitación en 100 rpm, las determinaciones de azucares reductores se analizaron por DNS (ácido dinitrosalicilico) y el porcentaje de etanol por el método de microdifusión, y teniendo en cuenta que el rendimiento teórico es de 30 g/100 g de cascarilla de arroz y en lo experimental se pudo obtener 2.87 g/100g etanol/cascarilla de arroz.

Domínguez *et al*., (2011) mencionan en el trabajo de investigación denominado “Estudio de la cinética de la hidrólisis ácida del bagazo de caña de

azúcar sin pre-tratamiento para la obtención de azúcares reductores" estudiaron a nivel de laboratorio utilizando ácido H_2SO_4 a diferentes concentraciones (2, 4, 6, 8%) en condiciones de ebullición a reflujo y presión atmosférica, evaluaron la influencia de tres variables: Tiempo de reacción (10, 20, 30, 40, 60 y 90 min.), temperatura sobre el proceso (30, 45, 60 y 75ºC) con una relación líquido: sólido de 30/1, El contenido de azúcares reductores en las muestras hidrolizadas se determinó utilizando el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) utilizando glucosa como patrón estándar. Este consiste en agregar 1,0 mL del reactivo de DNS a un volumen de 0,1 mL de muestra, calentar a ebullición durante 10 minutos. Una vez terminado el tiempo de reacción, se enfría durante 5 minutos en un baño de agua a temperatura ambiente y se lee la absorbancia a 570 nm. Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro UV-Vis. El bagazo se agregó a la solución acida, se mezcló y se dejó reaccionar en el tiempo estipulado. La mayor conversión en azucares reductores totales (0,98252 g/L), El compuesto se obtuvo a una concentración de H2SO4 al 2%, a una temperatura de 45 ° C y 75 ° C, y un tiempo de reacción de 60 minutos y 90 minutos, respectivamente. Para cada uno de los experimentos se determinó el porcentaje de conversión en base a la cantidad teórica de 71,8% de celulosa y hemicelulosa total en bagazo de caña de azúcar. El punto máximo de conversión de ART (4.181%) se obtuvo a una temperatura de 45 y 75 ° C y un tiempo de 60 y 90 minutos a una concentración de ácido sulfúrico al 2%. Se observó que el porcentaje de conversión decrecía y aumentaba irregularmente por lo que se deduce que es debido a la probable descomposición de los azúcares en ácidos orgánicos, furfural o compuestos fenólicos tal como lo describe, en conclusión general, las condiciones favorables para llevar a cabo la hidrólisis ácida de bagazo de caña si tratamiento con H_2SO_4 es a concentraciones y temperaturas bajas, con tiempos más prolongados, es decir, a concentraciones de H_2SO_4 del 2 y 4% con temperaturas entre 45 y 60°C y en tiempos de 60 a 90 minutos.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Aprovechar el orujo de uva (*Vitis vinífera L*.) para obtener etanol por vía hidrólisis alcalina e hidrólisis enzimática

1.3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar los parámetros fisicoquímicos (pH, Temperatura) ideal en el proceso de hidrólisis alcalina utilizando orujo de uva.

- Determinar los parámetros fisicoquímicos (pH, Temperatura) ideal en el proceso de hidrólisis enzimática utilizando orujo de uva.

- Determinar el rendimiento de etanol obtenido del orujo de uva por los dos procesos de hidrólisis alcalina y enzimática.

1.4. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA

Teniendo en cuenta la necesidad de sustitución a un costo adecuado, la producción de biocombustibles a partir de residuos agroindustriales es una opción eficaz, los combustibles de origen fósil, para combatir el cambio climático, mejorar el empleo rural e implica desafíos para el desarrollo sostenible, tanto a nivel mundial como nacional. Es por ello se prestó especial atención a la composición del orujo, donde contiene biomasa residual de levadura y etanol, además es uno de los residuos agroindustriales que existen en la región de Moquegua el cual puede ser utilizado para obtener etanol y otras futuras investigaciones. El etanol es el biocombustible más utilizado en el sector transporte en todo el mundo. (Alvira et al., 2010).

Los métodos utilizados para la obtención de etanol se dividen entre dos grandes grupos como es la hidrólisis y la fermentación que se realizan de manera secuencial o simultáneamente en el reactor, por tanto mediante la hidrólisis alcalina se puede usarse hidróxido de sodio (NaOH) para el tratamiento de los residuos lignocelulósicos, una dilución en NaOH provoca al residuo hinchazón, incremento del área superficial interna, descenso del grado de polimerización, descenso de la cristalinidad, separación entre la lignina y la celulosa y ruptura de la estructura (Corbin et al., 2015), la hidrólisis enzimática hace que se obtenga una solución de azucares fermentables que contiene principalmente glucosa, este

tratamiento presenta la ventaja de que requiere muy poco consumo de energía y que es limpio con el medio ambiente y menos costoso (Sánchez & Cardona, 2008). Un estudio realizado en orujo de uva para obtener etanol aportaría beneficios, tanto económicos a la actividad vitivinícola, como medioambientales en la Región de Moquegua; Son razones por las que se considera una alternativa para aprovechar el orujo de uva para la obtención de etanol mediante vía hidrólisis alcalina e hidrólisis enzimática en el valle de Moquegua.

1.5. HIPÓTESIS

1.5.1. HIPÓTESIS GENERAL

La temperatura y pH son determinantes específicos en la obtener etanol a partir de orujo de uva por vía hidrólisis alcalina e hidrólisis enzimática

1.5.2. HIPÓTESIS ESPECÍFICA

- Los parámetros de temperatura y pH ideales son factores determinantes para el proceso de obtención de etanol por vía hidrólisis alcalina.
- Los parámetros de temperatura y pH son factores determinantes para el proceso de obtención de etanol por vía hidrólisis enzimática.
- Los procesos por vía hidrólisis enzimática y por vía hidrólisis alcalina influye en el rendimiento de obtención de etanol a partir de orujo de uva.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. BASES TEORICAS

2.1.1. UVA

La uva (*Vitis vinífera L*.), son una de las frutas convencionales más valoradas del mundo, existiendo alrededor de 60 especies de uvas (Mitić *et al*., 2012). De todos los compuestos con principios activos descubiertos en la vid, indudablemente los compuestos polifenólicos han despertado el mayor interés desde el punto de vista de la investigación farmacológica en relación con sus propiedades protectoras del sistema cardiovascular, el 80% del rendimiento de uva se utiliza para la elaboración del vino (Detns et al., 2002); (Otero et al., 2015).

Las uvas son elementos esenciales por el cual se elabora finalmente el vino. La uva (*Vitis vinífera L*.), que produce el vino pertenece a la familia biológica conocida como vitácea, que son una clasificación de plantas con tendencia a trepar por las superficies fijas. Esta familia posee once géneros diferentes, pero tan sólo la *vitis* es interesante como fruta vitivinícola. Dentro del género *vitis* existen 60 especies, pero tan sólo la vinífera es la que proporciona vino (de origen indoeuropeo) (Antonio, 2010).

2.1.1.1. Composición química de la uva

El agua es el componente químico mayoritario de la uva madura (75-85%), y actúa como solvente de diversos compuestos químicos (volátiles y no-volátiles) que son conducidos hacia la misma principalmente a través del floema (Mitić et al., 2012). Aproximadamente el 99% del agua presente en las bayas es absorbida por las raíces desde el suelo, por lo tanto la disponibilidad de agua en el mismo afectará significativamente el crecimiento de la planta y el desarrollo de las bayas (Ruales et al., 2017).

Los azúcares representan normalmente más del 90% de los sólidos solubles totales en bayas maduras, se acumulan principalmente en las células de la pulpa en concentraciones comprendidas entre 150 y 300 g/L, y constituyen la principal fuente de carbono utilizada por las levaduras durante la fermentación alcohólica. En la mayoría de los cultivares de *Vitis vinífera*, el 95-99% de estos azúcares se presentan bajo la forma de hexosas, especialmente glucosa y fructosa, y el resto se compone fundamentalmente de sacarosa, y algunas

pentosas (arabinosa, ramosa, ribosa, xilosa, maltosa y rafinosa, entre otros) (Catania & Avagnina, 2007). Las flores y uvas inmaduras pueden contener algo de almidón, debido a su actividad fotosintética, pero el azúcar se importa hacia las bayas en desarrollo en forma de sacarosa a través del floema, la cual se hidroliza por acción de enzimas invertasas en sus correspondientes hexosas. Adicionalmente, las bayas contienen polisacáridos, principalmente insolubles, en las paredes celulares del hollejo y otros tejidos resistentes, los cuales se componen de celulosa y pectinas con pequeñas cantidades de hemicelulosa (xiloglucanos), Las cadenas de celulosa poseen moléculas de glucosa unidas a las mismas; mientras que las pectinas y hemicelulosas también contienen otros azúcares como arabinosa, xilosa, galactosa, manosa y ramnosa, así como los ácidos glucurónico y galacturónico (Vidal, S. *et al*, 2001).

2.1.2. Producción de uva en la región de Moquegua

La producción de uva en la Región Moquegua ha ido incrementado a través de los años, con una producción de 6,606.1 toneladas en el año 2018 (MINAGRI, 2018).

Tabla 1. Producción de uva en la región de Moquegua del 2018.

Región/Provincia/Distrito político	**Rendimiento (kg/há)**	**Producción (t)**
Región Moquegua	13,996	6,606.1
Provincia Mariscal Nieto	17,867	5,715.6
Distrito Moquegua	17,894	5,529.3
Distrito Samegua	16,935	186.3
Provincia Gral. Sánchez Cerro	5,808	795,7
Distrito Omate	5,571	568.2
Distrito Quinistaquillas	6,500	227.5
Provincia de Ilo	6,317	94.8
Distrito El Algarrobal	6,317	94.8

Fuente: (MINAGRI, 2018).

2.1.3. Orujo de uva

El orujo de uva es materia orgánica prensada que se queda después de la extracción del mosto de la elaboración de vinos y piscos, está conformada por hollejos (piel de uva), las semillas y dependiendo del productor el escobajo (Soto, Moure, Domínguez, & Parajó, 2008). Uno de los principales problemas de las bodegas y destilerías es la gran cantidad de este residuo que se produce en un corto período de un año. Además, el orujo de uva tiene algunas propiedades nocivas para el medio ambiente, como un valor de pH bajo y un alto contenido de fenoles fitotóxicos y antibacterianos, que dificultan la biodegradación (Bustamante et al., 2008).

El orujo de uva está formado por diversas composiciones constituyendo un 15% del peso de la uva procesada y teniendo un contenido de humedad del 65%. Su composición química es bastante compleja como son los siguientes: alcoholes, ácidos, aldehídos, esteres, polifenoles, sustancias, minerales, azucares, etc. (Ruberto et al., 2008). Entre sus componentes se encuentran carbohidratos, fibra, grasas, proteínas y sales inorgánicas, siendo el principal componente de fibra la lignina, seguida de la hemicelulosa, celulosa y pectina presentes en el orujo de uva (Díaz et al., 2007).

2.1.3.1. Composición química de orujo de uva

Los orujos de uva son desechos de uva en presentación sólida y que representado por semillas y hollejo, tienen una riqueza cualitativa y cuantitativa para el caso de constituyentes fenólicos, que comprenden sobre todo los ácidos fenólicos, los antocianos en presentación de pigmentos rojos (Ferreira 2002), los flavonoides, pigmentos amarillos y los flavanos3-oles o catequinas son incoloras (Muñoz et al., 2014).

Los hollejos de uva corresponden entre un 7-12% del peso total de la baya y se componen principalmente de agua en un (78 – 80%), así mismo ácidos orgánicos (0.8 – 1.6%), taninos (0.4 -3%), antocianos (0 – 0.5%), compuestos nitrogenados (1.5 – 2%), minerales (1.5 – 2%), ceras (1 – 2%), sustancias aromáticas (Soto et al., 2008).

Las semillas de la baya corresponden a hasta un 6% del peso total y están compuestas principalmente de agua (25-45%), compuestos glucídicos (34-36%),

taninos (4-10%), compuestos nitrogenados (4-6,5%), minerales (2-4%), lípidos (13-20%) (Cabanis et al., citado por Flanzy, 2002).

El orujo de uva de diversos vinificaciones contiene una parte muy importante de azúcares simples y otra de azúcares compuestos o como lo llaman los polisacárido. En la primera parte conforman el 40% del peso seco, y que principalmente está conformada por fructuosa y glucosa (Cury R et al., 2017), y en lo que es azúcares compuestos es conformada en su mayoría por celulosa, hemicelulosa y pectina, como también está presente la lignina que es una macromolécula y presenta grandes proporciones (Bayrak, 2013).

Tabla 2. Composición química del orujo de uva

Componente químico	**Orujo de uva fresca (%)**	**Orujo de uva fermentado (%)**
Celulosa	14.5	9.2
Hemicelulosa	10.3	4
Pectina	5.4	5.7
Lignina	17.2	11.6
Proteína	14.4	7

Fuente: (Zheng et al., 2012)

a. Celulosa

Monómero compuesto por un polímero lineal que tiene glucosa (hexosa) que al hidrolizarse eso libera monosacáridos que posteriormente pueden ser aprovechados con la fermentación por *Sacharomices cerevesiae*, en la cual la celulosa posee dos estructuras: una cristalina y la otra que es amorfa (Sánchez Riaño et al., 2010) esta última es más sensible al ataque enzimático, sin embargo necesitan ser desestabilizadas previamente mediante algún u otro tipo de tratamiento para poder hidrolizar (Cuervo, Folch, & Quiroz, 2009).

En la celulosa las unidades de D-glucosa están unidas por enlaces glicosidicos β-1,4, disposición baste rígida y muy estable (Cuervo et al., 2009). En la figura 1 se muestra una estructura parcial de la celulosa, la longitud del polímero es altamente variable y dependiente del organismo del cual la celulosa haya sido obtenida.

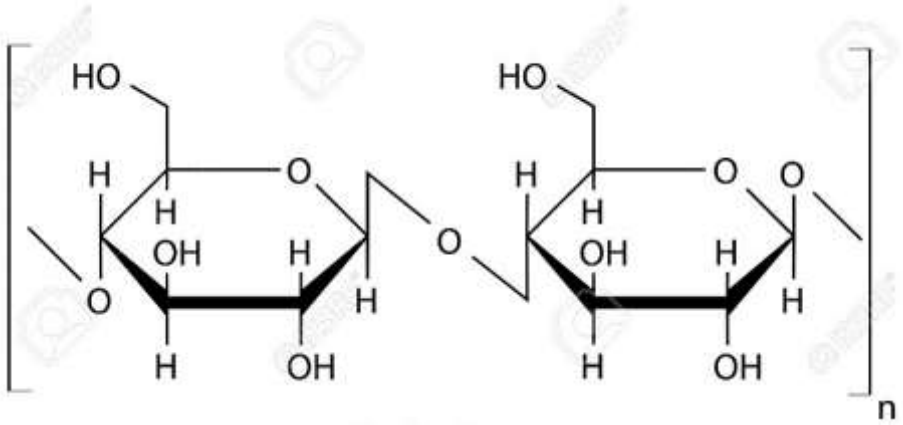


Figura 1. Estructura de la celulosa y enlace formado
Fuente: Cuervo et al., (2009)

b. Hemicelulosa

La hemicelulosa se caracteriza por tener heteropolímeros de cadenas más cortas de (500 a 3,000 unidades de azúcares), así mismo está compuesto por pentosas, hexosas y ácidos entrelazados entre sí para formar cadenas lineales ramificadas, además la hemicelulosa sirve como conexión entre la lignina y las fibras de celulosa, lo que hace que las paredes celulares de las células vegetales sean rígidas. (Chandel et al., 2011).

La biomasa lignocelulósica determina los azúcares de celulosa corta y azúcares de cadena ramificada para formar hemicelulosa (Torres et al., 2015), según su categoría, se divide en pentosa (generalmente D-xilosa y L-arabinosa), hexosa (como D-galactosa, D-glucosa y D-manosa) y ácido urónico (ácido glucurónico, 4-0). -Metilgalacturonaldehído), dependiendo de qué parte del azúcar puede ser sustituida parcialmente por acetilo (Chandel et al., 2011), las hemicelulosas son más fáciles de solubilizar e hidrolizar que la celulosa.

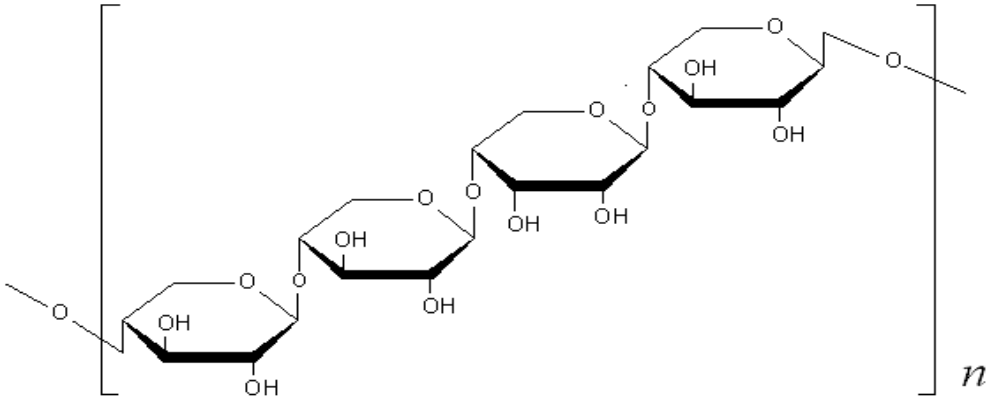


Figura 2. Estructura química de las unidades de las hemicelulosa
Fuente: (Rivas, 2014).

Dentro de la pared celular las hemicelulosas tienen como función servir de interfaz entre la celulosa y la lignina a través de puentes de hidrógeno entre los grupos $–CH_2OH$ de las cadenas de celulosa y los oxígenos glicosídicos de las hemicelulosas.

c. Lignina

Es el componente no polisacárido más abundante que existe en las paredes celulares de los vegetales, y está formado por compuestos aromáticos derivados de los azúcares, que se extraen agua de forma irreversible (Aro et al., 2005).

La lignina es un polímero amorfo tridimensional que se forma polimerizando unidades de fenilpropano. Se forman diferentes tipos de vínculos, que se alternan de manera desordenada. La mayor parte de la lignina se encuentra en el espacio intercelular y en la pared original de la célula y comienza en el espacio intercelular y se deposita a lo largo del ciclo de vida de la célula (Ten & Vermerris, 2013).

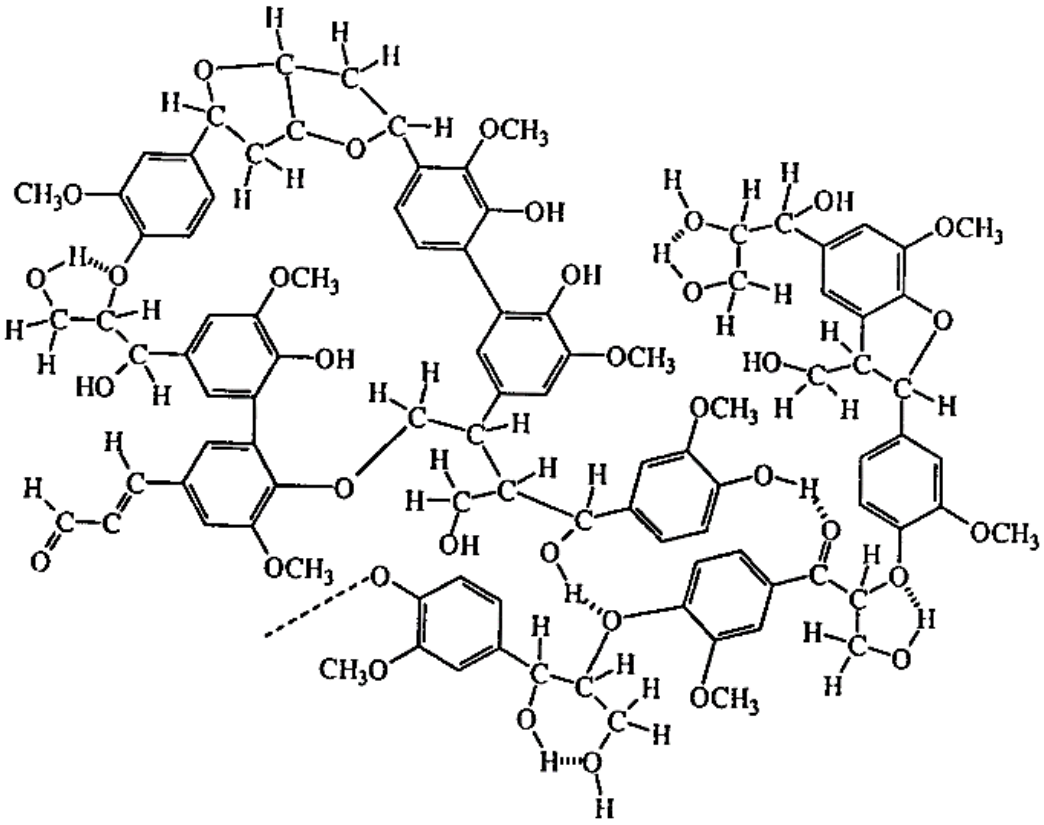


Figura 3. Estructura de la lignina.

Fuente: Ten & Vermerris, (2013)

Una vez que la lignina que rodea a las fibrillas de celulosa es removida o modificada, la celulosa resulta más accesible a las enzimas microbianas y puede ser eficientemente degradada.

d. Pectina

La pectina es un grupo de polisacáridos complejos y diversos, que abundan en la pared celular primaria y en la capa intermedia de las células vegetales, este polímero está compuesto principalmente de ácido galacturónico y sus ramas pueden albergar azúcares que pueden ser fermentados por la levadura *S. cerevisiae* (Caffall & Mohnen, 2009).

2.1.3.2. Azucares reductores

Los azúcares reductores son biomoléculas con glucosa, fructosa, lactosa y maltosa, tienen carbono libre en su estructura y pueden reducir las sales de cobre en determinadas condiciones (Leopold et al., 2011).

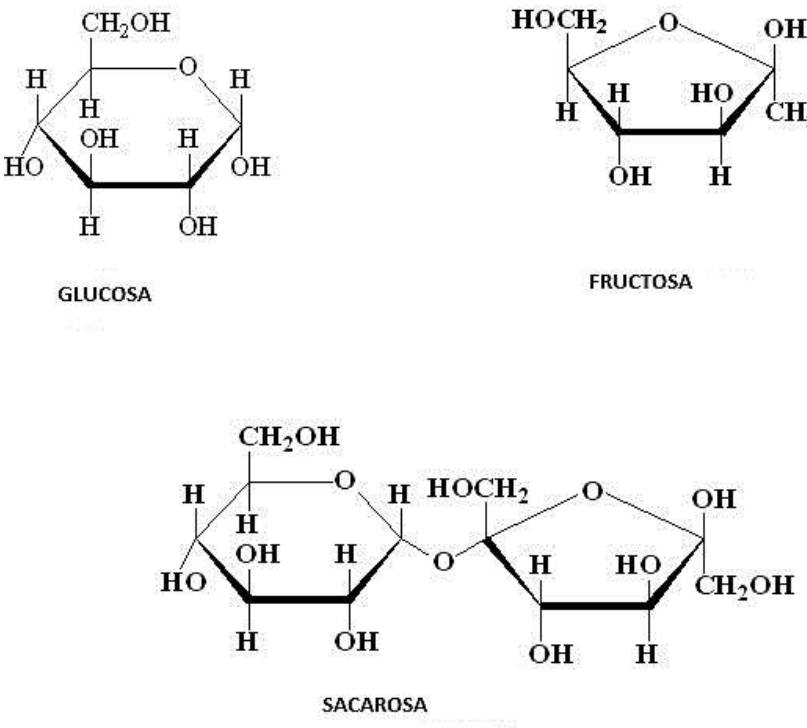


Figura 4. Estructura química de azúcares reductores
Fuente: Leopold et al., (2011).

Los monosacáridos y la mayor parte de los disacáridos poseen poder reductor, que deben al grupo carbonilo que tienen en su molécula. Los azúcares o carbohidratos pueden ser monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, oligosacáridos y polisacáridos.

2.1.4. Tratamientos para la fragmentación de polisacáridos

2.1.4.1. Pre tratamientos

Teniendo en cuenta que Saccharomyces cerevisiae solo puede fermentar azúcares simples para producir etanol, se realizan varios procesos sobre el material lignocelulósico para descomponer los polisacáridos presentes, mejorando así el rendimiento del proceso, y uno de los más utilizados es la sacarificación enzimática (Taherzadeh & Karimi, 2015)

Las enzimas tienen un acceso limitado a los polisacáridos, por lo que se realizan ciertos pretratamientos sobre el material para eliminar la parte de lignina y hemicelulosa (compuestos que forman barreras contra el ataque enzimático) y para reducir la cristalinidad de la celulosa. y aumentar la porosidad del material a tratar (Sánchez Riaño et al, 2010). Si el material no se trata, las fibras de celulosa

con alta cristalinidad no serán atacadas por enzimas porque están ubicadas en la matriz de hemicelulosa y rodeadas de lignina (Aro et al., 2005).

2.1.4.2. Tratamiento mecánico

Incluye triturar el material de trabajo en estado húmedo o seco, además, la trituración tiende a aumentar la superficie de contacto de los residuos de lignocelulosa, lo que puede reducir la cristalinidad y el grado de polimerización de la celulosa, promoviendo así su degradación en monómeros (Taherzadeh & Karimi, 2008).

2.1.4.3. Tratamiento térmico

El material se somete a la acción del agua caliente, cuyo objetivo principal es solubilizar la hemicelulosa y aumentar la permeabilidad del material a una temperatura de trabajo de 170°C a 230°C (Sánchez Riaño et al., 2010), en varios estudios sobre el orujo de uva blanca, se ha informado que reduce el rendimiento positivo de vapor de azúcar reductor debido al uso de temperaturas inferiores a 100°C (Corbin et al., 2015). El único propósito de utilizar una temperatura de 80 ° C es transferir los azúcares presentes en el orujo al medio líquido sin aumentar la posibilidad de que la temperatura empleada sea lo suficientemente intensa debido a la descomposición de polisacáridos para liberar nuevos azúcares reductores (Bayrak, 2013).

2.1.4.4. Tratamiento químico

En el tratamiento químico se encuentran los tratamientos con álcali, oxidante, agua caliente, oxidación húmeda, ozono, ácido y solvente, en diferentes tipos de tratamiento químico se suele utilizar ácido sulfúrico para la hidrólisis ácida (H_2SO_4) o ácido clorhídrico (HCl) (Sánchez Riaño et al, 2010), el ácido hidroliza parte de la celulosa y la hemicelulosa, este pretratamiento también puede destruir la matriz de lignina, por lo que su finalidad es destruir los polisacáridos, liberar nuevos azúcares y reducir la cristalinidad de la celulosa, haciéndola más resistente a posteriores ataques enzimáticos (Taherzadeh & Karimi, 2008).

a. Pretatamiento con álcalis

Considerando que la levadura *Saccharomyces cerevisiae* solo tiene la capacidad de fermentar azúcares simples (monosacáridos) para producir etanol,

el material lignocelulósico se manipula para romper los polisacáridos presentes, mejorando así el rendimiento del proceso (Silverstein et al., 2007).

2.1.4.5. Tratamiento enzimático

Además del propósito de descomponer los polisacáridos, la hidrólisis enzimática se lleva a cabo normalmente después del pretratamiento del material mediante uno de los métodos anteriores ya mencionados (Pike & Hertwig, 2008), el pre tratamiento aumenta la sensibilidad del material a la hidrólisis enzimática al debilitar su estructura química (Corbin et al., 2015) y reduzca la adsorción de enzimas a los sitios de lignina, de lo contrario afectará el rendimiento de la sacarificación enzimática al inactivar algunas enzimas (Taherzadeh & Karimi, 2008).

En el caso de utilizar las siguientes preparaciones enzimáticas, la temperatura utilizada durante el resto de la hidrólisis enzimática es ajustada por la enzima de 37°C a 45°C, utilizando preparado enzimático conteniendo: celulasa, pectinasa y B-glucosidasa (Bayrak, 2013).

En cuanto al pH, se puede demostrar que en el caso de una enzima degradadora de pectina con actividad poligalacturonasa obtenida de espinas de Aspergillus, el rango está entre 3 y 4,5 (Corbin et al., 2015).

El tiempo de hidrólisis enzimática fue analizado por Corbin et al., (2015), quién no obtuvo mejoras en el rendimiento del proceso enzimático pasadas las 12 horas de tratamiento utilizando celulasas por otro lado Bayrak (2013), utilizó tiempo de hidrólisis de 48 horas o 124 horas, agregando antibióticos (penicilina) con anticipación para evitar una posible contaminación.

2.1.5. Hidrólisis alcalina

Es la adición de álcali diluido a la biomasa, cuya eficiencia depende del contenido de lignina en el tratamiento previo del material. El hidróxido de sodio, calcio, potasio y amonio son reactivos alcalinos adecuados para el pretratamiento para eliminar la lignina y parte de la hemicelulosa, entre ellos, el hidróxido de sodio ha sido más investigado debido a la hinchazón provocada por el hidróxido de sodio diluido. El aumento de la superficie reducirá el grado de polimerización y cristalinidad de la celulosa, lo que dará como resultado la separación de los enlaces estructurales entre la lignina y los carbohidratos (Sun & Cheng, 2002).

El mecanismo de la hidrólisis alcalina de la biomasa parece estar basada en la saponificación de los enlaces ésteres intramoleculares que unen los xilanos de la hemicelulosa y otros componentes, como por ejemplo la lignina u otros componentes de la hemicelulosa. La efectividad de este pre tratamiento depende del contenido de lignina del material a tratar (Taherzadeh & Karimi, 2008).

La literatura reporta que la digestibilidad de las maderas duras tratadas con NaOH aumenta de un 14% a un 55% con una remoción de lignina del 24-55%, con un contenido inicial del 20%. Para maderas blandas (contenido de lignina mayor al 26%) el método no es tan efectivo. La disolución de la lignina empieza con la ruptura de los enlaces α-arileter y arilgliceron-β-arileter, fragmentando la lignina (Sánchez & Cardona, 2008).

La ruptura de los enlaces comienza con la protonación de grupos hidroxilo o éter en el carbono α de un monómero dando lugar a la formación del correspondiente ácido conjugado, esta especie puede progresar la ruptura de los enlaces α y β o condensarse en otros monómeros.

Se conocen tres mecanismos según la progresión del ácido conjugado:

- En el equilibrio ion oxonio de estructura quinónica correspondiente, cuya estabilidad supone la ruptura irreversible del enlace α-arileter. Además al presentar un exceso de carga en el carbono α pueden experimentar una adición nucleofílica de una molécula de agua o alcohol.

- También puede ocurrir una sustitución nucleofílica por una molécula de agua o alcohol que produzca la ruptura del enlace.

- O incluso el ácido conjugado puede romperse directamente por el enlace α-arileter y formar una carbonación.

a. Factores que afectan la hidrólisis alcalina

El modelado de la hidrólisis de un polímero es complicado, los factores que intervienen están estrechamente relacionados con los materiales lignocelulósicos como lo es tamaño, forma de partículas, y el tipo de estructura si es proveniente de maderas blandas o duras, de la misma manera intervienen las condiciones de la extracción, así la concentración del álcali, la temperatura, el tiempo, la agitación, se debe tener especial cuidado con la cantidad de material, el contacto interracial, la interferencia con otros compuestos (Silverstein *et al*., 2007).

Los procesos de tratamiento previo alcalino utilizan temperaturas y presiones más bajas que otras tecnologías de pretratamiento (Mosier *et al.*, 2005). La efectividad de este método depende del contenido de lignina de la biomasa y, por lo tanto, es muy adecuada para residuos agrícolas como la paja de trigo (Sánchez & Cardona, 2008); (Sun & Cheng, 2002).

El tratamiento previo alcalino puede mejorar en gran medida la digestibilidad de la celulosa y la degradación de los azúcares es menor que el tratamiento ácido, sin embargo, la aplicación se ve obstaculizada por el alto costo de los álcalis. La utilización de hidróxido de calcio (cal) como un agente alcalino barato y su recuperación y regeneración o amoníaco que es reciclable debido a su volatilidad podría ser una solución a este problema, además el tratamiento previo con álcali puede dar como resultado un aumento brusco en la sacarificación, con múltiples rendimientos (Kassim & El-Shahed, 1986).

2.1.6. Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática de la celulosa incluye tres pasos: la absorción de la celulasa en la superficie de la celulosa, la degradación de la celulosa en azúcar o glucosa fermentable, el abandono de la celulasa y la estimulación de la degradación enzimática de los materiales celulósicos. Esta investigación contribuirá a la perspectiva de un desarrollo a gran escala del proceso de transformación, que beneficiará en gran medida a la humanidad (Talebnia, Karakashev, & Angelidaki, 2010).

La hidrólisis usando enzimas apropiadas representa el método más efectivo para liberar azúcares simples de materiales celulósicos. La hidrólisis de la celulosa es catalizada por una clase de enzimas conocidas como celulasas. Estas enzimas pueden ser producidas por hongos como *Trichoderma reesei* y *A. niger* (Tabla 3) y / o bacterias como *Clostridium cellulovorans* (Arai et al., 2006).

Tabla 3. Rendimiento del azúcar en la hidrólisis enzimática de algunos tratamientos previos.

Tratamientos previos	Mezcla de enzimas	Fuente de enzima	Condiciones de hidrólisis	Rendimiento de azúcar (mg / g de MS	% Max. teórico
Diluir la impregnación de H_2SO_4 + SE	Celulasa β-glucosidasa	T. reesei A. niger	40 °C pH 5.0 96 h	612	99.6
0.75% (v/v) H_2SO_4, 121 °C	Celulasa β-glucosidasa xilanasa	T. reesei A. niger T. longibrachiatum	45 °C pH 5.0 72 h	565	74
2.15% (v/v) H_2O_2, 35 °C	Celulasa β-glucosidasa xilanasa	T. reesei A. niger T. longibrachiatum	45 °C pH 5.0 120 h	672	96.7
Pulido fino + oxidación húmeda	Celulasa β-glucosidasa	T. reesei A. niger	50 °C pH 5.0 24 h	638	92

Fuente: (Arai et al., 2006).

El uso de celulasa para sacarificar materiales celulósicos no provocará la formación de productos indeseables, tales como productos indeseables producidos en otras formas de hidrólisis (ácida, alcalina, etc.). Debido a las ventajas de los métodos proporcionados por las enzimas hidrolíticas, la investigación actual de la hidrólisis se centra en las enzimas utilizadas para la sacarificación de los subproductos de la celulosa (Machado, 2010).

La hidrólisis completa de la celulosa es que los enlaces entre las moléculas de glucosa se rompen y se agrega una molécula de agua a cada unidad para producir azúcar glucosa; la reacción es:

$$\underset{Celulosa}{(C_6H_{10}O_5)_{n+n}H_2O} \xrightarrow{Hidrólisis} \underset{Glucosa}{nC_6H_{12}O_6}$$

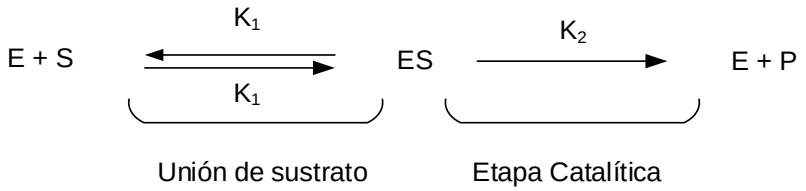
a. Cinética enzimática

La actividad de una enzima se determina a partir de la concentración de la enzima, la concentración del sustrato y su disponibilidad, la concentración de los

cofactores y/o los efectores alostéricos, la presencia, concentración y tipo de inhibidores, y la fuerza iónica, el pH y la temperatura del medio (Caranton, 2010).

La cinética enzimática estudia la forma en que estos parámetros influyen en la actividad enzimática, proporcionando un conocimiento de la reacción en estudio y permitiendo su control.

Para un único sustrato (S) y un único producto (P) se puede aplicar el siguiente esquema de reacción.



Cuando la concentración del sustrato [S], es mucha mayor que la de la enzima [E], la velocidad de reacción es de orden cero respecto a los reactantes, es decir depende solamente de la concentración de enzima presente. Por tanto la velocidad de reacción es esencialmente constante hasta que haya reaccionado casi todo el sustrato, momento en que pasa a depender de la concentración de sustrato existente y es de primer orden con respecto a la concentración de sustrato (Caranton, 2010).

b. Enzimas

Las enzimas son una gran y única clase de moléculas proteicas que actúan como catalizadores biológicos, al catalizar todas las reacciones del metabolismo celular, y proporcionar los medios para que se realicen funciones complejas tales como la síntesis de material genético, de polímeros estructurales y de otras sustancias. Las enzimas consisten en cadenas de L-aminoácidos unidos covalentemente en una secuencia definida, denominada estructura primaria, y enrollados en forma compleja, en una estructura dipolar iónico y con un centro activo, formado por relativamente pocos aminoácidos que son los responsables directos de la unión con el sustrato y que catalizan la reacción característica de cada tipo particular de enzima (Yineth Piñeros, 2009).

Como todos los catalizadores, las enzimas funcionan reduciendo la energía de activación de la reacción, lo que acelera enormemente la reacción, las enzimas no modifican el balance energético de la reacción en la que participan, ni

el balance de la reacción, pero logran acelerar el proceso incluso millones de veces. Por lo general, las reacciones que ocurren bajo el control de enzimas o catalizadores alcanzan el equilibrio mucho más rápido que las correspondientes reacciones no catalizadas; como otros catalizadores, las enzimas no serán consumidas por las reacciones que catalizan ni cambiarán su equilibrio químico. (Jorgensen & Federico, 1990).

La actividad de las enzimas puede ser afectada por otras moléculas. Los inhibidores enzimáticos son moléculas que disminuyen o impiden la actividad de las enzimas, mientras que los activadores son moléculas que incrementan dicha actividad. Igualmente, la actividad es afectada por la temperatura, el pH, la concentración de la propia enzima y del sustrato, y otros factores físico-químicos. (Espinosa, 2013).

c. Enzimas celulosas

Estas enzimas son producidas por varios microorganismos, comúnmente por bacterias y hongos. Estos microorganismos pueden ser aeróbicos o anaeróbicos, mesofílicos o termofílicos. Bacterias pertenecientes a *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteriodes*, *Erwinia*, Acetovibrio, Microbispora, and Streptomyces can produce cellulases effectively (Sun & Cheng, 2002). Hongos como Sclerotinia sclerotiorum, Pseudomonas aureus y Trichoderma, Aspergillus, Schizosaccharomyces y Penicillium se pueden utilizar para producir (Sarkar et al., 2012). Cepas mutantes de *trichoderma sp.* (*T. viride, T. reesei*, *T. longibrachiatum*) han sido durante mucho tiempo Considerados como los destructores más productivos y poderosos de celulosa cristalina (Zhou et al., 2008). Los productos comerciales de diversos aislados de *T. reesei* han estado disponibles durante mucho tiempo en aplicaciones de cereales, la industria cervecera, el procesamiento de frutas y verduras y también se han evaluado y aplicado ampliamente en relación con los procesos de producción de bioetanol. *T. reesei* secreta altas cantidades de enzimas, hasta 100 g/L (Ventura et al., 2015).

La celulasa es un grupo de enzimas que hidrolizan sinérgicamente la celulosa (Fig. 5) (Kim SH, 2004). El mecanismo ampliamente aceptado para la hidrólisis enzimática de celulosa implica acciones sinérgicas por endoglucanasas (EG, endo-1,4-bD-glucanasas) hidroliza los enlaces glucosídicos b-1,4 intramoleculares accesibles de las cadenas de celulosa al azar para producir nuevos extremos de cadena atacando las regiones internas de baja cristalinidad

en las fibras de celulosa creando cadenas libres de enlaces; Exoglucanasas o celobiohidrolasas (CBH, 1,4-bD-glucano celobiohidrolasas) segmenta de manera procesada las cadenas de celulosa en los extremos para liberar celobiosa o glucosa soluble; Y b-glucosidasas (BGL, celobias) son aquellos que hidrolizan celobiosa a glucosa para eliminar la inhibición de celobiosa. (Malavika & Selvam, 2015).

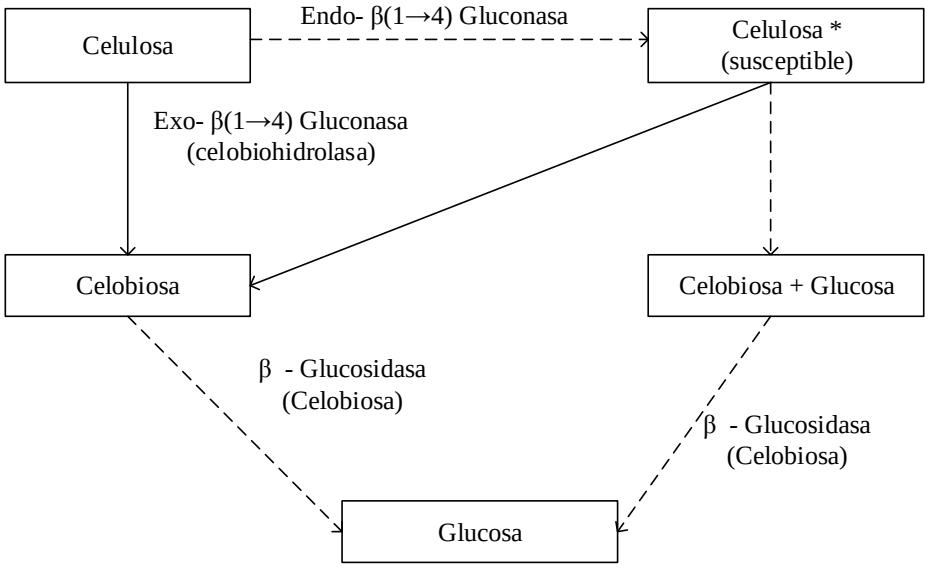


Figura 5. Modo de acción de las enzimas celulolíticas.

Fuente: (Kim SH, 2004).

d. Factores que afectan la actividad enzimática

Existen diferentes factores que afectan la hidrólisis enzimática de la celulosa que pueden ser alteradas por factores físicos o químicos, a saber, sustratos, actividad de celulasa, condiciones de reacción (temperatura, pH y otros parámetros) y una fuerte inhibición del producto y asi mismo para mejorar el rendimiento y la tasa de hidrólisis enzimática, la investigación se ha centrado en optimizar el proceso de hidrólisis y mejorar la actividad de la celulasa. (Sun & Cheng, 2002).

La velocidad de hidrólisis enzimática de la celulosa depende de varias características estructurales de la celulosa como las características de celulosa que afectan la velocidad de hidrólisis incluyen: (1) estructura molecular de la celulosa, (2) cristalinidad de la celulosa, (3) área de superficie de la fibra de celulosa, (4) grado de hinchamiento de la fibra de celulosa, (5) grado de polimerización, y (6) lignina u otros materiales asociados. (Detroy & St Julian, 1982).

Tabla 4. Comparación de las condiciones de tres procesos

	Consumibles	Temperatura (k)	Tiempo
Ácido diluido	<1% H_2SO_4	488	3 min
Ácido concentrado	30–70% H_2SO_4	313	2 - 6 h
Enzimático	Celulosa	323	1.5 días

Fuente: Hamelinck et al., 2005).

Una baja concentración de sustrato proporciona un rendimiento bajo o alto y según la dosis de celulasa puede aumentar los costos desproporcionados (Hamelinck et al., 2005). Una dosis de celulasa de 10 FPU (unidades de papel de filtro) por gramo de biomasa se usa a menudo en estudios de laboratorio porque proporciona un perfil de hidrólisis con altos niveles de rendimiento de glucosa en un tiempo razonable (48–72 h) a un costo enzimático razonable (Gregg & Saddler, 1996).

Una limitación con el uso de celulasa es que hay una reducción en el rendimiento debido a la inhibición del producto final (celobiosa y glucosa). La sacarificación y la fermentación (SSF) simultáneas superan este problema al hidrolizar la celulosa y al mismo tiempo fermentar el producto de hidrólisis. (Rezaei, Richard, & Logan, 2008)

2.1.7. Etanol

La producción de etanol o alcohol etílico (CH_3CH_2OH) se puede producir por dos rutas. La primera es a través de la fermentación, que se considera importante, y mediante la conversión de azúcares por microorganismos se obtiene etanol (bioetanol). Otra ruta es la ruta sintética, que pasa por la reacción catalítica de hidratación del etileno (del petróleo) (Villalobos Cortínez, 2010).

En otros países / regiones, el bioetanol utilizado para cortar gasolina proviene de una solución etanólica de etanol, que sufre cambios de destilación (hasta alcanzar su punto azeotrópico: etanol al 96%) y deshidratación, con una pureza final de 99,4 o superior (Resolución 1295/2008, Secretaría Nacional de Energía) también llamado etanol absoluto (Mejia, Espinal, & Mondragón, 2006).

El bioetanol producido y consumido en varios países muestra que son de primera generación, derivados de la fermentación de materias primas

alimentarias. Debido a los problemas relacionados con la producción de estos biocombustibles, se ha estado buscando fuentes de energía alternativas, y hay muchos estudios que intentan producirlo a partir de subproductos o residuos agroindustriales conocido como (bioetanol de segunda generación) (Linares, 2018).

A nivel internacional, existen algunos estudios sobre la producción de bioetanol a partir de la parte orgánica de los residuos sólidos urbanos (Martínez, Montoya, & Sierra, 2014), desechos de frutas (Tejada Benítez et al., 2010); pastos (Mateus et al., 2012) y otros.

Este biocombustible contiene un índice de octano más alto una amplia gama de límites de inflamabilidad, una velocidad de llama más alta y un calor de vaporización más alto, estas características permiten una relación de compresión más alta y un tiempo de combustión más corto, lo que es ventajoso en comparación con la gasolina en los motores de combustión interna desde el punto de vista de la eficiencia teórica (Balat, 2011).

2.1.8. Fermentación alcohólica

Lo que ocurre en la fermentación alcohólica (también llamada fermentación etanólica o incluso fermentación etílica) es la conversión de sustancias orgánicas complejas en sustancias simples, un proceso biológico de fermentación en ausencia de aire (oxígeno-O2). Causada por la actividad de enzimas o ciertos microorganismos unicelulares (levaduras) que procesan los carbohidratos (generalmente azúcares como glucosa, fructosa, sacarosa, almidón, etc.), para obtener como productos finales un alcohol en forma de etanol (CH_3-CH_2-OH), el gas consumido por los microorganismos a través del metabolismo celular de la energía anaeróbica y el dióxido de carbono (CO2) en forma de moléculas de ATP, cambian químicamente las sustancias orgánicas. (Sánchez Riaño et al., 2010).

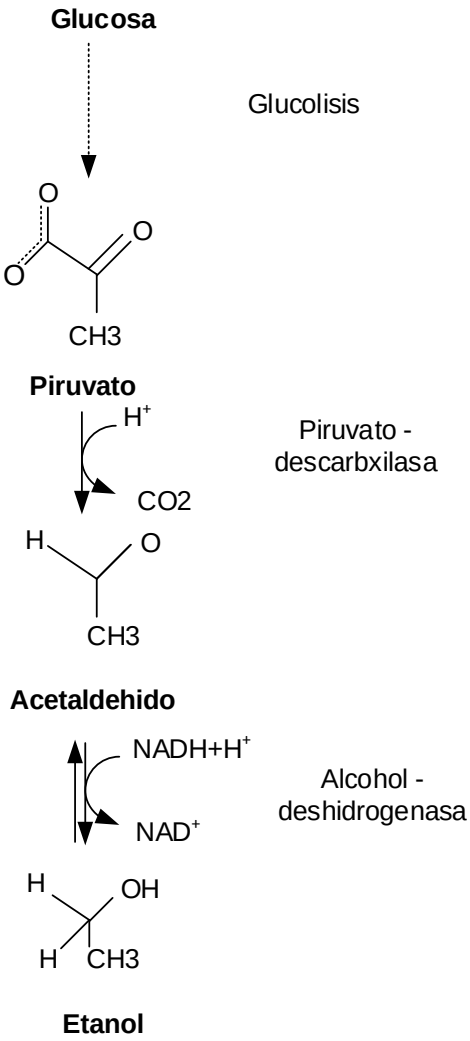


Figura 6. Fermentación alcohólica.

Fuente: Sánchez Riaño et al*.,* (2010)

En el proceso de fermentación alcohólica, el microorganismo comúnmente utilizado en la industria es Saccharomyces cerevisiae, ya que puede utilizar todo tipo de hexosas y producir etanol con un rendimiento cercano al máximo teórico (0,51 g/g). En la práctica, es difícil obtener una tasa de conversión tan alta, porque la levadura consumirá parte de la energía consumida para el metabolismo y el crecimiento celular. Además, si se utiliza en el proceso de producción de etanol a partir de lignocelulosa, presenta una gran tolerancia a los productos tóxicos producidos durante el proceso de pretratamiento. Sin embargo, *Saccharomyces cerevisiae* tiene grandes limitaciones cuando está destinado a ser utilizado para la fermentación de azúcares de hemicelulosa porque no puede fermentar los azúcares pentosa que también están presentes en materiales lignocelulósicos, como la xilosa (Castaño P., Reales A., & Zapata M., 2015).

La fermentación alcohólica puede llevarse a cabo por lotes, por lotes alimentados o en forma continua. El proceso típico de producción de alcohol por lotes, comprende la esterilización de la materia prima seguida del ajuste del pH con H_2SO_4 y de los ºBrix a valores de 14-22. El mosto obtenido se somete a fermentación, el resultante se decanta y centrifuga para recuperar el etanol, mientras la levadura se recircula a los fermentadores. Para la obtención de alcohol anhidro se utiliza mayoritariamente la destilación azeotrópica con benceno. La fermentación por lotes alimentados implica bajos niveles de concentración de sustrato en el transcurso de la fermentación, mientras el alcohol se va acumulando en el medio. Los procesos continuos tienen mayores ventajas frente a los procesos por lotes debido a los menores costos del biorreactor, menores requerimientos de mantenimiento y operación, mejor control del proceso y mayor productividad. Generalmente en la industria, aunque la productividad es importante, es más relevante la conversión del sustrato considerando que la mayor parte de los costos de producción corresponden a la materia prima (Linares, 2018).

2.1.8.1. Fases de la fermentación

Se describen varias fases que se describen a continuación:

- Fase latencia o adaptación

Fase de inactividad de duración variable ya que depende del número de células así como de las características metabólicas de las mismas. Grandes fases de adaptación indican la presencia de sustancias tóxicas, muerte de células o inactividad de éstas.

- Fase temporal de aceleración

No ha sido definida matemáticamente pero en ellas proporciones de las células hijas tienden a alcanzar el 50% de la población.

- Fase de crecimiento exponencial

Donde los microorganismos crecen de manera rápida y el crecimiento de la población depende del sustrato inicialmente colocado.

- Fase estacionaria

Fase donde ha alcanzado el máximo valor de producción, en esta fase algunas células se dividen y otras mueren, y las células vivas utilizan los compuestos provenientes de las muestras como nutriente, manteniendo la población constante durante toda la fase.

- Fase declive o muerte

Por lo que la población celular presente no se mantiene por si misma comienza a morir. Tendiendo a tener un comportamiento exponencial (Sánchez Riaño et al., 2010).

2.1.8.2. Microorganismos relacionados con la fermentación de bioetanol

Los microorganismos para la fermentación de bioetanol pueden describirse mejor en términos de sus parámetros de rendimiento y otros requisitos, como la compatibilidad con productos, procesos y equipos existentes. Los parámetros de rendimiento de la fermentación son: rango de temperatura, rango de pH, tolerancia al alcohol, tasa de crecimiento, productividad, tolerancia osmótica, especificidad, rendimiento, estabilidad genética y tolerancia a los inhibidores. Las características requeridas para un microorganismo industrialmente adecuado se resumen en la Tabla (5) (Dien, Cotta, & Jeffries, 2003).

Tabla 5. Rasgos importantes para el proceso de fermentación del bioetanol.

Rasgos	**Requerimiento**
Rendimiento de bioetanol	> 90% de lo teórico
Tolerancia al bioetanol	>40 g/L
Productividad del bioetanol.	>1 g/L
Crecimiento robusto y requisitos de crecimiento simple.	Formulación de medio barato
Capaz de crecer en hidrolizados sin diluir.	Resistencia a los inhibidores.
Las condiciones de crecimiento del cultivo se retardan los Contaminantes	pH ácido o temperaturas más altas

Fuente: Dien & Jeffries, (2003).

Tradicionalmente, las levaduras *S. cerevisiae* y *Zymomonas mobilis* se han utilizado para la fermentación de bioetanol. Son capaces de fermentar

eficientemente la glucosa en bioetanol, pero no pueden fermentar la xilosa (Keshwani & Cheng, 2009). El microorganismo utilizado con mayor frecuencia para la fermentación de bioetanol en procesos industriales es *S. cerevisiae*, que ha demostrado ser muy robusto y adecuado para la fermentación de hidrolizados lignocelulósicos (Galbe & Zacchi, 2002). La levadura *S. cerevisiae* puede fermentar fácilmente las hexosas, pero difícilmente la xilosa en los hidrolizados de lignocelulosa, debido a que *S. cerevisiae* carece de enzimas que convierten la xilosa en xilulosa (Tian et al., 2008).

2.1.9. Destilación

Proceso que consiste en calentar un líquido hasta que sus componentes más volátiles pasan a la fase de vapor y, a continuación, enfriar el vapor para recuperar dichos componentes en forma líquida por medio de la condensación. El objetivo principal de la destilación es separar una mezcla de varios componentes aprovechando sus distintas volatilidades, o bien separar los materiales volátiles de los no volátiles. En la evaporación y en el secado, normalmente el objetivo es obtener el componente menos volátil; el componente más volátil, casi siempre agua, se desecha. Sin embargo, la finalidad principal de la destilación es obtener el componente más volátil en forma pura (Mosquera 2008).

III. MÉTODO

3.1. Tipo y Nivel de Investigación

El tipo de investigación trabajado es aplicado con datos numéricos (cuantitativo), nivel de investigación es comparativo del rendimiento de etanol obtenido de las vías de proceso de hidrólisis alcalina y enzimática.

3.2. Operacionalización de variables

El respectivo cuadro de operacionalización de variable es detallado el **Anexo 1**
En las cuales las variables de estudio son la temperatura y el pH en el tratamiento para la obtención de etanol del orujo de uva.
Las variables dependientes es el rendimiento de etanol obtenido del orujo de uva.

3.3. Población y muestra

- **La población**

  Para el desarrollo de esta investigación se trabajó con muestra de estudio que es el orujo de uva obtenido del excedente residual de las bodegas vitivinícolas, en este caso se trabajó con orujo de uva proveniente de la bodega “Agroindustrias Campano” de la región de Moquegua.

- **Muestra:**

  La muestra estuvo constituida por 200 gramos de material de estudio.

3.4. Lugar de investigación

El presente trabajo de investigación se desarrolló la parte experimental en las instalaciones de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial en la Universidad Nacional de Moquegua en los Laboratorios de Ingeniería de procesos, Biotecnología y el Laboratorio de Química.

La cuantificación de alcoholes se realizó por cromatografía de gases en el pabellón de control de calidad en el laboratorio de cromatografía de la Universidad Nacional San Antonio Abad de Cuzco.

El análisis fisicoquímico para el etanol se realizó en la Facultad de ciencias químicas, físicas y matemáticas en el Laboratorio de Química de la Universidad Nacional San Antonio Abad de Cuzco.

3.5. Instrumentos

3.6. Equipos de laboratorio

- Baño maría VWR – modelo WB20, Serie:W4177081
- Balanza analítica (0 – 100 g); con sensibilidad de 0.0001 g
- Estufa – marca; Memmert, modelo: UN 55
- pH – metro de escala 0.00 – 14.0
- Destilador rotavapor
- Equipo soxlet: balón, refrigerante, mangueras, pinzas, soporte universal.
- Desecador de campana
- Termómetro digital con rango de -10 a 100°C
- Plancha de calentamiento
- Campana de extracción de gases
- Espectrómetro UV- Visible
- Mezclador de vortex – marca: JP Selecta, modelo: 7001725
- Micropipeta de 100 uL
- Micropipeta de 1000 uL
- Alcoholímetro (0 – 100%)

3.7. Materiales de laboratorio

- Probetas de 250 ml, 100 ml.
- Tubo de ensayo de 10 ml
- Vasos precipitados de 400 ml, 250 ml, 50 ml.
- Pipetas volumétricas de 5 ml
- Propipeta
- Embudos
- Fiola de 1000 ml, 100 ml, 5ml, 1ml.
- Matraz Erlenmeyer de 250 ml.
- Frascos de vidrio de 1000 ml con tapa rosca
- Frascos de vidrio de 2000 ml con tapa rosca
- Varilla de agitación
- Placas Petri
- Puntas para micropipetas de 10µL-100µL.

- Puntas para micropipetas de 100µL - 1000µL
- Puntas para micropipetas de 100uL - 1000uL
- Criovial de plástico estéril 2 mL
- Papel filtro de curso rápido 50x50 cm - MUNKTEL

3.8. Reactivos

- Solución de NaOH normalizada (0.1N)
- Ácido sulfúrico a 97%
- Carbonato de calcio al 5%
- Etanol al 96%
- Ácido acético gálico 100%
- Fenol al 5%
- Glucosa grado analítica

3.9. Insumos

- Enzimas (Cellulase from Trichoderma resesei) celulosas celluclast (1.5 p/p)
- Levadura comercial *Sacharomyces cerevisae*

3.10. Metodología experimental

Para el desarrollo experimental de esta investigación, se realizaron ensayos analíticos de acuerdo a los objetivos planteados, desarrollando la determinación de humedad del orujo de uva luego el tratamiento y obtención de etanol.

3.10.1. Metodología a seguir para la hidrólisis alcalina

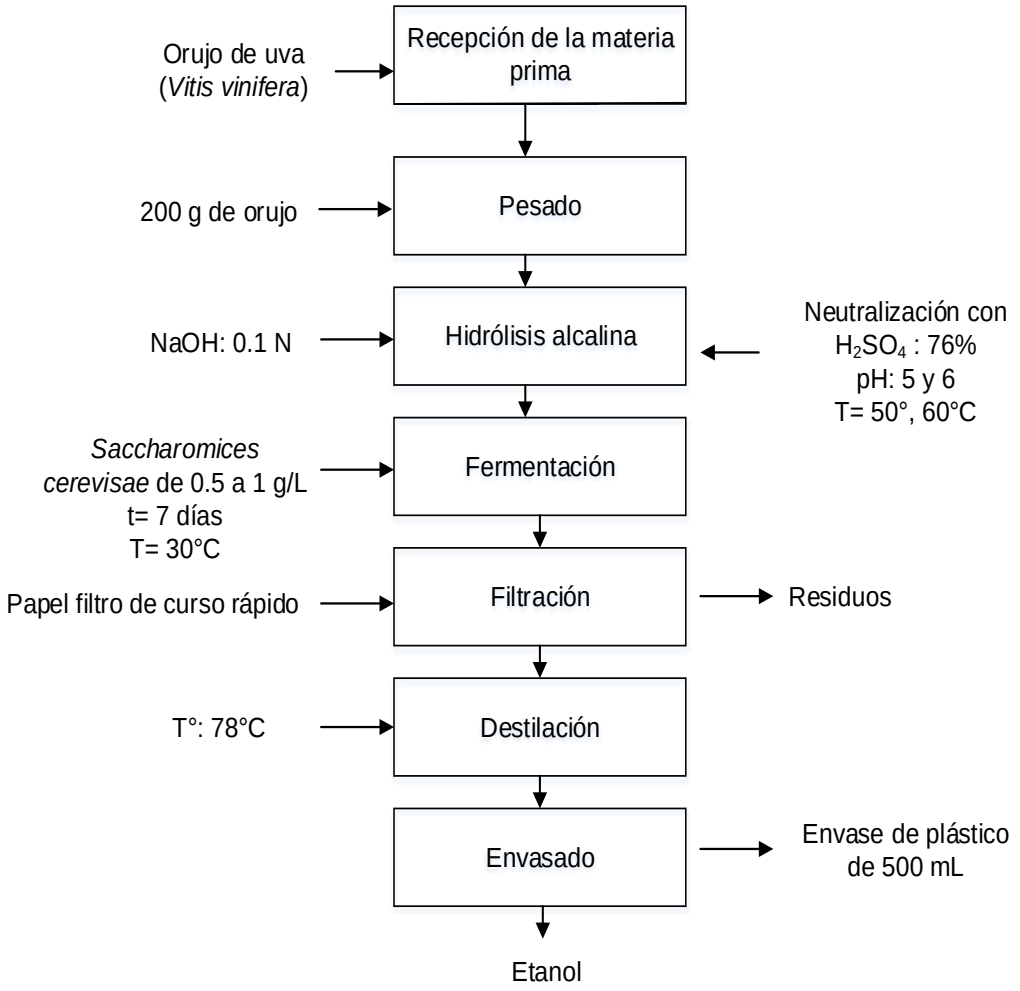


Figura 7. Flujograma del procedimiento de hidrólisis alcalina

- **Procedimiento de obtención de etanol por el proceso de hidrólisis alcalina**

1. Recepción y selección de materia prima (orujo de uva)

El orujo de uva fue recolectado de la bodega “Agroindustrias Campano” y seleccionado de acuerdo al procedimiento como fue separar tallos de la uva y verificación de agentes contaminantes con la acción mecánica y visualmente.

2. Pesado

Se pesó 200 gramos de orujo de uva y fueron colocados en los frascos de vidrios para el proceso de hidrólisis alcalina.

3. Hidrólisis con NaOH

Las muestras fueron sometidas en 300 ml de solución NaOH al 0.1N por un periodo de una 1 hora para la remoción de la lignina luego se procedió a la neutralización con H_2SO_4 al 76% para poder seguir con el siguiente procedimiento hasta llegar a un pH: 5 y fue sometida a una temperatura de 50°C, donde se somete a un calentamiento en un baño maría cerrado herméticamente por 24 horas se realiza una agitación manual durante cinco minutos por cada dos horas y así esto ayuda a que se produzca un hinchamiento de la biomasa, teniendo lugar a reacciones como solvatación y saponificación. Se repite el procedimiento a un pH: 6 con temperatura: 50°C y pH: 5 a temperatura: 60°C; pH: 6 a temperatura 60°C.

4. Fermentación

- Se midió el pH de las soluciones que hayan pasado por tratamientos de hidrólisis alcalina y se adecúo para la fermentación a un pH de 4.5 con carbonato de calcio al 5%.

- Por otro lado se pesó la levadura en la balanza analítica de tal manera que esta sea 0.5 de levadura *Sacharomyces cerevisae* por cada litro de material fermentable.

- Luego se tomó 10 ml de muestra en donde se colocó la levadura y se agitó suavemente hasta disolverse y posteriormente se puso en una estufa por 30 minutos a una temperatura de 30°C en la que la levadura aumente el volumen.

- Luego colocar los 10 ml de la solución de levadura en la muestra tratada del orujo de uva y se dejó fermentar a una temperatura de 30 °C en un baño maría herméticamente cerrado, el cual se evaluó durante 7 días, el cual se realizó una agitación manual durante 5 minutos por día para liberar el CO_2.

5. Filtración

Se procedió a separar la materia fermentable utilizando papel filtro de curso rápido para su posterior procedimiento que es la destilación.

6. Destilación

Una vez pasado por filtración se procedió a destilar utilizando el equipo de rota-vapor el cual se programó la temperatura a 78°C que es la temperatura de ebullición de etanol (NFPA, 2007).

3.10.2. Metodología a seguir para la hidrólisis enzimática

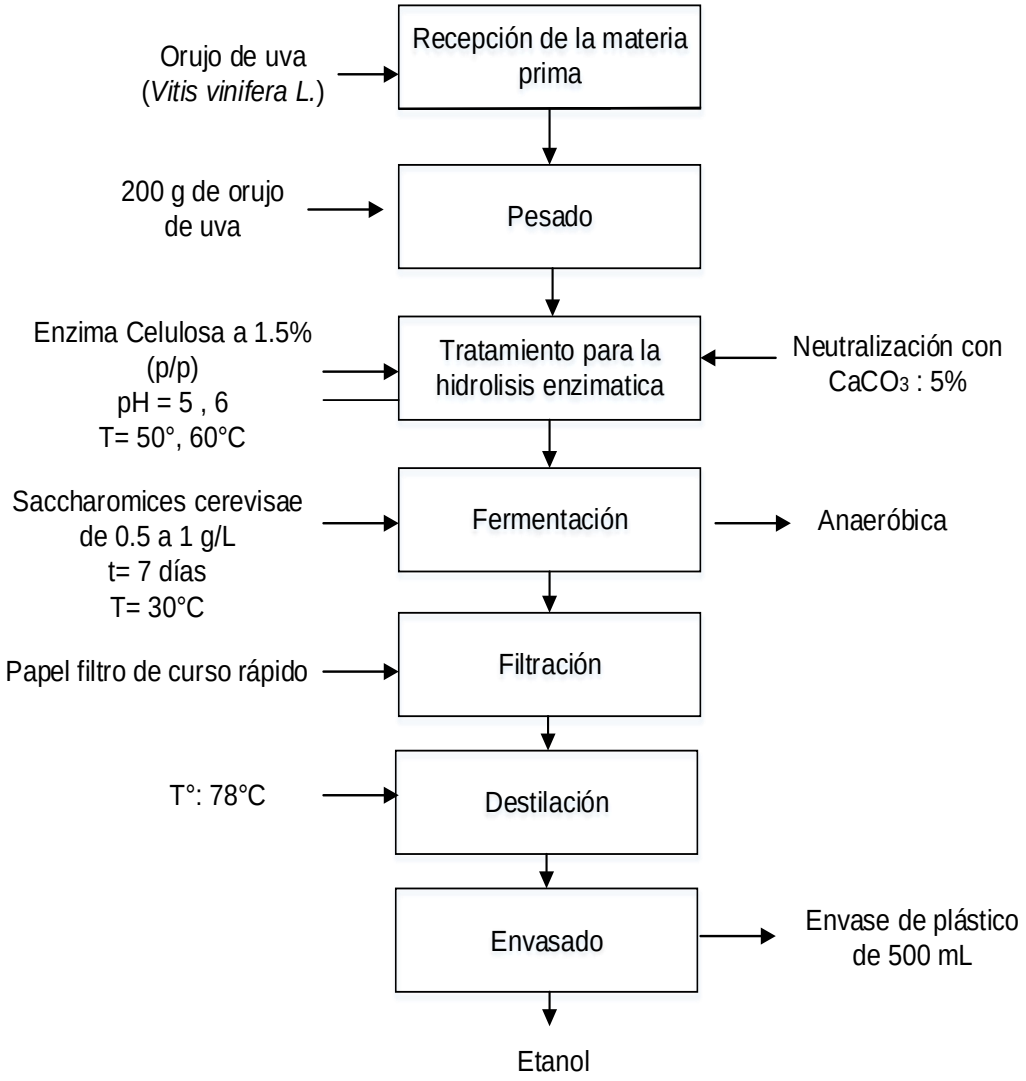


Figura 8. Flujo grama del procedimiento de hidrólisis enzimática.

- **Procedimiento para la obtención de etanol por vía hidrolisis enzimática.**

1. Recepción y selección de materia prima (orujo de uva)

El orujo de uva fue recolectado de la bodega “Agroindustrias Campano” y seleccionado separando los tallos existentes y la verificación de agentes contaminantes con la acción mecánica visualmente.

2. Pesado

Se pesó 200 gramos de orujo de uva y fueron colocados en frascos de vidrios de 1000 mL por cada tratamiento del proceso de hidrólisis enzimática.

3. Hidrólisis con Enzima Cellulase from Trichoderma reseei

Las muestras fueron sometidas a la neutralización con H_2SO_4 al 70% de pH a 5, luego se añadió enzima Cellulase from *Trichoderma reseei* al 1.5 p/p el cual fue sometida a una temperatura de 50°C por 24 horas y se realiza una agitación manual durante cinco minutos por cada dos horas ayudando a que se produzca un hinchamiento de la biomasa, teniendo lugar a reacciones como solvatación y saponificación. Se repite el procedimiento a un pH: 6 a Temperatura: 50°C y pH: 6 a temperatura: 60°C.

4. Fermentación

- Se midió el pH de las soluciones que hayan pasado por tratamientos de hidrólisis enzimática y adecuar para la fermentación a un pH de 4.5 utilizando carbonato de calcio al 5%.

- Por otro lado se pesó la levadura en la balanza analítica de tal manera que esta sea 0.5 de levadura *Sacharomyces cerevisae* por cada litro de material fermentable.

- Luego se tomó 10 ml de muestra en donde se colocó la levadura y se agitó suavemente hasta disolverse y posteriormente se puso en una estufa por 30 minutos a una temperatura de 40°C.

- Luego colocar los 10 ml de la solución de levadura en la muestra tratada del orujo de uva y se dejó fermentar a una temperatura de 30 °C en un

baño maría herméticamente cerrado, el cual se evaluó durante 7 días, el cual se realizó una agitación manual durante 5 minutos por día para liberar el CO_2.

5. **Filtración**

Se procedió a separar la materia fermentable (liquido) utilizando papel filtro de curso rápido para su posterior procedimiento que es la destilación.

6. **Destilación**

Una vez cumplido el tiempo de fermentación de 7 días se procedió a separar el bioetanol del material fermentable utilizando el destilador rotavapor, controlando la temperatura y tomando en cuenta la temperatura de ebullición de etanol de 78°C (NFPA, 2007).

3.11. Procedimientos

3.11.1. Determinación de pH

El pH se determinará mediante el pH–metro de acuerdo al procedimiento que se describe en el **Anexo 2.**

3.11.2. Determinación del grado alcohólico

Para la lectura del grado alcohólico de la muestra obtenida por destilación el cual se describe en el **Anexo 3.**

3.11.3. Determinación del rendimiento

Para determinar el rendimiento será de acuerdo a la cantidad de alcohol obtenido sobre la cantidad de orujo utilizado **Anexo 4.**

$$R = \frac{Alcohol\ obtenido\ (g)}{Residuo\ (g)}\ x\ 100$$

3.11.4. Determinación de azucares reductores

Analizar la concentración de azúcar reductor en el hidrolizado fue utilizar el método de fenol-ácido sulfúrico con glucosa como patrón. La determinación

cuantitativa se realizó por espectrofotometría a 490 nm por espectrofotometría. El resultado se expresa en términos de solución g/L de azúcar reductor **Anexo 5.**

3.11.5. Determinación de alcoholes por cromatografía de gases

Las condiciones del análisis por cromatografía utilizadas para analizar el etanol producido por fermentación fueron las siguientes: temperatura de inyector. 110°C, presión 2.00 psi, flujo de hielo 184 ml/min, relación Split 100:1, temperatura del detector 250°C y velocidad de la columna 49 cm/seg. **Anexo 6.**

3.11.6. Determinación de extractos extraíbles

La determinación de extractos extraíbles utilizando los solventes (éter dietílico, hexano, éter de petróleo) extrae la grasa y otros componentes (compuesto fenólicos, etc.) de la muestra soluble en el solvente y se deposita en un Beaker previamente tratado (pesado) y la diferencia de peso se obtiene la cantidad de extracto etéreo en la muestra. **Anexo 7.**

3.11.7. Determinación de lignina

La lignina es el residuo insoluble que queda al hidrolizar los carbohidratos por medio del trato de ácidos fuertes. Por ello se trabaja en materias libres de extraíble, ya que algunos extraíbles pueden permanecer insolubles al ataque ácido, la lignina es uno de los principales constituyentes de la pared celular de las fibras. **Anexo 8.**

3.11.8. Determinación de celulosa

La celulosa es el principal constituyente químico de las paredes celulares de la materia; es un carbohidrato formado por polisacárido, formando principalmente por glucosa, de modo que por su gran estructura resiste al ataque alcalino, en cambio la hemicelulosa. **Anexo 9.**

3.12. Análisis de datos

Se trabajó con un diseño estadístico completamente al azar (D.C.A.), con un arreglo factorial 2x2x2 con 3 repeticiones, es decir un diseño con tres factores de dos niveles cada uno para ver si existe relación o no entre dos variables que forman una población de datos. En base a esta relación se pueden comparar varias muestras y determinar factores limitativos, se realizaron 8 tratamientos con

tres repeticiones cada uno, la estructura del diseño se presenta en la siguiente tabla.

Tabla 6. Diseño estadístico de la investigación

Método	Temperatura	pH	Repeticiones	Parámetro a evaluar
HA	**50°C**	**5**	3	Vía adecuada para la obtención de etanol Rendimiento de Etanol Temperatura y pH ideal para la obtención de etanol
		6	3	
	60°C	**5**	3	
		6	3	
HE	**50°C**	**5**	3	
		6	3	
	60°C	**5**	3	
		6	3	

Donde:

HA: Hidrólisis alcalina

HE: Hidrólisis enzimática

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. PARAMETROS FISICOQUIMICOS IDEALES PARA LA OBTENCION DE ETANOL POR HIDRÓLISIS ALCALINA

4.1.1. Determinación de azucares reductores

La producción de azúcares reductores tienden a aumentar después del tratamiento de hidrólisis alcalina, debido a que el tratamiento con NaOH a menor concentración degrada los azucares fermentables.

Tabla 7. Cuantificación de azúcares reductores (g/L) antes de la hidrólisis alcalina

TRATAMIENTOS	MEDIA	CV
HA1(a)	18.486±0.337	1.8244%
HA2(a)	26.455±2.298	8.6873%
HA3(a)	25.256±1.268	5.0214%
HA4(a)	29.716±0.949	2.8988%

(a) Antes de la hidrólisis

Tabla 8. Cuantificación de azúcares reductores (g/L) después de la hidrólisis alcalina

TRATAMIENTOS	MEDIA	CV
HA1(d)	42.382±4.287	10.116%
HA2(d)	53.487±1.919	3.588%
HA3(d)	42.669±0.580	1.362%
HA4(d)	49.102±3.973	8.091%

(d) después de la hidrólisis

A partir de residuos agroindustriales un tratamiento con hidróxido de sodio a una concentración determinada de 0.1N, con el fin de obtener etanol celulosa y hemicelulosa que se hidrolizan por medio ácido con el objetivo de la obtención de azucares reductores que posteriormente se fermentan por medio de la levadura *Sacharomyces cerevicease* para la obtención de etanol, en la tabla 8 y 9 se observa el coeficiente de variabilidad (CV) relativamente significativa: en la obtención de azucares reductores antes de la hidrolisis (HA2) de 26.45 g/L y en la tabla 9 aumenta significativamente a 53.48 g/L en el mismo tratamiento y con un coeficiente de variabilidad (CV) de 3.58%.

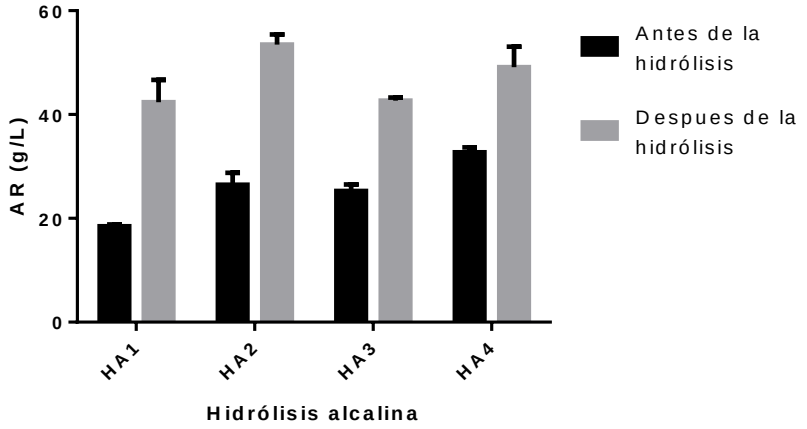


Figura 9. Comparación de tratamientos de la hidrólisis alcalina

Como se observa en la figura 9 es relativamente variable en el aumento de azucares reductores (AR) en los procesos, como se observa el de hidrólisis alcalina del tratamiento 2 (HA2) varía desde 26.45 g/L a 53.48 g/L. Esto muestra que puede haber una diferencia al cambiar el valor de pH de 5 y 6 y la temperatura de tratamiento a 50°C y 60°C, considerando el tiempo de hidrólisis de 24 horas se puede incrementar la cantidad de azucares reductores (AR).

El tratamiento realizado por (Corbin *et al*., 2015) realiza con H_2SO_4 a 1 Molar a una temperatura de 100°C de igual manera a una concentración de 0.5 Molar con una temperatura de 120°C durante una hora, atribuyen un impacto positivo sobre el valor de azucares reductores, Sin embargo, se observó que la ebullición del ácido sulfúrico provocó una disminución en la concentración de fructosa en el medio, debido a que la fructosa disminuyó al aumentar la concentración de ácido sulfúrico (concentración molar entre 0.05 y 0.2) y el tiempo de pretratamiento. Ácido en ebullición (de 30 a 240 minutos), por lo que cuando se utiliza con orujo de uva blanca, el antagonismo de este ácido sulfúrico en ebullición es particularmente importante, ya que la fructosa y la glucosa son los subproductos más abundantes.

De manera similar (Zheng et al., 2012) señalaron que el tratamiento con ácido (0,1 mol de ácido sulfúrico durante 5 minutos a 120 °C) es demasiado estricto para el orujo de vino blanco, lo que resulta en una degradación significativa del azúcar en bruto. Por lo tanto, en el estudio anterior, el orujo blanco pretratado con ácido mostró un rendimiento de etanol más bajo que el tratamiento que no estuvo expuesto al ácido sulfúrico.

4.1.2. Cuantificación de etanol por hidrólisis alcalina

Tabla 9. Cuantificación de etanol (g/L) en tratamientos de hidrólisis alcalina

TRATAMIENTOS	MEDIA	C.V
HA1	30.313±0.091	0.299%
HA2	34.610±0.625	1.835%
HA3	27.276±0.703	2.578%
HA4	29.300±0.989	3.374%

La cuantificación de etanol obtenida depende de los factores como el pH, entre más bajo sea el pH, tiende a extraerse mayor cantidad de etanol, a un pH de 6 y a una temperatura de 50°C como se observa en la Tabla **9** tiene un incremento de 34.61 g/L de etanol, se obtuvo en muestras de 200 gramos de orujo, la obtención de etanol a partir de orujo de uva se desarrolló mediante la hidrólisis alcalina con tratamiento de NaOH a 0.1 N, así mismo, el coeficiente de variación (CV) es de 1.83% el cual indica que su estimación es precisa estadísticamente, mientras tanto (Riaño et al. 2010) estudiaron que el ácido sulfúrico, en el que se hidroliza la celulosa y parte de la hemicelulosa. Esto puede descomponer los polisacáridos para destruir la matriz de lignina para liberar nuevos azúcares reductores, cabe mencionar que diferentes estudios han desarrollado el uso del orujo de vino blanco para producir etanol a través de este método de procesamiento (Bayrak, 2013; Corbin et al., 2015; Zheng et al., 2012). Con respecto a los tratamiento en los orujos de uva blanca, (Bayrak, 2013) utilizó 1 mol de ácido sulfúrico a una temperatura de 100 ° C con una proporción de sólido a líquido (g / ml) de 1:10 durante 4 horas, Por otro lado (Corbin et al., 2015) Usaron la misma proporción de sólido a líquido, pero el tiempo, la concentración de ácido y la temperatura fueron diferentes con 0.5 mol de H_2SO_4 a 121 °C durante 1 hora; y 1 mol de H_2SO_4 a 100 °C durante 3 horas, Ambos autores creen que el tratamiento con ácido tiene un efecto positivo sobre el valor de los azúcares reductores, por lo que pueden convertirse en etanol por destilación.

4.2. PARAMETROS FISICOQUIMICOS IDEALES PARA LA OBTENCION DE ETANOL POR HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

4.2.1. Determinación de azucares reductores

Tabla 10. Cuantificación de azúcares reductores (g/L) antes de la hidrólisis enzimática

TRATAMIENTOS	MEDIA	CV
HE1(a)	23.532±1.434	6.096%
HE2(a)	23.033±1.659	7.204%
HE3(a)	21.297±0.700	3.287%
HE4(a)	23.170±2.288	9.874%

(a) Antes de la hidrólisis

Como se sabe, los azúcares reductores se denominan así, a la transformación de los azúcares complejos en azucares simples, por medio de proceso químicos, en este caso de celulosa a glucosa por hidrólisis. Dicho esto los azúcares reductores se analizaron de acuerdo a cada una de la hidrolisis desarrolladas, la metodología descrita por método Dubios (Anexo 5.)

Tabla 11. Cuantificación de azúcares reductores (g/L) después de la hidrólisis enzimática

TRATAMIENTOS	MEDIA	CV
HE1(d)	48.965±1.149	2.347%
HE2(d)	48.753±3.065	6.287%
HE3(d)	52.675±2.090	3.968%
HE4(d)	56.597±1.331	2.351%

(d) después de la hidrólisis

Los resultados de la cuantificación de azucares presentes en el orujo después de la hidrólisis enzimática (tabla 10 y 11) hace comprobar una diferencia entre el orujo sin hidrólisis y después de la hidrólisis; por tanto esos azúcares que inicialmente puede llevar implícito esos residuos se ha transformado en alcohol, dando lugar después de su análisis a una cantidad menor de azucares respecto al pasar por proceso de hidrólisis enzimática, esto determino mediante el método Dubios.

Es necesario aclarar la cantidad de azúcar en el hidrolizado, que depende del hecho de que el término "azúcar reductor" incluye tanto la hexosa (azúcar que puede ser fermentada por Saccharomyces cerevisiae) como la pentosa que no puede ser fermentada por levadura. Utilizando el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), con glucosa como estándar, estos azúcares se analizaron cuantitativamente mediante espectrofotometría a 540 nm (Gil, Bocourt, & Maqueira, 2006).

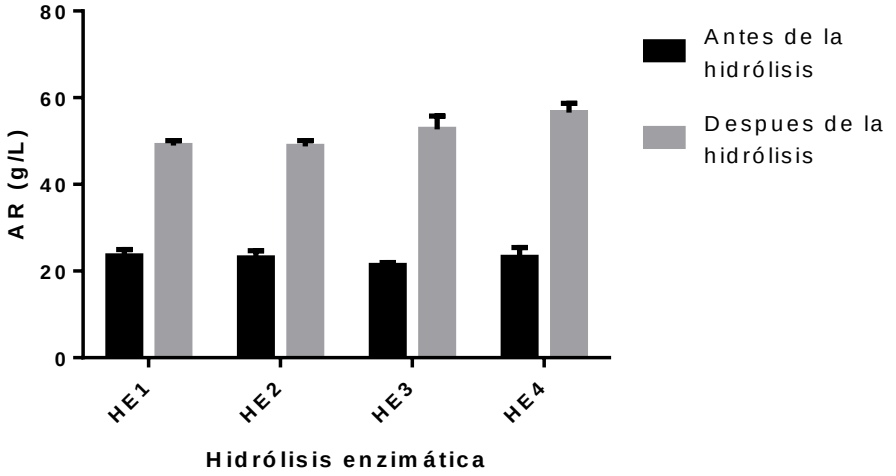


Figura 10. Comparación de tratamientos

El método utilizado para determinar los azúcares reductores permitió identificar el aumento doble de los azúcares reductores debido a la aplicación de un tratamiento enzimático expuesto a un pH de 6 y una temperatura de 60 °C.

4.2.2. Cuantificación de etanol por hidrólisis enzimática

Tabla 12. Cuantificación de etanol (g/L) en tratamientos de hidrólisis enzimática

TRATAMIENTOS	MEDIA	C.V
HE1	29.177±1.090	3.736%
HE2	32.487±0.988	3.041%
HE3	32.230±0.688	2.134%
HE4	34.653±1.062	3.066%

La cuantificación de etanol obtenida por la hidrólisis enzimática fueron de la siguiente manera utilizando enzima celulosa Cellulase from Trichoderma reseei y esto depende de los factores como el pH y la temperatura, entre más cerca de

un pH neutro, se rompen las estructuras químicas del orujo de uva y así convirtiéndose en azúcar luego con las fermentación se obtiene mayor cantidad de etanol de la solución fermentable del orujo de uva, en la tabla 13 se observa al mejor tratamiento a un pH de 6 y a una temperatura de 60°C en donde se ve un aumento de contenido de etanol a 34.653 g/L, el cual de obtuvo de un muestra de 200 gramos de orujos de uva.

La hidrólisis enzimática se suele realizar después del pretratamiento del material para descomponer los polisacáridos (Moreno, 2018), estos tratamientos aumentan la sensibilidad del material a la hidrólisis enzimática al debilitar su estructura química y capacidad de análisis enzimático (Corbin et al., 2015), luego de 12 horas de tratamiento con celulosa, el desempeño del proceso enzimático no ha mejorado, y (Bayrak, 2013) , utilizó 48 horas y 124 horas, la cual prestó atención a agregar antibióticos con anticipación para evitar una posible contaminación. Cuando se utilizaron preparaciones enzimáticas, ajustar a 37 ° C o 45 ° C según el valor de pH de la enzima y la temperatura estudiada durante la hidrólisis enzimática (Bayrak, 2013). La pectina con actividad poligalacturonasa obtenida de Aspergillus acetoides Enzimas, que van de 3 a 4,5 de pH (Foda et al., 1984).

Mientras las enzimas estudiadas para la hidrólisis de polisacáridos en orujo de uva blanca; son las celulosas (Bayrak, 2013; Corbin et al., 2015) y pectinasas (Bayrak, 2013).

4.3. RENDIMIENTO DE ETANOL

4.3.1. Hidrólisis alcalina

Tabla 13. Rendimiento de etanol (%) en tratamientos de hidrólisis alcalina

TRATAMIENTOS	MEDIA	C.V
HA1	15.730±1.182	7.51%
HA2	16.830±1.436	8.53%
HA3	16.613±1.539	9.26%
HA4	16.985±1.115	6.56%

Un tratamiento alcalino con NaOH a una concentración de 0.1N hace que se desprenda toda la celulosa del orujo de uva mediante el proceso de hidrólisis y fermentación anaeróbico con el Sacharomyces cervisiae, se logró transformar la glucosa en etanol y utilizando el proceso de destilación se obtuvo el producto, las

mejores condiciones para la hidrólisis alcalina fueron a un pH: 6 y una temperatura de 60°C, ya que presentaron el mayor rendimiento de 16.985%.

Espinosa, (2013) menciona que la hidrólisis alcalina se tiene problemas al trabajar con concentraciones y temperaturas elevadas, puesto que en los resultados de la desliginifación se evidencia, considerando que se inicia con 100 g de muestra, el rendimiento a las condiciones de 2 mol/L y 70 °C es de 35,28% en cuanto a obtención de celulosa y hemicelulosa; al aumentar la concentración y temperatura de la hidrólisis alcalina, a partir de éste punto los rendimientos se reducen, es así que al final de la combinación de parámetros establecidos se obtiene un rendimiento de 9,52% a 2,5 mol/L y 90 °C, un rendimiento demasiado bajo para ser considerado en la parte operacional.

Quintana, Pérez, & Young, (2011) mencionan que la hidrólisis ácida mostró mayor rendimiento, alcanzando un 10,33% de glucosa en comparación con la hidrólisis enzimática, que fue de 8,83%, concluyendo que es más factible la producción de bioetanol usando ácidos como catalizadores

El orujo de uva es un material de desecho que es rico en carbohidratos. La mayoría de estos carbohidratos son monosacáridos solubles (glucosa y fructosa) y polisacáridos estructuralmente complejos (pectinas, heteroxilanos, xiloglucano y celulosa). Los carbohidratos solubles se pueden convertir directamente en etanol a través de la fermentación que produce hasta 270 L/tn. Alternativamente, los rendimientos de etanol pueden aumentarse utilizando todo el material que se beneficia del pretratamiento con ácido seguido de hidrólisis enzimática. En general, estos datos sugieren que peso por peso, el orujo de uva tiene el potencial de ser un material de desecho competitivo y de valor agregado para la producción de biocombustibles, contribuyendo con hasta 400 L/t de etanol (Corbin et al., 2015).

4.3.2. Hidrólisis enzimática

Tabla 14. Rendimiento de etanol (%) en tratamientos de hidrólisis enzimática

TRATAMIENTOS	MEDIA	C.V
HE1	14.98±1.14	9.36%
HE2	17.61±0.47	2.69%
HE3	18.27±1.64	8.96%
HE4	24.97±1.64	6.57%

La obtención de etanol por el tratamiento de hidrólisis enzimática, manteniendo como fijo la concentración de enzima Celulosa y variando el pH, la temperatura. La concentración de azúcares y la cuantificación de etanol si tiene un efecto positivo que posteriormente se ve reflejado en el rendimiento de la obtención de etanol a partir de orujo de uva.

La hidrólisis enzimática tiene actualmente altos rendimientos (75–85%) y aún se proyectan mejoras (85–95%), ya que el campo de investigación es solo una década joven, la concentración da un rendimiento y una tasa bajos, y una dosis alta de celulasa puede aumentar los costos desproporcionados (Hamelinck et al., 2005).

Una dosis de celulasa de 10 FPU (unidades de papel de filtro) por gramo de biomasa se usa a menudo en estudios de laboratorio porque proporciona un perfil de hidrólisis con altos niveles de rendimiento de glucosa en un tiempo razonable (48–72 h) a una enzima razonable coste (Balat, 2011).

4.3.3. Comparación de resultados del rendimiento de los dos tratamientos

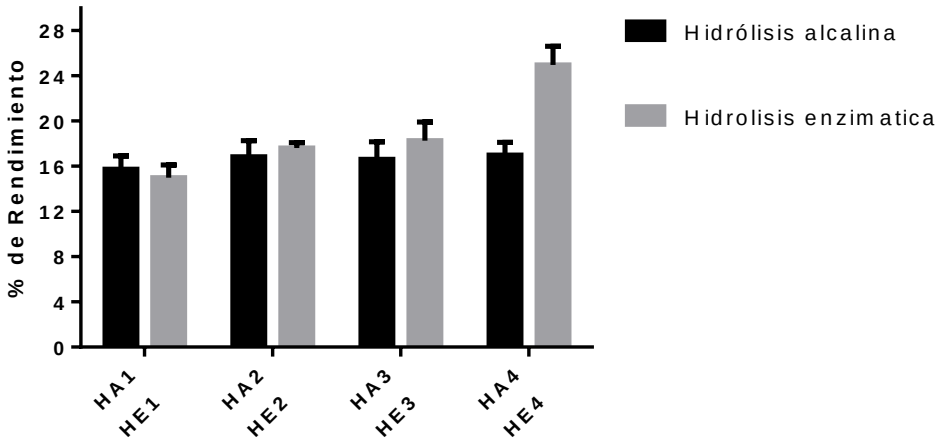


Figura 11. Comparación de datos del rendimiento de etanol obtenidos por los dos tratamientos.

La diferencia observada de los resultados obtenidos (Figura 11) es relativamente significativo entre el tratamiento realizado de la hidrolisis alcalina (16.98 % de rendimiento de etanol) e hidrolisis enzimática (24.27 % de rendimiento de etanol). El orujo de uva de desecho agroindustrial se ha comparado con otros materiales de desecho lignocelulósicos en función de la producción mundial, la relación cultivo / residuo, la composición química y el rendimiento de etanol por tonelada (Corbin et al., 2015).

V. CONCLUSIONES

El orujo de uva es un material de desecho que es rico en carbohidratos, la mayoría de estos carbohidratos son monosacáridos solubles (glucosa y fructosa) y polisacáridos estructuralmente complejos (pectinas, heteroxilanos, xiloglucano y celulosa), los carbohidratos solubles se pueden convertir directamente en etanol mediante fermentación, lo rendimientos pueden aumentarse utilizando todo el material mediante pretratamientos con hidrólisis ácidas y enzimáticas.

El tratamiento realizado con hidróxido de sodio (NaOH) a 0.1N acondicionando a los parámetros de pH: 5 y una temperatura a 50°C fueron los mejores resultados en el aumento de azúcares reductores posteriormente transformándolos en etanol mediante la destilación, el rendimiento obtenido fue 34.603 g/L de etanol por litro de solución fermentable, mediante la fermentación anaeróbica con levadura comercial *Sacharomyces cerevisiae* por 7 días se logró transformar la glucosa en etanol utilizando destilador de rotavapor.

El tratamiento enzimático desarrollado con Cellulase from Trichoderma reseei al 1.5 p/p acondicionado a una temperatura de 60°C y un pH: 6 fueron los mejores resultados en el aumento de azúcares reductores y por ende su rendimiento de etanol fue mayor obteniendo un 34.653±1.062 g/L de etanol por litro de solución fermentable a base orujo de uva y mediante la fermentación anaeróbica desarrollada a una T°: 30°C utilizando levadura comercial *Saccharomyces cerevisae*, con una maceración de 7 días se logró obtener etanol utilizando destilador de rota-vapor.

El tratamiento de los orujos de uva arrojo los mejores rendimientos de etanol como: 16.83% obteniendo de la hidrólisis alcalina, en cuanto a la hidrólisis enzimática fue de 24.97% mayor al de otro tratamiento, este resultado nos permite aceptar la hipótesis propuesta al inicio del estudio. Este estudio cree que el uso de la hidrólisis de polisacáridos puede aumentar la concentración de azúcares fermentables en el orujo de uva, aumentando así la producción de etanol.

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda buscar nuevas tratamientos destinados a mejorar la susceptibilidad del orujo de uva al posterior con ataques enzimáticos para mejorar la obtención de etanol y tener buenos rendimientos.

- Buscar nuevas variables de proceso para aumentar la producción de etanol, estas variables incluyen: pH, aireación, temperatura y fermentación, suplementación y concentración de nutrientes y enzimas.

- Evaluar el tipo de enzimas celulosas. Teniendo en cuenta que la enzima aplicada es de uso industrial.

- Optimizar los tiempos de hidrólisis para derivar la composición de los orujos de uva y así poder obtener mayores resultados de etanol.

VII. BIBLIOGRAFIA

Alvira, P., Tomás. Pejó, E., Ballesteros, M., & Negro, M. J. (2010). *Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis*: A review. *Bioresource Technology*, *101*(13), 4851–4861. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.093

Antonio, J. (2010). ARTÍCULOS: *Variedades de uva en Chile y Argentina* (1550-1850). Genealogía del torrontés. *Mundo Agrario*, *10*(20), 1–36.

Arai, T., Kosugi, A., Chan, H., Koukiekolo, R., Yukawa, H., Inui, M., & Doi, R. H. (2006). *Properties of cellulosomal family 9 cellulases from Clostridium cellulovoran*s. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *71*(5), 654–660. https://doi.org/10.1007/s00253-005-0249-6

Aro, N., Pakula, T., & Penttila, M. (2005). *Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi*, *29*, 719–739. https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.11.006

Arora, K., & Schlick, T. (2004). *Lime pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover*. *Biophysical Journal*, *87*(5), 3088–3099.

Balat, M. (2011). *Production of Bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway*: A review. *Energy Conversion and Management*, *52*(2), 858–875. https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.08.013

Bayrak, E. (2013). *Utilization of wine waste for fermentative processes*: A thesis submitted to in Food Engineering, (July), 1–13.

Bustamante, M. A., Moral, R., Paredes, C., Pérez-Espinosa, A., Moreno-Caselles, J., & Pérez-Murcia, M. D. (2008). *Agrochemical characterisation of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry*. *Waste Management*, *28*(2), 372–380. https://doi.org/10.1016/j.wasman.2007.01.013

Caffall, K. H., & Mohnen, D. (2009). *The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides*. *Carbohydrate Research*, *344*(14), 1879–1900. https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.05.021

Caranton, C. F. T. (2010). *Producción de etanol a partir de residuos del cultivo de Café.* Universidad Nacional de Colombia - SEDE Manizales.

https://doi.org/10.1016/j.pec.2012.10.009

Castaño P., H., Reales A., J. G., & Zapata M., J. (2015). *Enzymatic hydrolysis of cassava stalk pretreated with the alkaline method.* Agronomía Colombiana, *33*(2), 238–243. https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v33n2.50115

Catania, C., & Avagnina, S. (2007). *La maduración de la uva Contenidos*, 1–14.

Chandel, A. K., Chandrasekhar, G., Radhika, K., & Ravinder, R. (2011). *Bioconversion of pentose sugars into ethanol* : A review and future directions, (February).

Corbin, K. R., Hsieh, Y. S. Y., Betts, N. S., Byrt, C. S., Henderson, M., Stork, J., … Burton, R. A. (2015). *Grape marc as a source of carbohydrates for bioethanol: Chemical composition, pre-treatment and saccharification*. *Bioresource Technology*, *193*, 76–83. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.030

Cuervo, L., Folch, J., & Quiroz, R. (2009). *Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol*. *BioTecnología*, *13*(3), 11–25. https://doi.org/10.4018/ijcvip.2011040105

Cury R, K., Aguas M, Y., Martinez M, A., Olivero V, R., & Chams Ch, L. (2017). *Residuos agroindustriales su impacto, manejo y aprovechamiento*. *Revista Colombiana de Ciencia Animal - RECIA*, *9*(S), 122. https://doi.org/10.24188/recia.v9.nS.2017.530

Detns, R. C., Taken, S., Co, F. S., Smith, F., Co, C., Titrim-, F., … Lopes, F. C. (2002). *Pesquisa Nacional de Saneamento Básico 2008*. *Bioresource Technology*, *66*(3), 506–577. https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.506

Detroy, R. W., & St Julian, G. (1982). *Biomass conversion: Fermentation chemicals and fuels*. *Critical Reviews in Microbiology*, *10*(3), 203–228. https://doi.org/10.3109/10408418209113563

Díaz, A. B., Caro, I., de Ory, I., & Blandino, A. (2007). *Evaluation of the conditions for the extraction of hydrolitic enzymes obtained by solid state fermentation from grape pomace*. Enzyme and Microbial Technology, *41*(3), 302–306. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.02.006

Dien, B., Cotta, M., & Jeffries, T. (2003). *Bacteria engineered for fuel ethanol*

production : Current Status Bacteria engineered for fuel ethanol production : current status. Applied Microbiology and Biotechnology, (May 2014), 258–266. https://doi.org/10.1007/s00253-003-1444-y

Domínguez Domínguez, M. M., Alvarez-Castillo, A., Castrejón-Rosales, T., Granados Baeza, M. J., Hernández Campos, F. J., Alcalá Octaviano, V. H., & Tapia Picazo, J. C. (2011). *Estudio de la cinética de la hidrólisis ácida de bagazo de caña de azúcar sin pretratamiento para la obtención de azúcares reductore*s. Revista Iberoamericana de Polímeros, *12*(3), 153–159. Retrieved from http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3694933&info=resumen&idioma=SPA

Espinosa, F. J. (2013). *Obtención de etanol mediante hidrólisis alcalina, enzimática y fermentación a partir del excedente orgánico del banano variedad Musa paradisiaca.* Journal of Chemical Information and Modeling, *53*, 1689–1699. https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004

Flanzy, C. (2002). Enologia : *Fundamentos Cientificos Y Tecnologico*s, (Isbn 9788484760740), 79497.

Foda, M. S., Rizk, I. R., Gibriel, A. Y., & Basha, S. I. (1984). *Biochemical properties of polygalacturonase, produced by aspergillus aculeat us and mucor pusillus. Zentralblatt Für Mikrobiologie*, *139*, 463–469. https://doi.org/10.1016/S0232-4393(84)80025-6

Galbe, M., & Zacchi, G. (2002). *A review of the production of ethanol from softwood.* Applied Microbiology and Biotechnology, *59*(6), 618–628. https://doi.org/10.1007/s00253-002-1058-9

Gil, B., Bocourt, C., & Maqueira, D. (2006). *Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el metodo del acido 3,5 dinitrosalicilic*o. Instituto Cubano de Investigaciones de Los Derivados de La Caña de Azúcar Cuba, *XL*, 45–50.

Gómez, J. M. (2016). *Análisis de la variación de la eficiencia en la producción de biocombustibles en América Latina*, *32*(21), 120–126.

Gregg, D. J., & Saddler, J. N. (1996). *Factors affecting cellulose hydrolysis and the potential of enzyme recycle to enhance the efficiency of an integrated wood*

to ethanol process. Biotechnology and Bioengineering, *51*(4), 375–383. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19960820)51:4<375::AID-BIT1>3.0.CO;2-F

Hamelinck, C. N., Van Hooijdonk, G., & Faaij, A. P. C. (2005). *Ethanol from lignocellulosic biomass: Techno-economic performance in short-, middle- and long-term*. Biomass and Bioenergy, *28*(4), 384–410. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2004.09.002

J. Ventura Sobrevilla, Boone villa, Daniel, R. Rodriguez, J. . M. H. (2015). *Microbial biosynthesis of enzymes for food applications.* DIA-UAdeC, Shcool of Chemistry, Universidad Autónoma de Coahuila, Saltillo, México., (December). https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-285-3.00004-1

Kassim, E. A., & El-Shahed, A. S. (1986). Enzymatic and Chemical hydrolysis of certain cellulosic materials. *Agricultural Wastes*, *17*(3), 229–233. https://doi.org/10.1016/0141-4607(86)90097-1

Keshwani, D. R., & Cheng, J. J. (2009). *Switchgrass for bioethanol and other value-added applications:* A review. Case Studies for Integrating Science and the Global Environment, *100*(4), 495–505. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.09.035

Leopold, L. F., Leopold, N., Diehl, H. A., & Socaciu, C. (2011). *Quantification of carbohydrates in fruit juices using FTIR spectroscopy and multivariate analysis*. Spectroscopy, *26*(2), 93–104. https://doi.org/10.3233/SPE-2011-0529

Linares, D. J. A. (2018). *Producción de bioetanol a partir de subproductos de la industria vitivinícola* .

Machado, C. (2010). *Situación de los Biocombustibles de 2da y 3era Generación en América Latina y Caribe*. Organización Latinoamericana de Energía, 88. Retrieved from http://www.bivica.org/upload/biocombustibles-situacion.pdf

Malavika, S., & Selvam, K. (2015). *Reduction of dimensionality for high dimensional data using correlation measures*. Global Journal of Pure and Applied Mathematics, *11*(1), 107–111. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.03.003

Martínez, J. A., Montoya, N., & Sierra, M. (2014). *The energy of the future: Bioalcohols from urban solid residuals (USR*). Revista EAN, (77), 64–81. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-81602014000200003&lng=en&nrm=iso&tlng=es

Mateus, Lady, Hernández, O., Velásquez, M., & Días, J. de J. (2012). *Evaluación del pretratamiento con ácido sulfúrico diluido del pasto maralfalfa para la producción de etanol.* Revista Colombiana de Biotecnología, *14*(1), 146–156. Retrieved from http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v14n1/v14n1a13.pdf

Mejia, S. m., Espinal, J. F., & Mondragón, F. (2006). *Estudio Del Azeotropo Etanol-Agua. Caracterización Molecular De Dímeros De Etanol, Heterodímeros Y Heterotrímeros De Etanol-Agua.* Revista Energetica, 36, 5–18. Retrieved from http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=147019426001

MINAGRI. (2017). *Moquegua: Anuario estadístico agropecuario 2017 presentacion La Gerencia Regional de Agricultura Moquegua*, 179. Retrieved from http://www.agromoquegua.gob.pe/doc/anuarios/ANUARIO_ESTADISTICO_AGROPECUARIO_2017_OK.pdf?fbclid=IwAR140Bh50sch53iJnL1NM9hC_Oqs5Hmxx2_nL_Q1foyiSX0XMclhUvJus6U

MINAGRI. (2018). *Anuario estadístico agropecuario 2018* (1), Región de Agricultura Moquegua.

Mitić, M. N., Souquet, J. M., Obradović, M. V., & Mitić, S. S. (2012). *Phytochemical profiles and antioxidant activities of Serbian table and wine grapes*. Food Science and Biotechnology, *21*(6), 1619–1626. https://doi.org/10.1007/s10068-012-0215-x

Moreno, L. A. De. (2018). *Cinética de la hidrólisis ácida de bagacillo de caña de azúca*r, (November).

Mosier, N., Hendrickson, R., Ho, N., Sedlak, M., & Ladisch, M. R. (2005). *Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover.* Bioresource Technology, *96*(18 SPEC. ISS.), 1986–1993. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.01.013

Muñoz, M. D., Pantoja, M. A. J., & Cuatin, G. M. F. (2014). *Aprovechamiento de*

residuos agroindustriales como biocombustible y biorefineria. Biotecnología En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial, 12(2), 10–19.

NFPA, N. (2007). ALCOHOL ETíLICO.

Otero-pareja, M. J., Casas, L., Fernández-ponce, M. T., Mantell, C., Martínez, E. J., & Ossa, D. (2015). *Green Extraction of Antioxidants from Different Varieties of Red Grape Pomace*, 9686–9702. https://doi.org/10.3390/molecules20069686

Paradelo, R., Moldes, A. B., & Barral, D. G. M. T. (2008). *Evaluación de compost y vermicompost de orujo agotado de uva como componentes de sustratos,* 675–680.

Pike, R. W., & Hertwig, T. A. (2008). *Integrating Biomass Feedstocks into Chemical Production Complexes using New and Existing Processes* by, *70803*(225).

Quintana, J., Pérez, J., & Young, H. (2011). *Obtención de etanol a partir de residuos de poda , mediante hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática ethanol from waste of pruning by acid hydrolysis and enzymatic hydrolysis*, 111–116.

Rezaei, F., Richard, T. L., & Logan, B. E. (2008). *Enzymatic hydrolysis of cellulose coupled with electricity generation in a microbial fuel cell*. Biotechnology and Bioengineering, 101(6), 1163–1169. https://doi.org/10.1002/bit.22015

Rivas, S. (2014). *Valorización de hemicelulosas de biomasa vegetal.* https://doi.org/10.1038/nrmicro1286

Ruales-salcedo, A. V., Rojas-gonzález, A. F., & Cardona-alzate, C. A. (2017). Obtención de compuestos fenólicos a partir de residuos de uva isabella (*Vitis labrusca*), (2), 72–79.

Ruberto, G., Renda, A., Amico, V., & Tringali, C. (2008). *Volatile components of grape pomaces from different cultivars of Sicilian Vitis vinifera L. Bioresource* Technology, 99(2), 260–268. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.12.025

Sánchez, Ó. J., & Cardona, C. A. (2008). *Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks.* Bioresource Technology, 99(13), 5270–5295. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.013

Sánchez Riaño, A. M. ., & Gutiérrez Morales, A. I.; Muñoz Hernández, J. A. y

Rivera Barrero, C. A. (2010). *Bioethanol Production from agroindustrial lignocellulosic byproducts*. Tumbaga., 61–91.

Sarkar, N., Ghosh, S. K., Bannerjee, S., & Aikat, K. (2012). *Bioethanol production from agricultural wastes*: An overview. Renewable Energy, 37(1), 19–27. https://doi.org/10.1016/j.renene.2011.06.045

Senderos, C. R., & Regueiro, C. (2014). *Producción de Bio-Etanol por fermentación en estado sólido sobre orujos de uva y remolacha azucarera.*, 10–14.

Silverstein, R. A., Chen, Y., Sharma-Shivappa, R. R., Boyette, M. D., & Osborne, J. (2007). *A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks.* Bioresource Technology, 98(16), 3000–3011. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.10.022

Soto, M. L., Moure, A., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2008). *Charcoal adsorption of phenolic compounds present in distilled grape pomace.* Journal of Food Engineering, 84(1), 156–163. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.04.030

Sun, Y., & Cheng, J. (2002). *Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production*: a review, *83*, 1–11. https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7

Taherzadeh, M. J., & Karimi, K. (2008). *Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production:* A review. International Journal of Molecular Sciences (Vol. 9). https://doi.org/10.3390/ijms9091621

Taherzadeh, M. J., & Karimi, K. (2015). *Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials*: a review. Bioreaources, *2*(2007), 472–499.

Talebnia, F., Karakashev, D., & Angelidaki, I. (2010). *Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation*. Bioresource Technology, 101(13), 4744–4753. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.080

Ten, E., & Vermerris, W. (2013). *Functionalized polymers from lignocellulosic biomass*: State of the art. Polymers, *5*(2), 600–642. https://doi.org/10.3390/polym5020600

Torres, C. L., Chamache, P. F., León, J. M., Barragan, J. A., Vásquez, C. B., Alva, E. M., … Polo, F. V. (2015). *Extracción de Azúcares Reductores Totales "ART" de "coronta" de Zea mays "maíz amarillo duro.*" Ucv-Scientia, 3(2), 214–218.

Vidal, S.;Williams,P.;O´Neill,M.A.; Pellerin, P. (2001). *Polysaccharides from grape berry cell walls. Part I: tissue distribution and structural characterization of the pectic polysaccharides.* Carbohydrate Polymers, 45(4), 315–323. https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00285-X

Villalobos Cortínez, V. A. (2010). *Comparación De Pretratamientos En Residuos Forestales Para La Producción De Bioetanol De Segunda Generació*n: Hidrólisis Ácida Y Líquidos Iónicos. *Victoria*, 122.

Yineth Piñeros, Á. M. O. a. (2009). Pretratada con naocl , mediante hidrólisis y fermentación simultáneas, (22), 2005.

Zheng, Y., Lee, C., Yu, C., Cheng, Y. S., Simmons, C. W., Zhang, R., … Vandergheynst, J. S. (2012). *Ensilage and bioconversion of grape pomace into fuel ethanol*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60(44), 11128–11134. https://doi.org/10.1021/jf303509v

Zhou, J., Wang, Y. H., Chu, J., Zhuang, Y. P., Zhang, S. L., & Yin, P. (2008). *Identification and purification of the main components of cellulases from a mutant strain of Trichoderma viride T 100-14*. Bioresource Technology, 99(15), 6826–6833. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.01.077

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Tabla 15. Operacionalización de variables

PROBLEMA	OBJETIVO	HIPOTESIS	VARIABLE DE ESTUDIO	VARIABLE DE RESPUESTA
¿Cuál es el efecto de Temperatura y pH en la obtención de etanol a partir de orujo de uva (*Vitis vinífera L.)* por vía hidrólisis alcalina e hidrólisis enzimática?	Aprovechar el orujo de uva (Vitis vinífera L.) para obtener etanol por vía hidrólisis alcalina e hidrólisis enzimática.	Si afecta la temperatura y pH en la obtención de etanol a partir de orujo de uva por vía hidrólisis alcalina e hidrólisis enzimática.	Durante el proceso de obtención de etanol: Temperatura: T_1 : 50°C T_2 : 60°C Potencial de hidrogeno pH_1 : 5 pH_2 : 6	-Vía adecuada para la obtención de etanol -Rendimiento (%) -Grado alcohólico (%) -Alcoholes superiores (metanol, Propanol)
¿Cuál es la temperatura y pH óptimo para la obtención de etanol a partir de orujo de uva (*Vitis vinífera L.)* por vía hidrólisis alcalina?	Determinar los parámetros fisicoquímicos (pH, Temperatura) ideal en el proceso de hidrólisis alcalina utilizando orujo de uva.	Los parámetros de T° y pH son factores determinantes para la obtención de etanol por vía hidrólisis alcalina.		
¿Cuál es la temperatura y pH óptimo para la obtención de etanol a partir de orujo de uva (*Vitis vinífera L.)* por vía hidrólisis enzimática?	Determinar los parámetros fisicoquímicos (pH, Temperatura) ideal en el proceso de hidrólisis enzimática utilizando orujo de uva.	Los parámetros de temperatura y pH son factores determinantes para la obtención de etanol por vía hidrólisis enzimática.		
¿Cuál de las vías de hidrólisis permite obtener mayor rendimiento de etanol obtenido del orujo de uva?	Determinar el rendimiento de etanol obtenido por medio de los dos procesos.	El proceso por vía hidrólisis enzimática permite obtener mayor rendimiento de obtención de etanol.		

Anexo 2. Determinación de pH

DETERMINACIÓN DE pH

El valor de pH representa el menos logaritmo en base diez de la concentración (Actividad) de iones hidrógeno [H^+].

Materiales

- Matraz Erlenmeyer de 200 ml
- Balanza analítica
- pH-metro
- Papel secador

Procedimiento

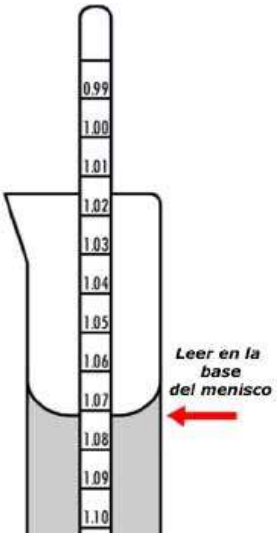
- Se tomó 10 ml de muestra
- Luego se colocó con el pH-metro y esperar hasta que se estabilice.
- Registrar la lectura que indica en pH-metro.

Anexo 3. Determinación de grado alcohólico

DETERMINACIÓN DE GRADO ALCOHÓLICO

Principio:

"**Grado alcohólico**" o porcentaje en volumen de alcohol etílico.



Cuando haya recogido unos 40 ml de destilado en la probeta, apague la placa calefactora y añada agua al destilado hasta alcanzar 80 ml de volumen total e

introduzca un densímetro (aparato que compara densidades de líquidos en aplicación del principio de Arquímedes) para medir su densidad.

Anexo 4. Determinación de rendimiento

CALCULO DEL RENDIMIENTO DE ALCOHOL OBTENIDO

El rendimiento del proceso se calcula con la relación entre el peso obtenido de los productos y la cantidad de materia prima utilizada como se muestra en la siguiente ecuación.

$$\%R = \frac{Alcohol\ obtenido\ (g)}{Residuo\ (g)}\ x\ 100$$

Donde:

%R: Rendimiento total

Determinación de masa de alcohol obtenido

m= 30.35 (g/L)*176 mL/1000mL = 5.3416 g

$$\%R = \frac{5.3416\ g}{32.38\ g}\ x\ 100$$

Tratamientos	Q (g/L)	Volumen obtenido (mL)	masa del etanol	Rendimiento
HA1-01	30.35	176	5.342	16.497
HA1-02	30.38	174	5.286	16.325
HA1-03	30.21	154	4.652	14.368
HA2-01	35.24	165	5.815	17.957
HA2-02	33.97	145	4.926	15.212
HA2-03	34.62	162	5.608	17.321
HA3-01	26.52	186	4.933	15.234
HA3-02	27.4	193	5.288	16.332
HA3-03	27.91	212	5.917	18.273
HA4-01	29.82	198	5.904	18.235
HA4-02	28.16	185	5.210	16.089
HA4-03	29.92	180	5.386	16.632

Tratamientos	Q (g/L)	Volumen obtenido (mL)	masa del etanol	Rendimiento
HE1-01	30.39	175	5.318	16.424
HE1-02	28.28	156	4.412	13.625
HE1-03	28.86	167	4.820	14.885
HE2-01	32.67	180	5.881	18.161
HE2-02	31.42	179	5.624	17.369
HE2-03	33.37	168	5.606	17.314
HE3-01	32.85	195	6.406	19.783
HE3-02	31.49	170	5.353	16.533
HE3-03	32.35	185	5.985	18.483
HE4-01	34.04	250	8.510	26.282
HE4-02	34.04	220	7.489	23.128
HE4-03	35.88	230	8.252	25.486

Anexo 5. Determinación de azúcares reductores

CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES TOTALES SEGÚN EL METODO DUBOIS (Método Fenol-sulfúrico)

Reactivos

- Fenol
- Ácido sulfúrico concentrado 96.7%
- Glucosa Grado analítica
- Agua destilada

Materiales y equipos

- 1 Balón aforado de 25 ml
- 1 balón aforado de 100 ml
- 40 tubos de ensayo 20 ml
- 1 Micropipeta de 100 uL
- 1 Micropipeta de 500 uL
- 1 Micropipeta de 1000 uL
- 1 Micropipeta de 5000 uL
- 1 Beacker 600 ml
- Espectrofotómetro UV – visible
- Mezclador vortex
- Varilla de agitación
- Succionador
- Balanza analítica

- Campana extractora de gases
- Hielo

Preparación de soluciones

- Preparación de la solución de Fenol al 5% (p/v)

Se pesó 1.25 g de fenol y se disolvieron en agua destilada en una balón de aforo de 25 ml, esta solución se preparó en la cámara de extracción de gases y vapores tóxicos.

- Preparación del Stock de Glucosa (400 ug/ml)

Se pesó 0.04 g de glucosa y se disolvió en agua destilada en un balón de aforo de 100 ml

- Preparación de estándares para la curva patrón

Se colocó los tubos de ensayo previamente etiquetados en una gradilla siguiendo el orden STD1, STD2, STD3, STD4, STD4, STD5.

Para la preparación de los estándares se colocan las respectivas soluciones a las concentraciones indicadas en la tabla.

Dilución	**STD1**	**STD2**	**STD3**	**STD4**	**STD5**
Stock de azúcar (400 ug/mg)	0	10	20	30	40
uL de H_2O destilada	2000	1990	1980	1970	1960

Procedimiento Experimental

- Se añadió a cada tubo de ensayo 1000µL de la solución de fenol antes preparada al 5 %, incluyendo al blanco y 5 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado 96 %, en esta etapa se mostró una coloración amarillenta indicando la presencia de azúcares.

- Se introdujeron los tubos de ensayo en agua con hielo por 2 min, para disminuir la temperatura dada que la reacción producido entre el fenol y ácido sulfúrico.

- Una vez cumplido el tiempo se realizó las lecturas de los estándares en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm, los resultados obtenidos se utilizaron para realizar la curva de calibración, se muestran las lecturas de estos estándares y la curva de calibración obtenida.

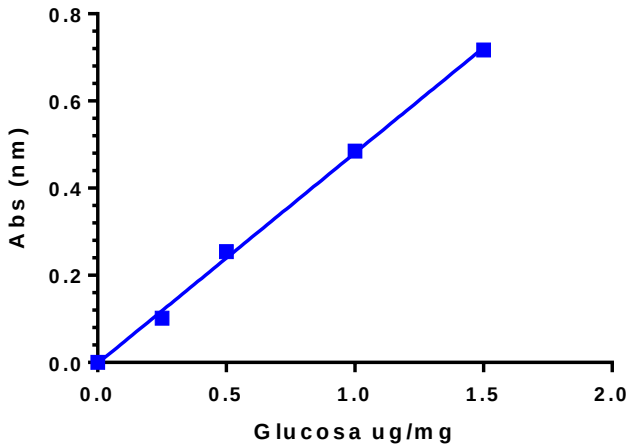


Figura 12. Curva de calibración

Ecuación: $Y = 0.4830 * X - 0.002328$

Cuantificación de la concentración de Azúcares Totales en muestras hidrolizadas.

El procedimiento a seguir para la cuantificación de los azúcares totales fue del mismo modo con el cual se realizó la curva de calibración, con la diferencia que se sustituyó la solución de glucosa por cada una de las muestras hidrolizadas.

Para la preparación de la muestra se tomaron 2 ml de cada uno de los diez hidrolizados para llevarlos a centrifugación durante 10 minutos a 3,500 rpm con el objetivo de separar sedimentos, de este centrifugado se pipeteo 1 ml, el cual se diluyo en 100 ml de agua destilada aforándola en un balón. 1 ml de Fenol al 5% y 5 ml de Ácido sulfúrico concentrado, la cuantificación se realizó por duplicado y las lecturas por triplicado.

Tabla 16. Lecturas realizadas con el espectrofotómetro a 490 mn

Tratamientos	HIDROLISIS ALCALINA		HIDROLISIS ENZIMATICA	
	Antes	Después	Antes	Después
HA1-01	0.482	1.252	0.583	1.297
HA1-02	0.491	1.108	0.637	1.278
HA1-03	0.5	1.026	0.657	1.338
HA2-01	0.639	1.121	0.598	1.549
HA2-02	0.791	1.152	0.662	1.487
HA2-03	0.811	1.136	0.577	1.488
HA3-01	0.643	1.464	0.583	1.205
HA3-02	0.663	1.444	0.546	1.356
HA3-03	1.109	1.367	0.569	1.335
HA4-01	0.9	1.201	0.663	1.417
HA4-02	0.852	1.413	0.638	1.342
HA4-03	0.62	1.31	0.547	1.451

Tabla 17. Cálculo de la concentración de azúcares totales en las muestras hidrolizadas.

Tratamiento	Promedio de lectura	[AR] (ug/ml)	Diluciones (ug/mL) FD=5	[AR] (g/L)	[AR] (g/L) en (362 ml)
HA1a	0.491	10.213	51.066	0.051	**18.486**
HA2a	0.703	14.616	73.081	0.073	**26.455**
HA3a	0.672	13.954	69.769	0.070	**25.256**
HA4a	0.871	18.088	90.438	0.090	**32.739**
HA1d	1.129	23.415	117.077	0.117	**42.382**
HA2d	1.136	23.574	117.871	0.118	**42.669**
HA3d	1.425	29.551	147.754	0.148	**53.487**
HA4d	1.308	27.128	135.642	0.136	**49.102**
HE1a	0.626	13.001	65.007	0.065	**23.532**
HE2a	0.612	12.725	63.627	0.064	**23.033**
HE3a	0.566	11.766	58.830	0.059	**21.297**
HE4a	0.616	12.801	64.006	0.064	**23.170**
HE1d	1.304	27.052	135.262	0.135	**48.965**
HE2d	1.508	31.269	156.346	0.156	**56.597**
HE3d	1.299	26.935	134.676	0.135	**48.753**
HE4d	1.380	28.609	143.043	0.143	**51.782**

Anexo 6. Cuantificación de etanol (g/L) por cromatografía de gases

CUANTIFICACIÓN DE ETANOL POR CROMATOGRAFÍA DE GASES

La cromatografía de gases (GC) es la técnica analítica de separación de compuestos que permite la identificación, purificación y cuantificación de los componentes fundamentado en las diferencias de volatilidad y solubilidad de la mezcla de los solutos a separar. Está técnica ofrece mejor poder de resolución para compuestos orgánicos volátiles siendo considerada como una de las técnicas más sensibles. Su principal limitación se encuentra en labilidad térmica de los analitos, los cuales deben ser estables a la temperatura requerida para su volatilización.

En la cromatografía de gases la fase móvil es un gas, mientras que la fase estacionaria puede ser: (a) un sólido adsorbente, o (b) un líquido retenido en un soporte solido (columna empaquetada) o en las paredes de un capilar (columna capilar). Los componentes básicos de un cromatógrafo de gases son:

- Sistema neumático
- Gas portador
- Filtros de oxígeno y humedad
- Inyector
- Columna cromatográfica
- Horno de la columna
- Sistema de detección
- Sistema informático

Sistema neumático. Está compuesto por los gases que alimentan al sistema cromatográfico, manómetros y válvulas reguladoras de los cilindros de gas. Los manómetros y válvulas que controlan y regulan la entrada de los gases al sistema. La presión interna de un cilindro de gas suele estar por encima de 200 lbs/ pulg2 (psi), y debe ser reducido a las presiones de entrada que están entre 10 psi y 50 psi.

Gas portador. Los gases portadores que se usan comúnmente son: helio, nitrógeno y el hidrogeno. El grado de pureza de estos gases debe ser de 99,99% (Barquero Quirós, 2006).Este grado de pureza asegura que no haya impurezas que originan ruido en la línea base, causando a su vez una disminución de la sensibilidad y los límites de detección de la separación.

La función del gas portador es la de transportar el analito a través de la fase estacionaria por lo que deberá ser inerte tanto con el analito como con la fase estacionaria de la columna.

Filtros de oxígeno. El sistema de filtros de purificación de gases proporciona gases más puros y reduce el riesgo de que la columna sufra daños produciendo una pérdida de sensibilidad y precisión en el cromatógrafo de gases y que este se quede inactivo. (Agilent, 2001). Los principales agentes que deben filtrarse son oxígeno, agua e hidrocarburos.

Inyector. La precisión de la inyección depende de la velocidad de inyección y la cantidad de muestra inyectada. Los volúmenes de inyección son típicamente muy pequeños (del orden de µl) por lo que se usan micro jeringas. La temperatura de inyección debe ser lo suficientemente elevada como para volatilizar todos los componentes de la muestra, no debiéndose elevar más allá de este nivel para evitar posibles descomposiciones térmicas de la muestra. Al inyectar lentamente, las bandas se ensanchan y la resolución es mala. En algunos equipos se dispone de automuestradores automáticos que reducen los errores de precisión.

Algunos inyectores pueden funcionar en el denominado modo split/splitless (división/sin división). En el modo división (Split) la muestra se divide antes de entrar en la columna y se aplica para muestras muy concentradas para evitar sobrecarga de muestra en la columna. En el modo sin división (splitless) toda la muestra se inyecta en la columna.

Columna cromatográfica. La columna es el componente esencial del cromatógrafo ya que es donde se produce la separación de los solutos, en esta se encuentra la fase estacionaria (liquida o solida). Actualmente se emplean columnas capilares que son rápidas y eficientes, con mejor resolución, menores tiempos de análisis, y mayor sensibilidad a pequeñas cantidades de analito. La longitud de las columnas varía de longitud desde 2 metros hasta 100 metros y suelen estar enrolladas a fin de que encajen en el horno. El material de las columnas es de acero inoxidable, vidrio, sílice fundida o teflón. Las columnas capilares de sílica fundida son muy frágiles, por lo que están recubiertas de poliimida.

Horno de la columna. La temperatura de la columna es una variable importante por lo que la columna normalmente se introduce dentro de un horno termostatizado. La temperatura óptima de la columna depende del punto de

ebullición de las muestras y el grado de separación necesario. En el caso de muestras complejas se utiliza un programa de rampas de temperatura para lograr la separación de los componentes de la muestra.

El horno de la columna consta de un sistema de flujo de aire adecuado que permita el rápido calentamiento y enfriamiento del horno.

Sistemas de detección. Una vez separado los componentes de la muestra en la columna, estos pasan por un sistema de detección que origina una señal proporcional a la cantidad de soluto (Anzano, 2002). Independiente del tipo de detector, su temperatura siempre debe ser más elevada que la máxima temperatura de trabajo a que se someta la columna, con el fin de evitar que se puedan condensar en el detector compuestos eluidos de baja volatilidad. El detector utilizado en el presente trabajo es el detector de ionización a la llama (FID), el cual se describe a continuación.

Detector de ionización de llama (FID). El funcionamiento del FID se basa en la acción de una flama de hidrógeno/ aire sobre la muestra que sale de la columna. Las moléculas orgánicas que atraviesan la flama se rompen y se produce iones, los cuales son colectados en un electrodo parcial y produce una señal eléctrica. El FID es extremadamente sensible en un amplio rango dinámico. La respuesta del FID se basa en el número de carbonos y otros elementos como halógenos.

Sistema informático. El sistema informático incorporado al cromatógrafo recibe la señal generada en el detector y la traduce en información digital que permite el tratamiento computarizado de los datos, incluyendo la integración del área del pico cromatográfico y la medición del tiempo de retención de los analitos.

Curva de calibración de etanol

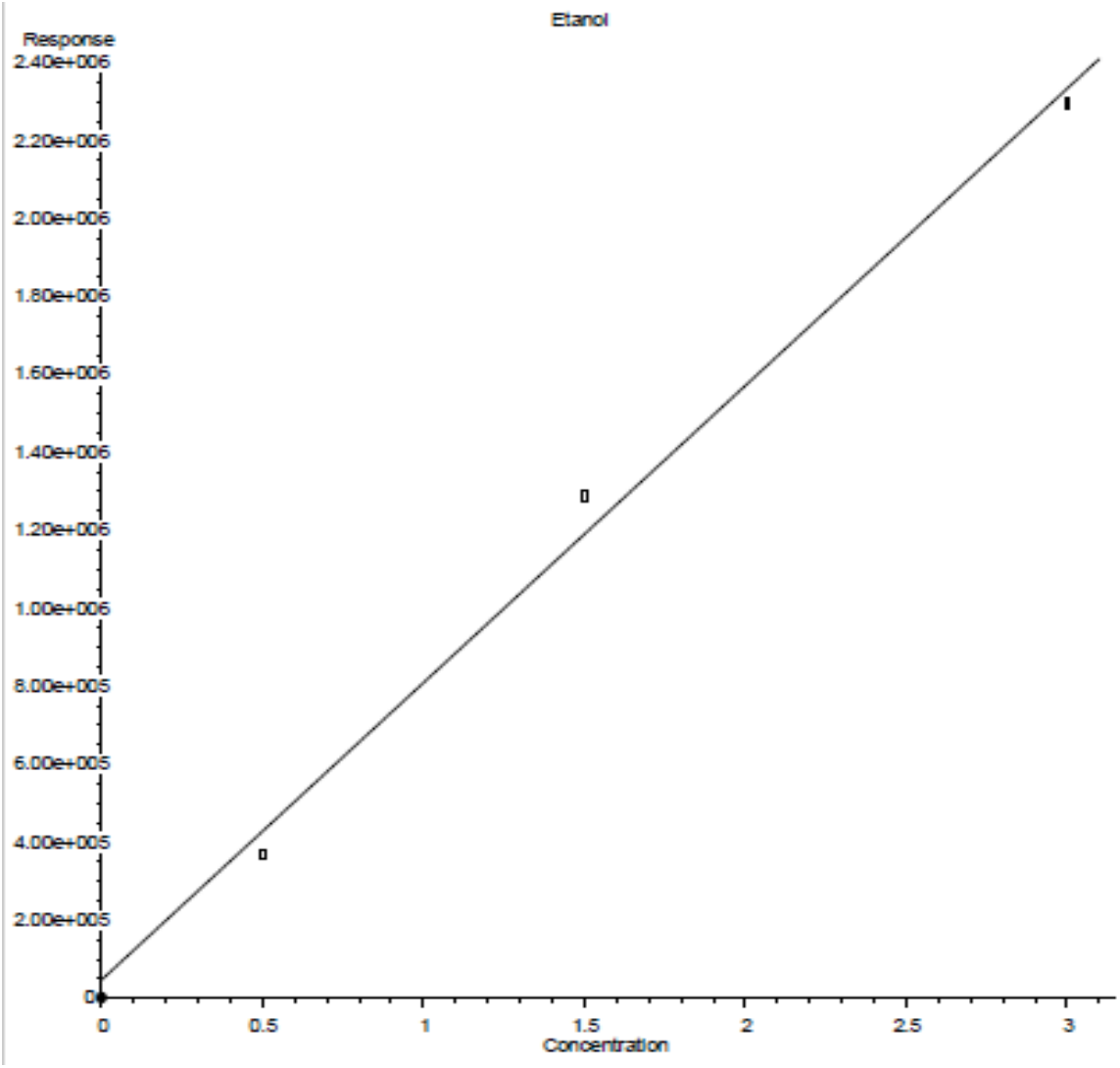


Figura 13. Curva de calibración de etanol

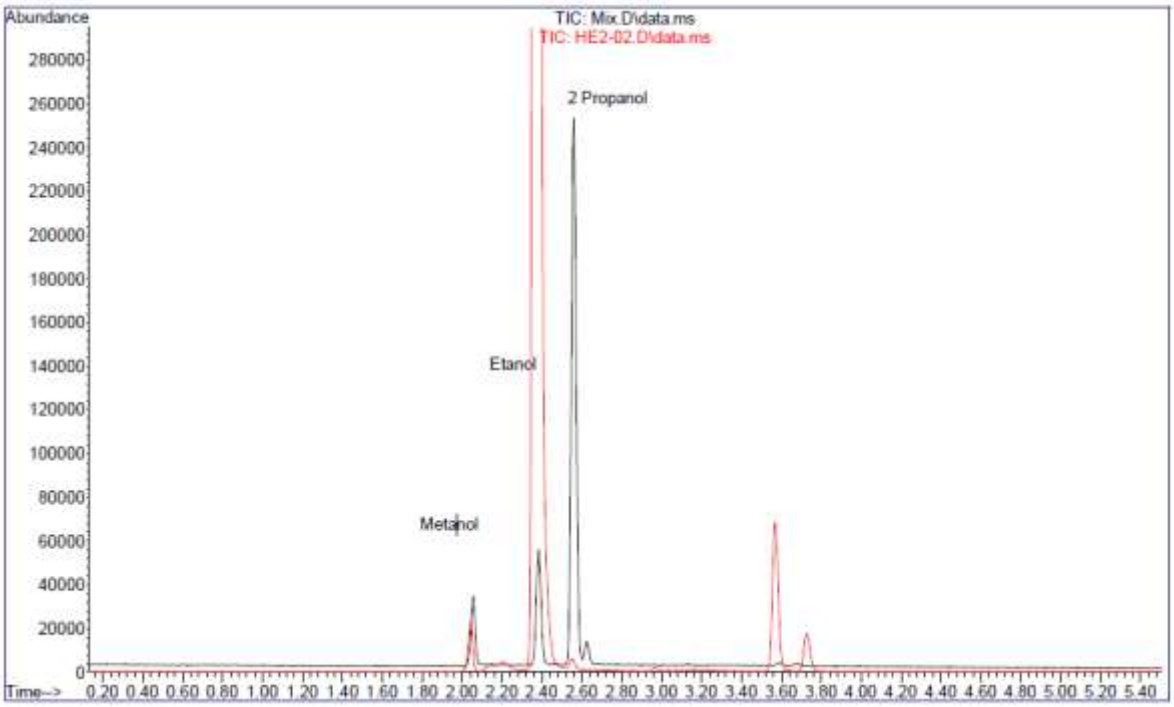


Figura 14. Comparación con estándar

Tabla 18. Lecturas realizadas de cuantificación de etanol por cromatografía para hidrólisis alcalina

			Tratamientos	Q (etanol)	Q (etanol) con base seca
HA	**T°: 50°C**	**PH: 5**	HA1-01	30.35	94.255
			HA1-02	30.38	94.348
			HA1-03	30.21	93.820
		PH: 6	HA2-01	35.24	109.441
			HA2-02	33.97	105.497
			HA2-03	34.62	107.516
	T°: 60°C	**PH: 5**	HA3-01	26.52	82.360
			HA3-02	27.40	85.093
			HA3-03	27.91	86.677
		PH: 6	HA4-01	29.82	92.609
			HA4-02	28.16	87.453
			HA4-03	29.92	92.919

Tabla 19. Lecturas realizadas de cuantificación de etanol por cromatografía para hidrólisis enzimática

			Tratamientos	Q (etanol)	Q (etanol) con base seca
HE	T°: 50°C	PH: 5	HE1-01	30.39	94.379
			HE1-02	28.28	87.826
			HE1-03	28.86	89.627
		PH: 6	HE2-01	32.67	101.460
			HE2-02	31.42	97.578
			HE2-03	33.37	103.634
	T°: 60°C	PH: 5	HE3-01	32.85	102.019
			HE3-02	31.49	97.795
			HE3-03	32.35	100.466
		PH: 6	HE4-01	34.04	105.714
			HE4-02	34.04	105.714
			HE4-03	35.88	111.429

Anexo 7. Determinación de extractivos totales

DETERMINACION DE EXTRACTIVOS TOTALES (ANSI /ASTM 01105:56)

Equipos y materiales

- Equipo de extracción soxhelt
- Dedales de porosidad media
- Balanza analítica sensible 0.1mg
- Horno para secado
- Desecadora
- Pinzas

Reactivos

- Agua destilada
- Etanol 96 – 96% etanol absoluto
-

Procedimiento

- Se coloca en un dedal 10 g de la muestra previamente tamizada al 4 mm y con humedad determinada.

- Se mide en una probeta 100 ml de etanol 300 ml de hexano
- Luego se deposita la mezcla etanol- hexano en un balón de ebullición de 500 ml
- Se arma el montaje del equipo soxhelt, depositando los 10 gramos de muestra en el dedal, e iniciamos la extracción, con un sifoneo cada hora
- Se procede a extraer solubles con el soxhelt por 6 horas con 400 ml de etanol-hexano relación (1:3), 100 ml de etanol y 300 ml de hexano
- Se cambia el balón por otro de 500 ml que contiene 400ml de etanol y se inicia la extracción con etanol durante 5 horas
- Se cambia el balón por otro de 500 ml que contenía 500 ml de agua destilada, y se inicia la extracción por una hora
- Se extrajo la muestra y se le realiza un lavado al vacío con 500 ml de agua destilada caliente
- Se observa el cambio de color del agua cuando se realiza el lavado
- Luego se deja secar la muestra al aire libre.

Anexo 8. Determinación de lignina

DETERMINACIÓN DE LA LIGNINA (ANSI/ASTM 01106 56)

Equipos y materiales

- Balanza analítica
- Probeta de 250 ml
- Termómetro
- Matraz Erlenmeyer 250 ml
- Varilla de agitación
- Plancha de calentamiento
- Refrigerante
- Balón de fondo plano
- Mangueras
- Estufa

Reactivos

- Hidróxido de sodio
- Ácido sulfúrico al 72%

Procedimiento

- Se colocó en vaso precipitado 1 g de muestra libre de extraíbles y se añadió 15 ml de ácido sulfúrico al 72 %
- Se agitó durante 2 horas a temperatura de 20°C, utilizando una plancha de calentamiento con agitación.
- Se transfiere 560ml de agua destilada a un matraz de 1000ml y convirtiendo en una solución ácida al 3%.
- Se hirvió a reflujo por 4 horas utilizando un balón con condensador.
- Se realizó una decantación hasta dejar una diferencia mínima entre las dos fases.
- Se realizó una filtración a la solución obtenida con papel filtró previamente tarado.
- Se lavó utilizando agua caliente que posteriormente se hizo secar hasta obtener peso constante a 80°C±5°C.
- El porcentaje (%) de lignina se determinó con la siguiente ecuación que es válida para la utilización de 1 g de muestra

$$\%\ lignina = peso\ bruto - peso\ tara\ x\ 100$$

Anexo 9. Determinación de celulosa

DETERMINACIÓN DE % CELULOSA (ANSI/ASTM 01103 – 60)

La celulosa es un polisacárido, formado principalmente por glucosa de modo que por su gran estructura resiste el ataque alcalino en cambio la hemicelulosa no.

Equipos y materiales

- Balanza analítica sensible 0.1mg
- Espátula
- Matraz Erlenmeyer de 250 ml
- Probeta de 25 ml
- Plancha de calentamiento
- Condensador
- Mangueras termómetros

Reactivos

- Hidróxido de sodio
- Ácido acético

Procedimiento

- Se tomó 1 g de muestra libre de extraíbles y se transfirió a un vaso precipitado de 100 ml
- Se agregó 10 ml de NaOH al 17.5%, agito y dejo reposar por 2 min. Luego nuevamente y se dejó reposar 3 min
- Se agregó de nuevo 5 ml de NaOH al 17.5% se agito y dejo reposar 5 min
- Se repite el paso 3
- Se agregó de nuevo 5 ml de NaOH al 17.5%, se agito y dejo reposar 30 min. En baño maría a 20°C±3°C
- Se agrega 30 ml de agua destilada, se agito y dejo reposar por 1 hora.
- Se filtró al vacío por papel waltman N°4 previamente tarado lavando con una solución preparada de 33 ml de agua destilada y 25 ml de la solución de NaOH al 17.5%
- Luego se lavó con 30 ml de agua destilada y se dejó aplicar vacío. Se agrega 15 ml de una solución al 10% de ácido acético y después de 3 min se aplica vacío, luego se lava con 50 ml de agua destilada aplicado vacío
- Se llevó la muestra a un secador eléctrico contenida en una caja Petri a una temperatura de 80°C±5 por 4 horas. Luego se transfirió a una desecadora y se esperó por 15 min para pensar. Se repitió el secado hasta el peso constante
- El % de celulosa se determinó por medio de la siguiente ecuación.

$$\%\ celulosa = \frac{[P.B - (P.T + P.L)] * PML}{PMT}\ x\ 100$$

Donde:

PB: Peso bruto de la muestra

PT: Peso tarado de papel filtro

PL: Peso lignina en 1 g

PML: peso muestra extraíble

PMT: Peso muestra antes extraíble

Anexo 10. Análisis de varianza (ANOVA)

Tabla 20. Análisis de varianza (ANOVA) de la cuantificación de etanol

Origen	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	F(0.5)	F(0.1)	sig
HIDROLISIS	18.621	1	18.621	26.371	4.49	8.53	**
TEMPERATURA	3.666	1	3.666	5.192	4.49	8.53	*
pH	54.481	1	54.481	77.155	4.49	8.53	**
HIDROLISIS * TEMPERATURA	69.020	1	69.020	97.746	4.49	8.53	**
HIDROLISIS * pH	.129	1	.129	.183	4.49	8.53	N.S
TEMPERATURA * pH	3.745	1	3.745	5.303	4.49	8.53	*
HIDROLISIS * TEMPERATURA * pH	.721	1	.721	1.021	4.49	8.53	N.S
Error	11.298	16	.706				
Total	161.681	23					

Tabla 21. Análisis de varianza (ANOVA) de azucares reductores antes de la Hidrólisis

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	F(0.5)	F(0.1)	Sig.
HIDROLISIS	25100.432	1	25100.432	117.863	4.49	8.53	**
TEMPERATURA	967.931	1	967.931	4.545	4.49	8.53	*
PH	877.238	1	877.238	4.119	4.49	8.53	N.S.
HIDROLISIS * TEMPERATURA	796.550	1	796.550	3.740	4.49	8.53	N.S.
HIDROLISIS * PH	1890.499	1	1890.499	8.877	4.49	8.53	**
TEMPERATURA * PH	14.525	1	14.525	.068	4.49	8.53	N.S.
HIDROLISIS * TEMPERATURA * PH	143.869	1	143.869	.676	4.49	8.53	N.S.
Error	3407.391	16	212.962				
Total corregida	33198.436	23					

Tabla 22. Análisis de varianza (ANOVA) de azucares reductores después de la Hidrólisis

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	F(0.5)	F(0.1)	sig
HIDROLISIS	38477.639	1	38477.639	1472.694	4.49	8.53	**
TEMPERATURA	111.181	1	111.181	4.255	4.49	8.53	N.S.
PH	478.309	1	478.309	18.307	4.49	8.53	**
HIDROLISIS * TEMPERATURA	11.864	1	11.864	.454	4.49	8.53	N.S.
HIDROLISIS * PH	296.582	1	296.582	11.351	4.49	8.53	**
TEMPERATURA * PH	5.113	1	5.113	.196	4.49	8.53	N.S.
HIDROLISIS * TEMPERATURA * PH	105.907	1	105.907	4.053	4.49	8.53	N.S.
Error	418.038	16	26.127				
Total	39904.633	23					

Tabla 23. Análisis de varianza (ANOVA) de análisis físico químico del etanol "Acidez total"

Origen	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	F(0.5)	F(0.1)	sig
Hidrólisis	0.0107	1	0.0107	2964.186	4.49	8.53	**
Temperatura	0.0029	1	0.0029	815.527	4.49	8.53	**
pH	0.0011	1	0.0011	313.397	4.49	8.53	**
Hidrólisis * Temperatura	6.403E^{05}	1	6.403E^{05}	17.818	4.49	8.53	**
Hidrólisis * pH	0.00014	1	0.0001	39.547	4.49	8.53	**
Temperatura * pH	0.00066	1	0.0007	184.091	4.49	8.53	**
Hidrólisis * Temperatura * pH	0.00015	1	0.0002	41.744	4.49	8.53	**
Error	5.749E^{05}	16	3.593E^{06}				
Total	0.0745	24					

Tabla 24. Análisis de varianza (ANOVA) de análisis físico químico del etanol "Conductividad eléctrica"

Origen	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	F(0.5)	F(0.1)	Sig
Hidrólisis	10837.500	1	10837.500	3882.090	4.49	8.53	**
Temperatura	1734.000	1	1734.000	621.134	4.49	8.53	**
pH	864.000	1	864.000	309.493	4.49	8.53	**
Hidrólisis * Temperatura	216.000	1	216.000	77.373	4.49	8.53	**
Hidrólisis * pH	96.000	1	96.000	34.388	4.49	8.53	**
Temperatura * pH	580.167	1	580.167	207.821	4.49	8.53	**
Hidrólisis * Temperatura * pH	0.1667	1	0.1667	0.0597	4.49	8.53	N.S.
Error	44.667	16	2.792				
Total	203410.000	24					
Total corregida	14372.500	23					

Tabla 25. Análisis de varianza (ANOVA) de análisis físico químico del etanol "Hierro"

Origen	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	F(0.5)	F(0.1)	sig
Hidrólisis	0.000113	1	0.00011	34.228	4.49	8.53	**
Temperatura	$2.400E^{05}$	1	$2.400E^{05}$	7.291	4.49	8.53	**
pH	$2.017E^{05}$	1	$2.017E^{05}$	6.127	4.49	8.53	**
Hidrólisis * Temperatura	$1.500E^{06}$	1	$1.500E^{06}$	0.456	4.49	8.53	N.S.
Hidrólisis * pH	$6.667E^{07}$	1	$6.667E^{07}$	0.203	4.49	8.53	N.S.
Temperatura * pH	$6.667E^{07}$	1	$6.667E^{07}$	0.203	4.49	8.53	N.S.
Hidrólisis * Temperatura * pH	$4.167E^{06}$	1	$4.167E^{06}$	1.266	4.49	8.53	N.S.
Error	$5.267E^{05}$	16	$3.292E^{06}$				
Total	0.00544	24					

Tabla 26. Análisis de varianza (ANOVA) de análisis físico químico del etanol "sodio"

Origen	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	F(0.5)	F(0.1)	sig
Hidrólisis	1.500	1	1.500	50.000	4.49	8.53	**
Temperatura	0.060	1	0.060	2.000	4.49	8.53	N.S.
pH	0.060	1	0.060	2.000	4.49	8.53	N.S.
Hidrólisis * Temperatura	0.015	1	0.015	0.50	4.49	8.53	N.S.
Hidrólisis * pH	0.135	1	0.135	4.500	4.49	8.53	*
Temperatura * pH	0.015	1	0.015	0.50	4.49	8.53	N.S.
Hidrólisis * Temperatura * pH	0.240	1	0.240	8.000	4.49	8.53	*
Error	0.480	16	0.030				
Total	275.880	24					

Anexo 11. FOTOGRAFIAS

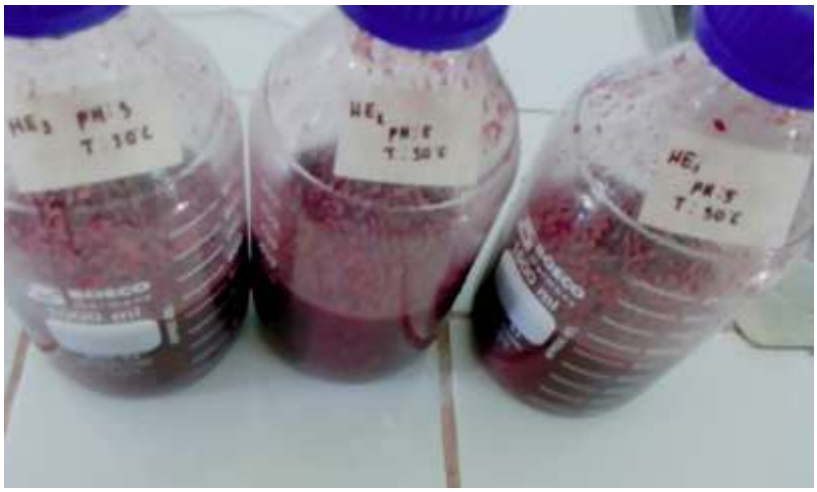


Figura 15. Preparación de muestras, en cual se pesa 200 gramos de orujo de uva y se acondiciona en frascos de vidrio para su posterior proceso.



Figura 16. Se realiza filtración de muestras (orujo de uva hidrolizado).



Figura 17. Se acondicona muestra de orujo de uva hidrolizada en baño maria a 30°C. por un periodo de 7 días.



Figura 18. Muestras de orujo filtrada en baño maria cerrado hermeticamente para mantener la temperatura a 30°C.



Figura 19. Obtención de etanol utilizando el rotavapor en donde se programa a 78°C.



Figura 20. Etanol obtenido a partir de orujo de uva mediante la hidrólisis alcalina y enzimatica.



Figura 21. Preparacion de etanol para curva patrón para el obtencion de datos mediante cromatografia de gases.



Figura 22. Preparacion de muestras (24 repiticiones) de etanol obtenido para cuantificar en el espectrofotometro.



Figura 23. Preparacion de muestra para determinar los azucares reductores.



Figura 24. Acondicionamiento de muestras de etanol para la lectura por cromatografía.

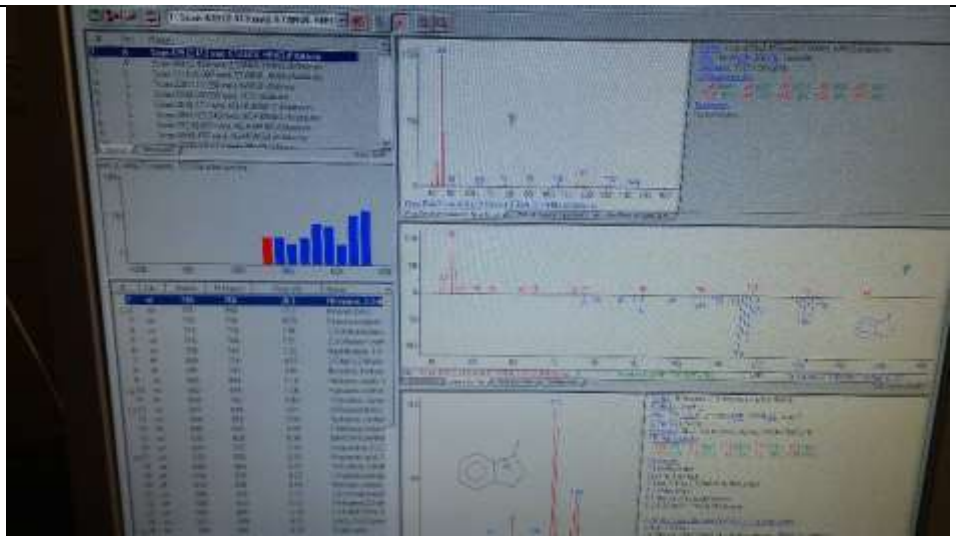


Figura 25. Lecturas de etanol dadas por la cromatografía (obtenida de orujo de uva).

Lab Cromatografia UNSAAC Quantitation Report (Not Reviewe

Data Path : D:\DATA MSD\VOLATILES\2018\Etanol HHH\Muestras\15-27\
Data File : HA1-01.D
Acq On : 26 Oct 2018 16:30
Operator : JCHP
Sample : HA1-01
Misc :
ALS Vial : 16 Sample Multiplier: 1

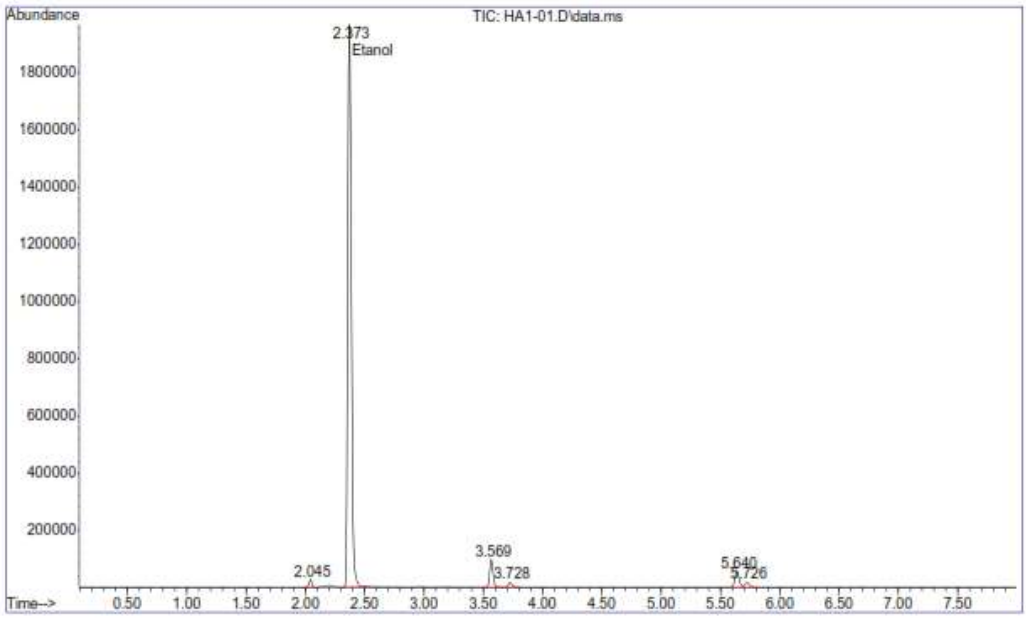
Quant Time: Oct 27 11:12:18 2018
Quant Method : C:\msdchem\1\methods\ALCOHOLES-HS.M
Quant Title : Etanol
QLast Update : Sat Oct 27 09:50:32 2018
Response via : Initial Calibration

Compound	R.T.	QIon	Response	Conc	Units	Dev(Min)
Target Compounds						Qvalue
1) Etanol	2.373	45	23197785	30.35	gr/L	96

(#) = qualifier out of range (m) = manual integration (+) = signals summed

ALCOHOLES-HS.M Sat Oct 27 11:12:18 2018 UNSAAC

File :D:\DATA MSD\VOLATILES\2018\Etanol HHH\Muestras\15-27\HA1-01.D
Operator : JCHP
Acquired : 26 Oct 2018 16:30 using AcqMethod ALCOHOLES-HS.M
Instrument : UNSSAC
Sample Name: HA1-01
Misc Info :
Vial Number: 16



Lab Cromatografia UNSAAC Quantitation Report (Not Reviewed

Data Path : D:\DATA MSD\VOLATILES\2018\Etanol HHH\Muestras\15-27\
Data File : HA2-01.D
Acq On : 26 Oct 2018 17:05
Operator : JCHP
Sample : HA2-01
Misc :
ALS Vial : 19 Sample Multiplier: 1

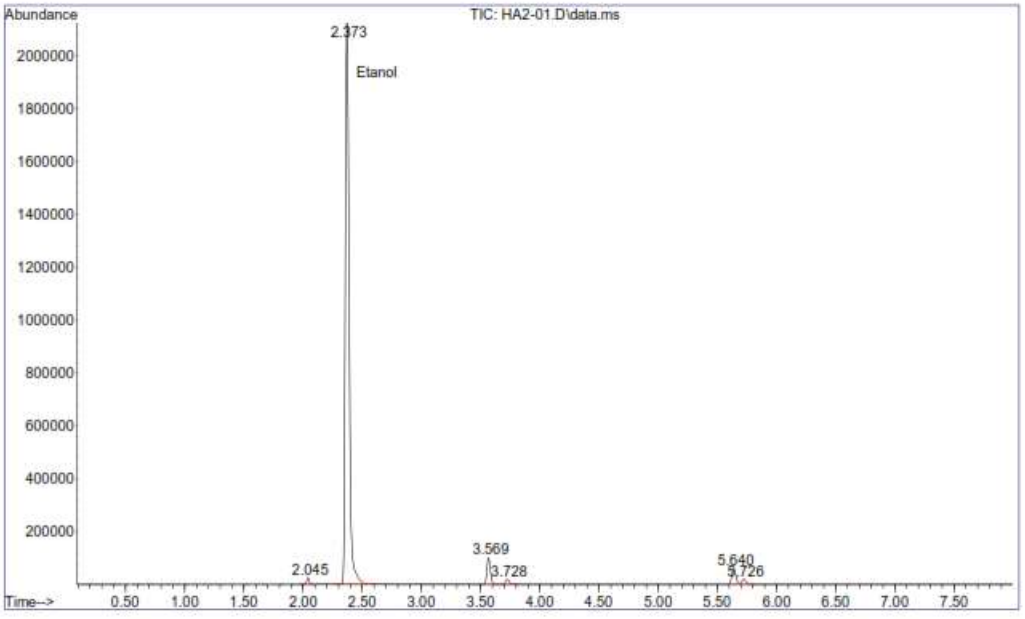
Quant Time: Oct 27 11:16:37 2018
Quant Method : C:\msdchem\1\methods\ALCOHOLES-HS.M
Quant Title : Etanol
QLast Update : Sat Oct 27 09:50:32 2018
Response via : Initial Calibration

Compound	R.T.	QIon	Response	Conc	Units	Dev(Min)
Target Compounds						Qvalue
1) Etanol	2.373	45	26928800	35.24	gr/L	97

(#) = qualifier out of range (m) = manual integration (+) = signals summed

ALCOHOLES-HS.M Sat Oct 27 11:16:37 2018 UNSAAC

File :D:\DATA MSD\VOLATILES\2018\Etanol HHH\Muestras\15-27\HA2-01.D
Operator : JCHP
Acquired : 26 Oct 2018 17:05 using AcqMethod ALCOHOLES-HS.M
Instrument : UNSSAC
Sample Name: HA2-01
Misc Info :
Vial Number: 19



Lab Cromatografia UNSAAC Quantitation Report (Not Reviewe

Data Path : D:\DATA MSD\VOLATILES\2018\Etanol HHH\Muestras\15-27\
Data File : HA3-01.D
Acq On : 26 Oct 2018 17:40
Operator : JCHP
Sample : HA3-01
Misc :
ALS Vial : 22 Sample Multiplier: 1

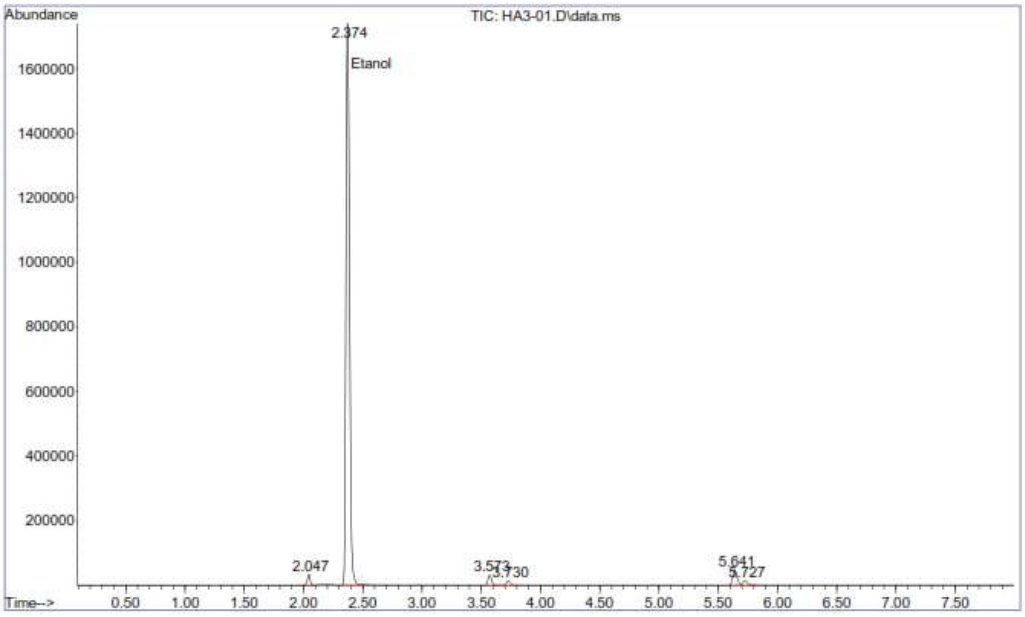
Quant Time: Oct 27 12:24:33 2018
Quant Method : C:\msdchem\1\methods\ALCOHOLES-HS.M
Quant Title : Etanol
QLast Update : Sat Oct 27 09:50:32 2018
Response via : Initial Calibration

Compound	R.T.	QIon	Response	Conc	Units	Dev(Min)
Target Compounds						Qvalue
1) Etanol	2.374	45	20280722	26.52	gr/L	96

(#) = qualifier out of range (m) = manual integration (+) = signals summed

ALCOHOLES-HS.M Sat Oct 27 12:24:34 2018 UNSAAC

File :D:\DATA MSD\VOLATILES\2018\Etanol HHH\Muestras\15-27\HA3-01.D
Operator : JCHP
Acquired : 26 Oct 2018 17:40 using AcqMethod ALCOHOLES-HS.M
Instrument : UNSSAC
Sample Name: HA3-01
Misc Info :
Vial Number: 22



Lab Cromatografia UNSAAC Quantitation Report (Not Reviewed

Data Path : D:\DATA MSD\VOLATILES\2018\Etanol HHH\Muestras\15-27\
Data File : HA4-01.D
Acq On : 26 Oct 2018 18:15
Operator : JCHP
Sample : HA4-01
Misc :
ALS Vial : 25 Sample Multiplier: 1

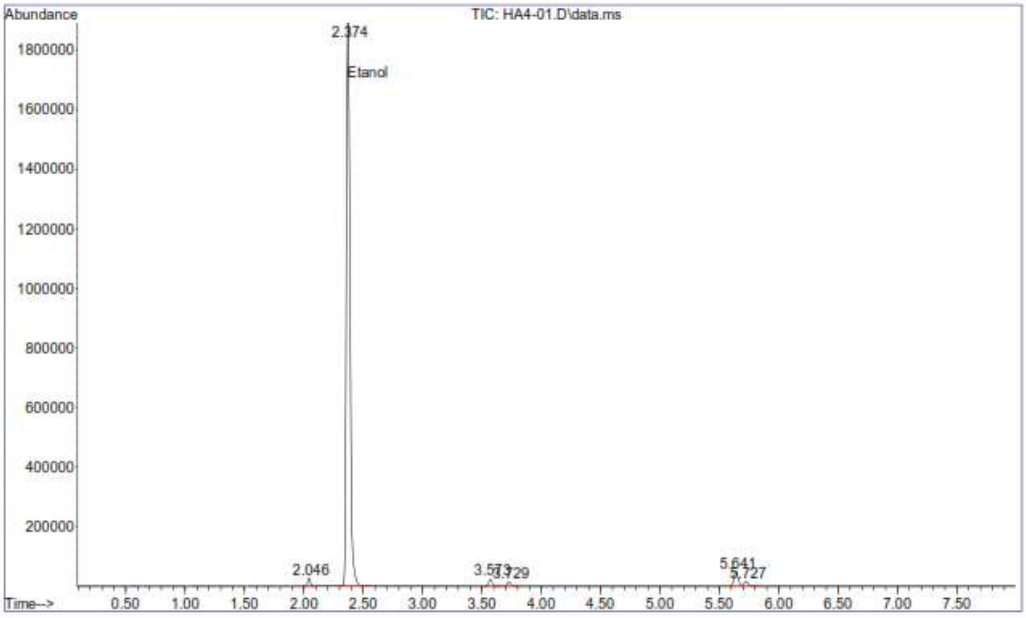
Quant Time: Oct 27 11:33:23 2018
Quant Method : C:\msdchem\1\methods\ALCOHOLES-HS.M
Quant Title : Etanol
QLast Update : Sat Oct 27 09:50:32 2018
Response via : Initial Calibration

Compound	R.T.	QIon	Response	Conc	Units	Dev(Min)
Target Compounds						Qvalue
1) Etanol	2.374	45	22795145	29.82	gr/L	96

(#) = qualifier out of range (m) = manual integration (+) = signals summed

ALCOHOLES-HS.M Sat Oct 27 11:33:23 2018 UNSAAC

File :D:\DATA MSD\VOLATILES\2018\Etanol HHH\Muestras\15-27\HA4-01.D
Operator : JCHP
Acquired : 26 Oct 2018 18:15 using AcqMethod ALCOHOLES-HS.M
Instrument : UNSSAC
Sample Name: HA4-01
Misc Info :
Vial Number: 25



Lab Cromatografia UNSAAC Quantitation Report (Not Reviewed

Data Path : D:\DATA MSD\VOLATILES\2018\Etanol HHH\Muestras\
Data File : HE1-01.D
Acq On : 26 Oct 2018 14:11
Operator : JCHP
Sample : HE1-01
Misc :
ALS Vial : 4 Sample Multiplier: 1

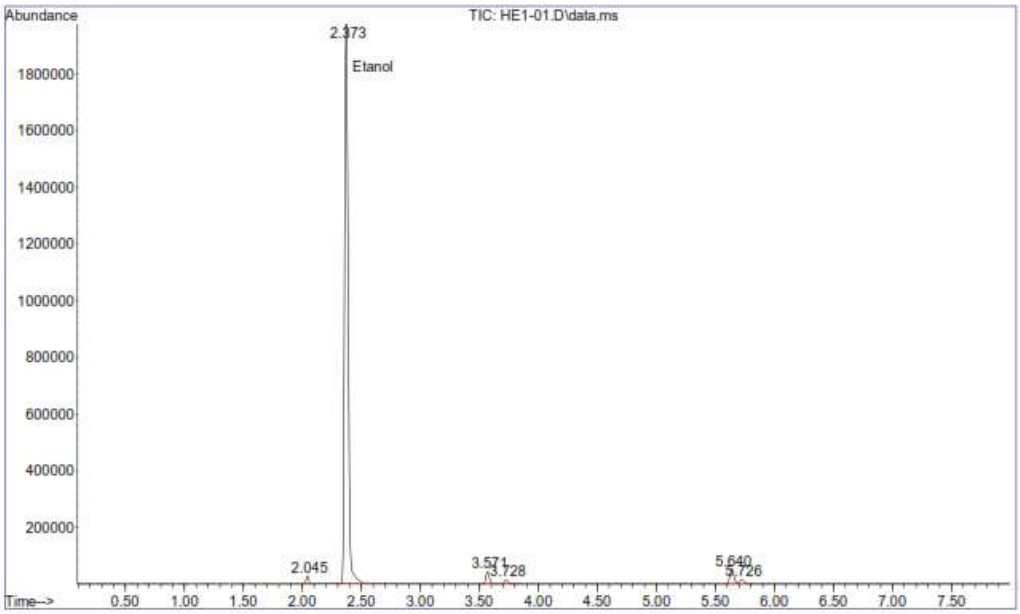
Quant Time: Oct 27 09:52:40 2018
Quant Method : C:\msdchem\1\methods\ALCOHOLES-HS.M
Quant Title : Etanol
QLast Update : Sat Oct 27 09:50:32 2018
Response via : Initial Calibration

Compound	R.T.	QIon	Response	Conc	Units	Dev(Min)
Target Compounds						Qvalue
1) Etanol	2.373	45	23227666	30.39	gr/L	96

(#) = qualifier out of range (m) = manual integration (+) = signals summed

ALCOHOLES-HS.M Sat Oct 27 09:52:40 2018 UNSAAC

File :D:\DATA MSD\VOLATILES\2018\Etanol HHH\Muestras\HE1-01.D
Operator : JCHP
Acquired : 26 Oct 2018 14:11 using AcqMethod ALCOHOLES-HS.M
Instrument : UNSSAC
Sample Name: HE1-01
Misc Info :
Vial Number: 4



Lab Cromatografia UNSAAC Quantitation Report (Not Reviewe

Data Path : D:\DATA MSD\VOLATILES\2018\Etanol HHH\Muestras\
Data File : HE2-01.D
Acq On : 26 Oct 2018 14:43
Operator : JCHP
Sample : HE2-01
Misc :
ALS Vial : 7 Sample Multiplier: 1

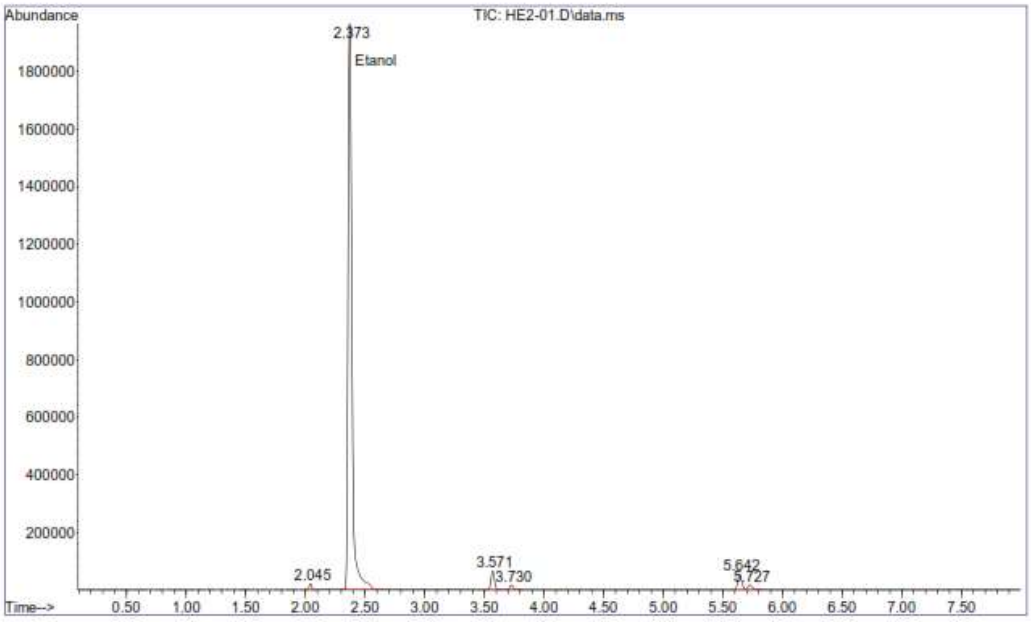
Quant Time: Oct 27 10:49:51 2018
Quant Method : C:\msdchem\1\methods\ALCOHOLES-HS.M
Quant Title : Etanol
QLast Update : Sat Oct 27 09:50:32 2018
Response via : Initial Calibration

Compound	R.T.	QIon	Response	Conc	Units	Dev(Min)
Target Compounds						Qvalue
1) Etanol	2.373	45	25106752	32.85	gr/L	96

(#) = qualifier out of range (m) = manual integration (+) = signals summed

ALCOHOLES-HS.M Sat Oct 27 10:49:51 2018 UNSAAC

File :D:\DATA MSD\VOLATILES\2018\Etanol HHH\Muestras\HE2-01.D
Operator : JCHP
Acquired : 26 Oct 2018 14:43 using AcqMethod ALCOHOLES-HS.M
Instrument : UNSSAC
Sample Name: HE2-01
Misc Info :
Vial Number: 7



Lab Cromatografia UNSAAC Quantitation Report (Not Reviewed

Data Path : D:\DATA MSD\VOLATILES\2018\Etanol HHH\Muestras\
Data File : HE3-01.D
Acq On : 26 Oct 2018 15:15
Operator : JCHP
Sample : HE3-01
Misc :
ALS Vial : 10 Sample Multiplier: 1

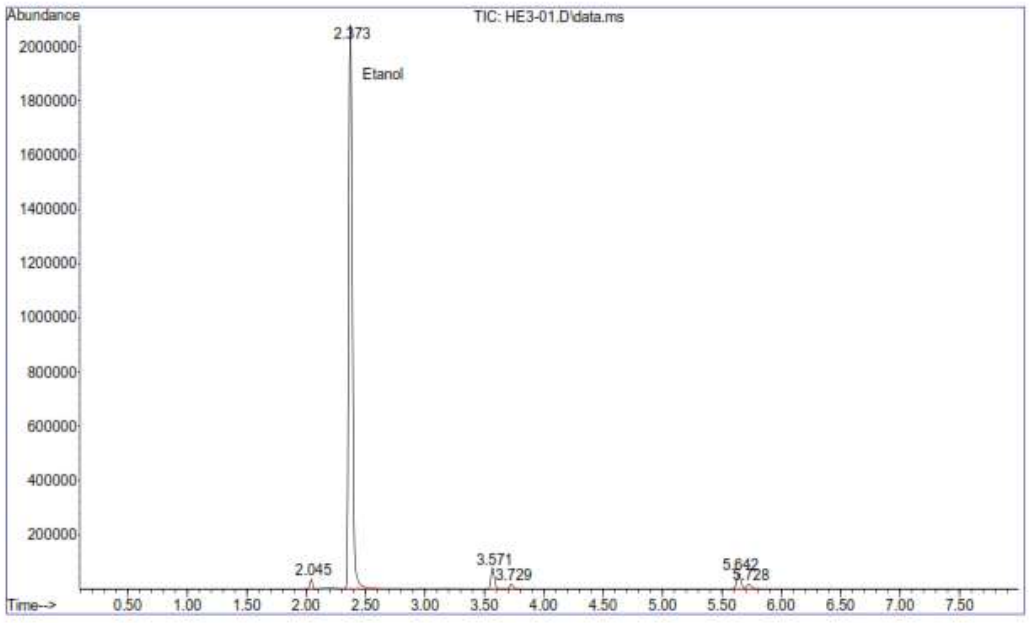
Quant Time: Oct 27 10:54:40 2018
Quant Method : C:\msdchem\1\methods\ALCOHOLES-HS.M
Quant Title : Etanol
QLast Update : Sat Oct 27 09:50:32 2018
Response via : Initial Calibration

Compound	R.T.	QIon	Response	Conc	Units	Dev(Min)
Target Compounds						Qvalue
1) Etanol	2.373	45	24968943	32.67	gr/L	96

(#) = qualifier out of range (m) = manual integration (+) = signals summed

ALCOHOLES-HS.M Sat Oct 27 10:54:40 2018 UNSAAC

File :D:\DATA MSD\VOLATILES\2018\Etanol HHH\Muestras\HE3-01.D
Operator : JCHP
Acquired : 26 Oct 2018 15:15 using AcqMethod ALCOHOLES-HS.M
Instrument : UNSSAC
Sample Name: HE3-01
Misc Info :
Vial Number: 10



Lab Cromatografia UNSAAC Quantitation Report (Not Reviewe

Data Path : D:\DATA MSD\VOLATILES\2018\Etanol HHH\Muestras\
Data File : HE4-01.D
Acq On : 26 Oct 2018 15:47
Operator : JCHP
Sample : HE4-01
Misc :
ALS Vial : 13 Sample Multiplier: 1

Quant Time: Oct 27 11:02:37 2018
Quant Method : C:\msdchem\1\methods\ALCOHOLES-HS.M
Quant Title : Etanol
QLast Update : Sat Oct 27 09:50:32 2018
Response via : Initial Calibration

Compound	R.T.	QIon	Response	Conc	Units	Dev(Min)
Target Compounds						Qvalue
1) Etanol	2.373	45	26012473	34.04	gr/L	96

(#) = qualifier out of range (m) = manual integration (+) = signals summed

ALCOHOLES-HS.M Sat Oct 27 11:02:37 2018 UNSAAC

File :D:\DATA MSD\VOLATILES\2018\Etanol HHH\Muestras\HE4-01.D
Operator : JCHP
Acquired : 26 Oct 2018 15:47 using AcqMethod ALCOHOLES-HS.M
Instrument : UNSSAC
Sample Name: HE4-01
Misc Info :
Vial Number: 13

