

**Efecto de la temperatura y la concentración
de ácido sulfúrico en el pretratamiento para
la producción de bioetanol a partir de
estiércol de ganado lechero**

Carla Mariela Gámez Herrera

Zamorano, Honduras

Diciembre, 2008

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Efecto de la temperatura y la concentración de ácido sulfúrico en el pretratamiento para la producción de bioetanol a partir de estiércol de ganado lechero

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria en el Grado
Académico de Licenciatura

Presentado por

Carla Mariela Gámez Herrera

Zamorano, Honduras

Diciembre, 2008

Efecto de la temperatura y la concentración de ácido sulfúrico en el pretratamiento para la producción de bioetanol a partir de estiércol de ganado lechero

Presentado por:

Carla Mariela Gámez Herrera

Aprobado:

Edgar E. Ugarte, M.Sc.
Asesor Principal

Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Director
Carrera Agroindustria limentaria

Francisco Javier Bueso, Ph.D.
Asesor

Raúl Espinal, Ph.D.
Decano Académico

Kenneth L. Hoadley, D.B.A.
Rector

RESUMEN

Gómez, C. 2008. Efecto de la temperatura y la concentración de ácido sulfúrico en el pretratamiento de bioetanol a partir de estiércol de ganado lechero. Proyecto de graduación del programa de Ingeniería en Agroindustria Alimentaria, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Honduras. 24 p.

El etanol lignocelulósico es el producto obtenido de la fermentación de los azúcares hidrolizados de materiales ricos en celulosa y lignina. El estiércol es un material lignocelulósico que se diferencia por el nivel aproximado de nitrógeno de 3% en base seca, a diferencia del 1% que contienen otros materiales, como la madera, entre otros. Este estudio permitió evaluar el efecto de la temperatura y el ácido sulfúrico en el rendimiento de etanol lignocelulósico a partir de estiércol de ganado lechero. Se utilizó un diseño experimental de parcelas divididas, donde las parcelas principales fueron las temperaturas (110 y 121° C) y las subparcelas las conformaron los niveles de ácido sulfúrico (2, 2.5 y 3%), para un total de 6 tratamientos y 3 repeticiones, resultando en 18 unidades experimentales. Se utilizó un hidrómetro para determinar la cantidad de alcoholes producidos y se obtuvo un perfil de alcoholes a través de cromatografía de gases. El tratamiento con el cual se obtuvo el mayor contenido de alcoholes totales (60.13 % ± 0.65) fue el de 121° C y 2% de ácido sulfúrico. En cuanto al perfil de alcoholes, los tratamientos que permitieron tener el mayor rendimiento de etanol fueron el de 110° C con 2.5% de ácido sulfúrico y el de 121° C, con 2% de ácido sulfúrico; siendo este último el que rindió etanol lignocelulósico con el menor costo por litro: L. 12,630.00.

Palabras clave: etanol, fermentación, celulosa, hidrólisis ácida.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	13
5. CONCLUSIONES.....	16
6. RECOMENDACIONES.....	17
8. BIBLIOGRAFÍA.....	18
9. ANEXOS	20

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadro	Página
1. Características del estiércol de ganado vacuno lechero	4
2. Especificaciones estándares contenidas en ASTM D 4806.....	6
3. Perfil de alcoholes del producto destilado final	13
4. Rendimiento de etanol lignocelulósico por cada tratamiento	14
5. Efecto del porcentaje de ácido sulfúrico en el porcentaje de etanol.....	14
6. Efecto de la temperatura en el porcentaje de etanol.....	15
7. Costos variables del etanol lignocelulósico.....	15
Figura	Página
1. Flujo del proceso para la producción de etanol a partir de estiércol de ganado lechero.....	10
Anexo	Página
1. Cuadro SAS para grado de alcohol	21
2. Cuadro SAS para porcentaje de alcohol.....	22
3. Cuadro SAS para porcentaje de etanol.....	23
4. Cuadro SAS para rendimiento de etanol	24

1. INTRODUCCIÓN

El continuo crecimiento demográfico y desarrollo industrial de las sociedades desarrolladas y en desarrollo han conllevado al incremento del uso de energía de origen fósil, sin garantizar la sostenibilidad de estos en un largo plazo. Hoy en día, la importancia de la investigación de nuevas alternativas de energía se incrementó, no tanto por la reducción de fuentes energéticas disponibles, sino también porque las nuevas alternativas sean sostenibles y no contribuyan al deterioro ambiental que se enfrenta actualmente.

Contribuyendo a esta causa, uno de los objetos de arduo estudio es el bioetanol, por ser un combustible seguro, potencialmente económico y más limpio, comparado con los combustibles fósiles, y un recurso de alto potencial energético para su producción es el estiércol de ganado lechero, por su considerable volumen de producción y contenido de celulosa y hemicelulosa capaces de ser hidrolizados en azúcares fermentables.

Viendo ésto, se han realizado investigaciones para analizar los rendimientos de azúcares del estiércol de ganado lechero bajo distintas condiciones de pretratamiento e hidrólisis, tales como el de Liao, *et al.* (2005), que obtuvo un 80% de azúcares de hemicelulosa y un 84% de glucosa después de someter muestras de estiércol a hidrólisis con ácido sulfúrico. El objetivo de este estudio fue ir más allá de la obtención de azúcares, utilizando hidrólisis ácida como método de hidrólisis y *Saccharomyces cerevisiae* como agente fermentador para producir etanol; sobrepasando las limitantes en Zamorano, tanto por la falta de equipo que permita realizar el estudio bajo las condiciones ideales, como temperaturas mayores a 121° C y tiempos mayores a una hora bajo autoclave; como la ausencia del equipo completo para realizar análisis requeridos.

Es así que la producción de etanol a partir de estiércol de ganado lechero se convierte en una alternativa para el aprovechamiento de desechos y aplacar los dilemas ambientales por la contaminación causada por los mismos. Al mismo tiempo, los granjeros podrían realizar una producción más limpia y se ayudaría a resolver la crisis alimentaria causada, en parte por el uso de biocombustibles a partir de fuentes alimenticias, como el maíz y la caña de azúcar.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo general

- Determinar las mejores condiciones de temperatura y concentración de ácido sulfúrico para el pretratamiento de estiércol de ganado lechero para la producción de etanol a partir de este en la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano.

1.1.2. Objetivos específicos

- Determinar el efecto de la temperatura en el rendimiento de etanol a partir de estiércol de ganado lechero.
- Determinar el efecto del ácido sulfúrico en el rendimiento de etanol a partir de estiércol de ganado lechero.
- Realizar un análisis de costos variables para la producción de estiércol a partir de ganado lechero de Zamorano.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. CARACTERÍSTICAS DEL ETANOL

El etanol o alcohol etílico es un compuesto orgánico constituido por dos carbonos, uno de los cuales contiene un grupo hidroxilo (OH). El 'bioetanol' o 'etanol renovable', llamado así por provenir de la fermentación alcohólica de biomasa rica en azúcares, almidones y hasta compuestos celulósicos, es también llamado 'etanol carburante hidratado' por tener un determinado contenido de agua, según el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA, 2007). Químicamente, el bioetanol y el etanol fósil son el mismo compuesto, afirma Tamers (2006); la única diferencia entre ellos es que el etanol sintético proviene de material fósil y el bioetanol proviene de materiales contemporáneos. De acuerdo a Chandel, *et. al.* (2007), el etanol proveniente de biomasa provee beneficios estratégicos ambientales y económicos y puede ser considerado como un combustible seguro y más limpio que los combustibles fósiles.

2.2. MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

Los materiales lignocelulósicos incluyen madera, basura forestal, residuos agrícolas y desechos sólidos municipales, afirma Palmqvist, *et. al.* (1996). Estos materiales están compuestos, principalmente, por azúcares polimerizados en celulosa (40-50%) y hemicelulosa (25-35%), envueltos en una capa sólida de lignina (15-20%), más cantidades mínimas de minerales, aceites, azúcares solubles y otros compuestos. La celulosa es un polímero lineal de alto peso molecular compuesto por unidades de β -1,4 D-Glucosa. La hemicelulosa consiste en ramas de polisacáridos formadas por las pentosas D-xilosa y L-arabinosa, y las hexosas D-manosa, D-glucosa y ácido urónico, afirma Saka (1991; citado por Palmqvist, *et. al.* 1996). La lignina, en cambio es un polímero no fermentable aromático sintetizado a partir de precursores fenilpropanoides.

El estiércol de ganado lechero (especialmente de zonas tropicales) es, por composición, 12% de hemicelulosa y 22% celulosa; esto representa un gran potencial energético, por el contenido de carbohidratos fermentables. Entre los otros componentes, según estudios realizados por Liao, *et al.* (2005), están el nitrógeno, carbono, azufre, calcio, magnesio, sodio, potasio y fósforo (ver sus proporciones en el Cuadro 1). El factor que marca la diferencia entre el estiércol y los demás materiales lignocelulósicos es el alto contenido de nitrógeno (cerca de 3%), comparado con el que contiene la madera y algunas malezas (menos del 1%).

Cuadro 1. Características del estiércol de ganado vacuno lechero.

Componente	Estiércol crudo (% en base seca)	Estiércol pretratado (% en base seca)
Materia seca	15.50 ± 0.09	
FND	48.27 ± 0.46	
FAD	35.80 ± 0.14	
LAD	13.91 ± 0.45	
Celulosa (=FAD-LAD)	21.89 ± 0.38	
Hemicelulosa (=FND-FAD)	12.47 ± 0.32	
N	2.63 ± 0.09	1.31 ± 0.04
C	45.49 ± 0.30	39.46 ± 1.51
S	0.42	0.56
Ca	2.22	2.71
Mg	0.46	0.38
Na	0.21	0.14
K	2.86	1.17
P	0.48	0.54

Fuente: Liao, *et al.* (2005). adaptado por el autor.

2.3. PROCEDIMIENTOS PARA LA OBTENCIÓN DE ETANOL

La conversión de los compuestos lignocelulósicos en azúcares fermentables consta de tres fases, básicamente:

2.3.1. Pretratamiento.

Según Iranmahboob (2001), las plantas, se protegen de la destrucción de sus células por bacterias y hongos a través de su estructura compleja de lignocelulosa. El pretratamiento permite liberar la celulosa y hemicelulosa de la capa de lignina, para que en la fase de hidrólisis se puedan degradar en sus monómeros correspondientes. El pretratamiento es también llamado “hidrólisis de decristalización”, porque además de remover la hemicelulosa, se reduce la cristalinidad de la celulosa al ocurrir una leve hidrólisis de ésta (1% de sus azúcares se liberan), y se aumenta la porosidad de la capa lignocelulósica. Liao, *et al.* (2003), menciona que una primera hidrólisis ácida de ácido diluido, especialmente el ácido sulfúrico, es el método típico en el cual se combinan tres factores: temperatura, concentración del ácido y tiempo de reacción.

Entre todos los métodos de pretratamiento que han sido diseñados, el método de ácido diluido ha sido el más estudiado por ser efectivo y el menos caro. El ácido sulfúrico puede solubilizar efectivamente la celulosa, hidrolizándola en sus monómeros y solubilizando algunos azúcares compuestos, como celobiosas, mejorando así la conversión de la

celulosa. Comparado con otros métodos de pretratamiento, la hidrólisis con ácido sulfúrico es la más útil, ya que permite la conversión del xilano en la hemicelulosa a xilosa, que posteriormente puede ser fermentada por los microorganismos (Sánchez, 2003).

EL pretratamiento de materiales lignocelulósicos todavía es un área de estudios futuros, debido a que necesita más mejoras para reducir los costos de operación par convertir los desechos lignocelulósicos en azúcares con valor agregado. Asimismo, que esos procesos permitan obtener altos rendimientos de azúcares y reducir al mínimo los costos que esto implica.

2.3.2. Hidrólisis.

Una vez se liberó la hemicelulosa en el pretratamiento, durante la hidrólisis se degrada la celulosa en azúcares fermentables. De acuerdo a Iranmahboob (2001), hay tres tipos de hidrólisis para los materiales lignocelulósicos:

2.3.2.1. Hidrólisis de ácido diluido. Este método usa concentraciones de ácido entre 2 y 5% y requiere de altas temperaturas (110-160° C) y presiones hasta 10 atmósferas. Debido al bajo rendimiento de glucosa a partir de la celulosa, el rendimiento de etanol es pobre también, por lo que este método es típicamente para el pretratamiento, donde no se requieren de concentraciones de ácido muy altas para remover la hemicelulosa (Iranmahboob, 2001).

2.3.2.2. Hidrólisis de ácido concentrado. Usa concentraciones de ácido entre 10 a 30%, utilizándose menores temperaturas y presiones. Los rendimientos de etanol son más altos que el que se obtiene con el método de hidrólisis de ácido diluido. Debido a que la celulosa todavía no se ha liberado por completo de la capa de lignina, el método de ácido concentrado es regularmente para la hidrólisis de celulosa, por su severidad, termina de romper la capa de lignina para poder hidrolizar celulosa. Las desventajas del uso de ácido concentrado para la hidrólisis de oligosacáridos es que no es un método selectivo y puede terminar destruyendo una parte de los azúcares que se vayan liberando, si es que no se regula bien la temperatura de reacción. Además que se requieren de contenedores que garanticen la protección de los operarios y la contención de los ácidos, para evitar derrames que contaminen el ambiente (Iranmahboob, 2001; Wen, *et al*, 2003)

2.3.2.3. Hidrólisis enzimática. Este procedimiento requiere de tiempos de reacción mayores que los de hidrólisis ácida y condiciones más controladas, como temperatura y pH. Asimismo, las condiciones para la producción de estas enzimas y su almacenamiento hacen que éstas resulten costosas (Iranmahboob, 2001). Sin embargo, también se están llevando a cabo estudios que permitan obtener estas enzimas de maneras factibles a través del mejoramiento genético de microorganismos productores de éstas.

2.3.3. Fermentación alcohólica

La fermentación es un proceso biológico que se da en ausencia de oxígeno, originada por la actividad de algunos microorganismos que procesan carbohidratos simples, como la

glucosa y la manosa, para producir etanol (Majovic, 2006). Se ha comprobado que *S. cerevisiae* es el microorganismo que mejor tolera la presencia de compuestos inhibidores de la fermentación. Estos compuestos son formados a partir de los carbohidratos simples que se liberan durante el pretratamiento y son, en orden de abundancia: el hidroximetilfurfural, ácido levulínico, ácido fórmico y el furfural.

2.4. ESPECIFICACIONES DEL ETANOL

En el Cuadro 2 se especifican las características físico-químicas exigidas por la Asociación de Combustibles Renovables (RFA) para el etanol combustible para mezcla con gasolina.

Cuadro 2. Especificaciones estándares contenidas en ASTM D 4806

Propiedad	Unidades	Especificación	Método ASTM
Volumen de etanol, mínimo	%	92.1	D 5501
Volumen de metanol, máximo	%	0.5	
Gomas disueltas, máximo	mg/100mL	5	D 381
Volumen de agua, máximo	%	1	E 203
Contenido denaturante, Vol. mínimo	%	1.96	
Volumen máximo	%	4.76	
Ion cloruro (masa), máximo	(mg/L)	40	D 512
Contenido de Cobre, máximo	mg/kg	0.1	D1688
Acidez (como ácido acético CH ₃ COOH), máximo	mg/L	0.007	D1613
pH		6.5-9.0	D 6423
Apariencia	Visiblemente libre de partículas suspendidas o precipitadas (claro y brillante)		
Color	Visual	Incoloro	

Fuente: Renewable Fuels Association, Industry Guidelines, Specifications, and Procedures (2007), traducido por el autor.

2.4.1. Humedad

El bioetanol, también llamado etanol carburante hidratado por el Reglamento Técnico Centroamericano para Biocombustibles (2005), se caracteriza por tener un determinado contenido de agua (no mayor al 1% v/v), dado el proceso de hidrólisis por el que pasa para su obtención. He ahí la importancia de medir el contenido de agua del etanol combustible. La norma de referencia para determinar la humedad del etanol es la ASTM E 203. Este método mide el agua libre contenido en el etanol y permite asegurar que éste no exceda del 1%.

2.5. EFECTO DEL NITRÓGENO EN EL PRETRATAMIENTO E HIDRÓLISIS

De acuerdo a Liao, *et al.* (2003), el estiércol de ganado lechero tiene, por composición, un contenido aproximado de $2.63 \pm 0.086\%$ nitrógeno, base seca (Cuadro 1). Después del lavado y pretratamiento se observó una disminución del nitrógeno a un $1.30 \pm 0.014\%$. El remanente de nitrógenos está contenido en las paredes celulares del forraje y proteínas asociadas con la lignina, las cuales son difíciles de remover con el lavado.

Esto demostró que más de la mitad del contenido de nitrógeno del estiércol es soluble y puede ser removido para reducir el emparedamiento no enzimático o reacción de Millard que ocurre durante el pretratamiento e hidrólisis. Según Liao, *et al.* (2005), este alto contenido de nitrógeno conduce a bajos rendimientos de etanol, gracias a la reacción de Millard ocurrida entre los aminoácidos libres y los azúcares liberados durante la hidrólisis. Por esta razón, se recomienda el uso de temperaturas y presiones altas por un corto tiempo, sobre concentraciones bajas de ácido y temperaturas bajas por tiempo prolongado.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LOCALIZACIÓN

El estudio se llevó a cabo en las instalaciones de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. El procedimiento de obtención del etanol se realizó en el Laboratorio de Microbiología y los análisis tanto químicos como físicos se realizaron en el Laboratorio de Análisis de Alimentos de Zamorano, departamento Francisco Morazán, Kilómetro 32 al Este de Tegucigalpa, Honduras.

3.2. MATERIALES

3.2.1. Materiales

- Estiércol fresco de ganado lechero tomado de la Estación de Ganado Lechero de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano.
- Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.
- Balanza.
- Tamiz.
- Bandeja, capacidad 10 L.
- Espátulas.
- Termómetro.
- Bureta para titulación.
- Vaso volumétrico, capacidad 1 L.
- Pipetas 10 mL.
- Bulbo para pipetas.
- Frascos Erlenmeyer de 100 mL.
- Papel filtro, 10 cm de diámetro.
- Incubadora (32° C).
- Medio de cultivo LB.
- Magnetos agitadores.

3.2.2. Reactivos

- Ácido sulfúrico al 2, 2.5 y 3% de concentración.
- Hidróxido de Sodio al 1 N.

3.3. EQUIPO

- Horno (Napco modelo 630)
- Campana de extracción de gases (IECK modelo K)
- Medidor de pH (Corning).
- Autoclave (Esterilmatic)
- Licuadora (Proctor Silex).
- Calentador con agitador (Fisher Scientific)
- Cromatógrafo de gases Agilent 6890 con detector FID, columna DB-ALC1 de J&W Scientific (30m*0.32m*1.8 μ m).

3.4. METODOLOGÍA

3.4.1. Diseño experimental

El estudio consistió en evaluar dos temperaturas (110 y 121° C) combinados con tres concentraciones de ácido sulfúrico (2, 2.5 y 3%) para un pretratamiento que permitiera obtener el mayor rendimiento de etanol. Se realizó un diseño de parcelas divididas, en el cual la parcela principal fue el factor temperatura del pretratamiento (110 y 121° C) y las subparcelas fueron las concentraciones de ácido sulfúrico (2, 2.5 y 3%), obteniendo así 6 tratamientos a evaluar. Se realizaron tres repeticiones, para un total de 18 unidades experimentales.

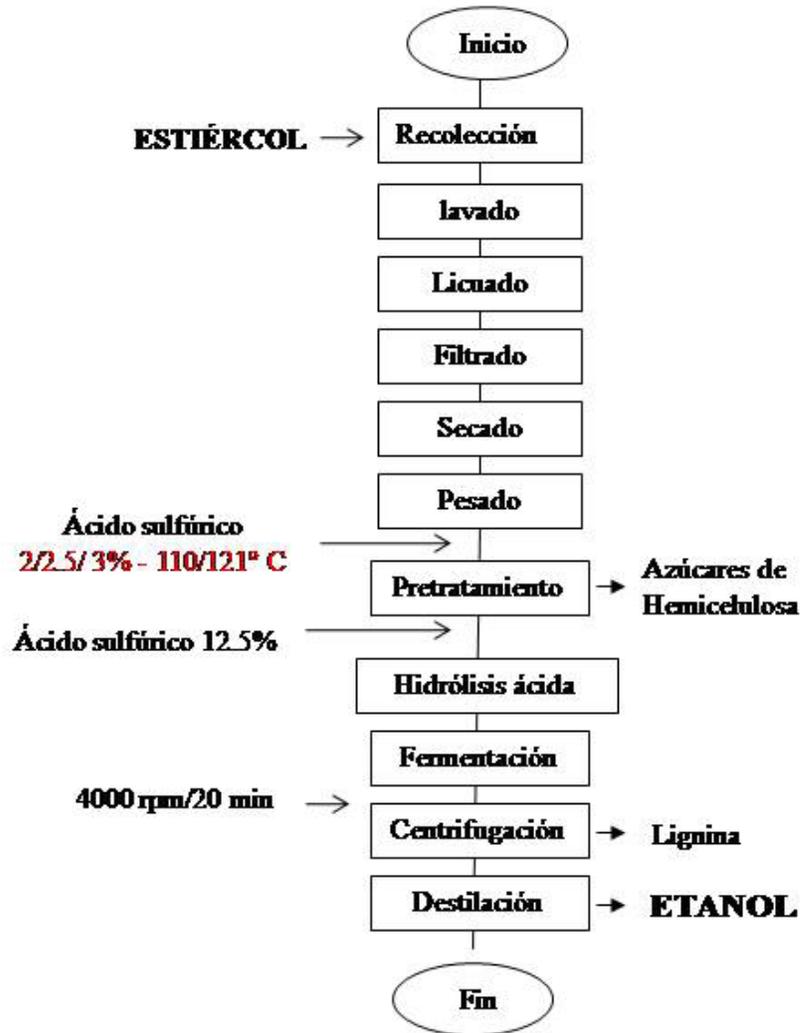


Figura 1. Flujo del proceso para la producción de etanol a partir de estiércol de ganado lechero.

Considerando que hemicelulosa es fácilmente hidrolizada usando ácido en bajas concentraciones bajo condiciones moderadas y se necesitan condiciones más extremas para la hidrólisis de la celulosa (Iranmahboob, 2001), para este estudio se utilizó ácido diluido (2-3% de H_2SO_4) para liberar la hemicelulosa y se usó ácido concentrado (12.5%) para hidrolizar la celulosa).

3.4.2. Pretratamiento

Se tomó una muestra de 5 kg de estiércol fresco de la Estación de Ganado Lechero de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. El estiércol fue lavado 5 veces por separado con agua potable, en una relación de 2:1, estiércol fresco: agua. Se mezcló el estiércol lavado con agua destilada en una relación 2:1 y se licuó durante 10 minutos y se filtró. El material exprimido fue secado en un horno de aire forzado a $64^\circ C$, durante 48 horas.

Se agregó 50 g del estiércol limpio y seco a seis frascos erlenmeyer limpios y se les agregó la solución de ácido sulfúrico en una relación 1:11 de muestra seca: solución de ácido sulfúrico, se cubrieron las botellas con parafilm y se dejó reposar durante 4 horas a temperatura ambiente (24° C), para permitir penetrar el ácido en la matriz de estiércol. Se filtraron las muestras, a fin de excluir el exceso de solución ácida. Luego fueron llevadas a la autoclave, donde se les sometió al tratamiento térmico a 110° C para tres tratamientos y a 121° C para los otros tres tratamientos, durante 60 minutos.

Posteriormente, se retiraron los frascos de la autoclave, se agregó agua a cada frasco, según la siguiente ecuación:

$$\text{Agua} = (6x \text{ gr fibra seca} - \text{gr beaker} + (\text{fibra húmeda} - \text{gr beaker}))$$

Se dejó reposar las muestras y se filtró. Se comparó el tiempo de filtración de cada una de los tratamientos y el filtrado se volvió a pesar.

3.4.3. Hidrólisis ácida (12.5% H₂SO₄ a 121° C, 15 min.)

Se tomaron 40 g base seca del estiércol pretratado y se le añadió solución de ácido sulfúrico al 12.5% en una relación 1:10 de muestra base seca: solución y, después de un tiempo de reposo de 4 horas a temperatura ambiente, se puso en la autoclave a 121° C por 15 minutos.

3.4.4. Fermentación alcohólica (pH 5.5, 32° C, 72 horas)

Se tomaron las muestras hidrolizadas y se estabilizó el pH a 5.5. Se utilizó levadura liofilizada, la cual, antes de ser utilizada como inóculo para la fermentación, fue adaptada por un periodo de dos horas en un medio de crecimiento constituido por glucosa (10 g/L), cloruro de sodio (15 g/l), bactopectona (5 g/l), extracto de levadura (5 g/l), levadura liofilizada (10 g/l) y agua destilada. Seguidamente, se agregó 5 mL de la solución conteniendo la *S. cerevisiae* para cada muestra y se dejó fermentar por 72 horas bajo condiciones anaerobias. Finalmente, se tomó el producto fermentado para realizar los correspondientes análisis.

3.4.5. Análisis químico

Se utilizó cromatografía de gases para determinar la concentración de etanol y presencia de otros alcoholes en el producto destilado. El cromatógrafo de gases Agilent modelo 6890 en conjunto con el software ChemStation fueron utilizados para determinar el porcentaje de etanol obtenido. Se utilizó un método de análisis predeterminado que tenía las siguientes condiciones: temperatura del inyector de 250 °C en modo split a una relación de 20:1, columna capilar J &W Scientific DB-ALC 1 (30 m de largo x 0.32 mm ID x 1.8 µm) con flujo constante de 6.86 ml/cm de nitrógeno, detector FID a 250 °C y temperatura del horno a 38 °C en fase inicial con una tasa ascendente de 20 °C/min. hasta alcanzar los 120 °C. El tiempo de corrido del análisis fue de 12.2 min. utilizando nitrógeno como gas de acarreo.

3.4.6. Análisis estadístico

Se utilizó el programa estadístico SAS®, versión 9.1 para hacer un análisis de varianza (ANDEVA) de los rendimientos de etanol obtenidos con cada tratamiento y una separación de medias por el método TUKEY para encontrar diferencia significativa entre éstos, con una probabilidad de 5%.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. PERFIL DE ALCOHOLES

Cuadro 3. Perfil de alcoholes del producto destilado final.

TRT	Etanol (%) Media ± D.E.*	Metanol (%) Media ± D.E.*
TRT 4 (121° C, 2.0% H ₂ SO ₄)	93.71 ± 1.56 a	0.59 ± 0.25 ab
TRT 2 (110° C, 2.5% H ₂ SO ₄)	91.76 ± 1.56 ab	0.79 ± 0.25 a
TRT 5 (121° C, 2.5% H ₂ SO ₄)	91.75 ± 1.56 ab	0.80 ± 0.25 a
TRT 1 (110° C, 2.0% H ₂ SO ₄)	89.96 ± 1.56 bc	0.90 ± 0.25 a
TRT 6 (110° C, 3.0% H ₂ SO ₄)	88.26 ± 1.56 c	0.79 ± 0.25 a
TRT 3 (121° C, 3.0% H ₂ SO ₄)	80.50 ± 1.56 d	0.30 ± 0.25 b

*Tratamientos seguidos de diferente letra son significativamente diferentes (P<0.05).

En el Cuadro 3 se observó que el porcentaje de etanol en el destilado final de los tratamientos 4, 2 y 5 fue el mismo, estadísticamente. Las diferencias en cuanto al porcentaje de metanol entre los seis tratamientos aplicados fueron menos notorias, resultando todos los tratamientos, estadísticamente iguales; menos el tratamiento 3, que tuvo un menor porcentaje de metanol, sin ser diferente al tratamiento 4. Cabe recalcar que entre los tres tratamientos que condujeron a menores rendimientos de etanol están los que fueron sometidos a 3% de ácido sulfúrico (tratamientos 6 y 3, en el Cuadro 4), y esto, probablemente condujo a la producción de compuestos inhibidores de la fermentación a etanol.

4.2. RENDIMIENTO DE ETANOL

Cuadro 4. Rendimiento de etanol lignocelulósico por cada tratamiento.

TRT	Media (mL/100 g) ± D.E
TRT 2 (110° C, 2.5% H ₂ SO ₄)	8.52 ± 0.24 a
TRT 4 (121° C, 2.0% H ₂ SO ₄)	8.34 ± 0.24 a
TRT 1 (110° C, 2.0% H ₂ SO ₄)	7.59 ± 0.24 b
TRT 5 (121° C, 2.5% H ₂ SO ₄)	7.26 ± 0.24 b
TRT 6 (110° C, 3.0% H ₂ SO ₄)	5.97 ± 0.24 c
TRT 3 (121° C, 3.0% H ₂ SO ₄)	5.66 ± 0.24 c

*Tratamientos seguidos de diferente letra son significativamente diferentes (P<0.05).

Naturalmente, al haber obtenido un mayor porcentaje de etanol en la solución final (92 y 94%) de los tratamientos 2 y 4, respectivamente (Cuadro 3), los mayores rendimientos de etanol se obtuvieron de estos mismos (Cuadro 4). Es claro que para el uso de 3% de concentración de ácido sulfúrico, combinado con 121 y 110° C no resultaron efectivos para la producción de etanol a partir de estiércol. Sin embargo, Wen, *et al* (2003), obtuvo un rendimiento de 11.32% de sólo glucosa proveniente de la celulosa del estiércol de ganado lechero, sometiéndolo a 110° C con ácido sulfúrico al 3% durante una hora. Si bien, este estudio se limitó a verificar el rendimiento de azúcares obtenido después del pretratamiento e hidrólisis, no se reportó una fermentación futura que mostrara la conversión de esos azúcares a etanol y así, el efecto de posibles compuestos fenólicos inhibidores de la fermentación.

4.3. Efecto del porcentaje de ácido en el porcentaje de etanol

Cuadro 5. Efecto del porcentaje de ácido sulfúrico en el porcentaje de etanol.

Porcentaje de ácido	Media (%) ± D. E
2.0	91.83 ± 3.40 a
2.5	91.76 ± 3.40 a
3.0	84.37 ± 3.40 b

*Tratamientos seguidos de diferente letra son significativamente diferentes (P<0.05).

Los resultados de este estudio mostraron que la variación entre 2 y 2.5% de ácido sulfúrico no afectaron significativamente la producción de etanol a partir de estiércol de ganado lechero, mas el aumento de la concentración de éste a 3% disminuyó considerablemente el porcentaje de etanol (Cuadro 5). Por otro lado, Iranmahboob (2001), reporta que mayores concentraciones de ácido (5-25%) conducen a mayores rendimientos de azúcares y, por lo tanto, a mayor porcentaje de alcohol; pero estos experimentos fueron

conducidos a temperaturas entre 60-90° C y tiempos entre 20 y 60 minutos, reduciendo así la el tiempo de acción del ácido sulfúrico para la producción de compuestos inhibidores.

4.3.1. Efecto de la temperatura en el porcentaje de etanol

Cuadro 6. Efecto de la temperatura en el porcentaje de etanol.

Temperatura	Media (%) ± D. E
121	91.23 ± 3.40 a
110	87.40 ± 3.40 b

*Tratamientos seguidos de diferente letra son significativamente diferentes (P<0.05).

Se observó que el mayor porcentaje de etanol se obtuvo después de someter el estiércol vacuno a 121° C que a 110° C (Cuadro 6). Al haber mayor temperatura, la velocidad de catálisis se aceleró y el efecto del ácido sulfúrico fue más efectivo para liberar la hemicelulosa y degradar la pared de lignina del estiércol.

4.4. ANÁLISIS DE COSTOS VARIABLES

Cuadro 7. Costos variables del etanol lignocelulósico.

<i>Material</i>	<i>Unidad</i>	<i>Costo/unidad</i>	TRT 2		TRT4	
			Cant.	Costo (L.)	Cant.	Costo (L.)
Estiércol	kg	0.00	1.000	0.00	1.000	0.00
Ácido sulfúrico	L	300.00	3.863	1159.00	3.363	1009.00
Hidróxido de sodio	kg	400.00	0.001	0.28	0.001	0.20
Levaduras	kg	205.00	0.006	1.23	0.006	1.23
Total costos	L			1,160.51		1,010.43
Costo/L	L			14,506.00		12,630.00

Tomando en cuenta los tratamientos con los cuales se obtuvieron los más altos rendimientos de etanol (Cuadro 7), el análisis de costos indicó que el costo de un litro de etanol puro fue L 14,506.00 para el que fue tratado con 110° C y 2.5% de ácido sulfúrico y L 12,630.00 para el etanol obtenido con 121° C y 2% de ácido sulfúrico.

5. CONCLUSIONES

- Se logró la obtención de etanol lignocelulósico a partir del estiércol de ganado lechero en las instalaciones de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano.
- El mayor rendimiento de etanol se obtuvo con: 121° C y 2% de ácido sulfúrico y 110° C con 2.5% de ácido sulfúrico.
- La temperatura y la concentración del ácido sulfúrico son dos parámetros que deben considerarse juntos para definir las condiciones de pretratamiento de materiales lignocelulósicos e hidrólisis de estos mismos.
- El tratamiento que tuvo el menor costo unitario fue 121° C con 2% de ácido sulfúrico, y su precio fue L 12,630.00.

6. RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio en el cual se mida la cantidad de azúcares y los inhibidores producidos durante el pretratamiento, para poder determinar si es la deficiente hidrólisis de la celulosa o la producción de inhibidores lo que limita el rendimiento de etanol.
- Realizar un estudio en el cual se evalúen otras variables determinantes en el pretratamiento, como el tiempo de decristalización, el efecto de otros ácidos y el contenido de nitrógeno del estiércol pretratado.
- Evaluar el uso de bacterias transgénicas como agentes fermentadores resistentes a los compuestos inhibidores de la fermentación de azúcares.
- Realizar un estudio de las condiciones para la hidrólisis posterior al pretratamiento del estiércol de ganado lechero.
- Implementar técnicas como la microfiltración para la remoción de los compuestos inhibidores previo a la fermentación

7. BIBLIOGRAFÍA

Chandel, A.; Subravaram, R.; Narasu, R.; Venkateswar, L. 2007. Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal (en línea). Consultado el 14 de septiembre de 2008. Disponible en: <http://www.academicjournals.org/BMBR/PDF/pdf2007/Feb/Chandel%20et%20al.pdf>

Iranmahboob, J., 2002. Optimizing acid-hydrolysis: a critical step for production of ethanol from mixed wood chips. *Biomass and Bioenergy* no. 22: 401-404.

Liao, W; Liu, Y; Liu, C; Chen, S. 2003. Optimizing dilute acid hydrolysis of hemicelluloses in a nitrogen-rich cellulosic material—dairy manure (en línea). Consultado el 14 de junio de 2008. Disponible en: www.sciencedirect.com

Liao, W; Liu, Y; Wen, Z; Chen, S. 2005. Acid Hydrolysis of fibers from Dairy manure (en línea). Consultado el 10 de junio de 2008. Disponible en: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6V24-4H4T0RF-1&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&_view=c&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=0c409cbca47656a8edd61697cd765ae8

Majovic, L. 2006. Production of bioethanol from corn meal hydrolyzates. *Biomass and Bioenergy* no. 30: 201-408.

Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Zacchi, G. 1996. The effect of water-soluble inhibitors from steam-pretreated willow on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. *Enz. Microbiology Technology*. 20: 470-476.

RTCA (Reglamento Técnico Centroamericano, CA). 2005. Biocombustibles: Etanol Carburante Hidratado: Especificaciones (en línea). Consultado el 14 de septiembre de 2008. Disponible en: <http://www.reglatec.go.cr/descargas/RTCAEtanolCarburanteHidratado-RevGuatemalaIn2007.pdf>

RFA (Renewable Fuel Association, US). 2007. Ethanol Fuel: Specifications - Fuel Ethanol (en línea). Consultado el 14 de septiembre de 2008). Disponible en: <http://www.ethanolrfa.org/objects/pdf/newRFA%20Fuel%20Ethanol%20960501.pdf>

Sánchez G. 2003. Dilute-acid hydrolysis for fermentation of the Bolivian straw material Paja Brava (en línea). Consultado el 14 de junio de 2008. Disponible en: www.sciencedirect.com

Tamers M, 2006. Distinguishing Between 'Bio-Ethanol' and Petroleum Ethanol (en línea). Consultado el 14 de septiembre de 2008. Disponible en: http://www.ethanolproducer.com/article.jsp?article_id=2077

Wen, Z; Liao, W; Chen, S. 2003. Hydrolysis of animal manure lignocellulosics for reducing sugar production (en línea). Consultado el 14 de junio de 2008. Disponible en: www.sciencedirect.com

8. ANEXOS

Anexo 1. Cuadro SAS para grado de alcohol.

Sistema SAS					
Procedimiento GLM					
Variable dependiente: GRADO DE ALCOHOL					
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	14	419.5960472	29.9711462	70.61	<.0001
Error	21	8.9130500	0.4244310		
Total correcto	35	428.5090972			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	GA Media	
	0.979200	1.201882	0.651484	54.20528	
Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
TRT	5	407.3868524	81.4773705	191.97	<.0001
BLOQUE	2	0.0525190	0.0262595	0.06	0.9402
BLOQUE*TRT	7	5.8229746	0.8318535	1.96	0.1101

Procedimiento GLM			
Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para GA			
NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.			
Alfa			0.05
Error de grados de libertad			21
Error de cuadrado medio			0.424431
Valor crítico del rango estudentizado			4.42436
Diferencia significativa mínima			1.1767
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
Tukey Agrupamiento	Media	Número de observaciones	TRT
A	60.1333	6	1212
B	55.7500	6	1212.5
C	54.4150	6	1102.5
C	54.0000	6	1102
D	51.7667	6	1103
E	49.1667	6	1213

Anexo 2. Cuadro SAS para porcentaje de alcohol.

Procedimiento GLM						
Variable dependiente: ETANOL						
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F	
Modelo	14	955.239639	68.231403	27.98	<.0001	
Error	21	51.202150	2.438198			
Total correcto	35	1006.441789				
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	ETAN Media		
	0.949126	1.748167	1.561473	89.32056		
Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F	
TRT	5	514.6648929	102.9329786	42.22	<.0001	
BLOQUE	2	16.4391456	8.2195728	3.37	0.0537	

Procedimiento GLM						
Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para ETAN						
NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.						
Alfa						0.05
Error de grados de libertad						21
Error de cuadrado medio						2.438198
Valor crítico del rango estudentizado						4.42436
Diferencia significativa mínima						2.8204
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.						
Tukey Agrupamiento		Media	Número de observaciones	TRT		
	A	93.7133	6	1212		
B	A	91.7583	6	1102.5		
B	A	91.7517	6	1212.5		
B	C	89.9550	6	1102		
	C	88.2450	6	1213		
	D	80.5000	6	1103		

Anexo 3. Cuadro SAS para porcentaje de metanol.

Procedimiento GLM						
Variable dependiente: METAN						
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F	
Modelo	14	3.04397500	0.21742679	3.35	0.0062	
Error	21	1.36350000	0.06492857			
Total correcto	35	4.40747500				
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	METAN Media		
	0.690639	36.70745	0.254811	0.694167		
Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F	
TRT	5	1.42902143	0.28580429	4.40	0.0067	
BLOQUE	2	0.45208254	0.22604127	3.48	0.0495	
BLOQUE*TRT	7	0.96089921	0.13727132	2.11	0.0872	

Procedimiento GLM			
Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para METAN			
NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.			
Alfa			0.05
Error de grados de libertad			21
Error de cuadrado medio			0.064929
Valor crítico del rango estudentizado			4.42436
Diferencia significativa mínima			0.4602
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
Tukey Agrupamiento		Número de Media observaciones	TRT
	A	0.9033	6 1102
	A	0.8083	6 1212.5
	A	0.7867	6 1213
	A	0.7850	6 1102.5
	B A	0.5867	6 1212
	B	0.2950	6 1103

Anexo 4. Cuadro SAS para rendimiento de etanol.

Procedimiento GLM					
Variable dependiente: RENDETANOL					
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	14	45.22803056	3.23057361	56.61	<.0001
Error	21	1.19842500	0.05706786		
Total correcto	35	46.42645556			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	RENETANOL Media	
	0.974187	3.305911	0.238889	7.226111	
Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
TRT	5	39.39704643	7.87940929	138.07	<.0001
BLOQUE	2	0.41768849	0.20884425	3.66	0.0433
BLOQUE*TRT	7	2.45707183	0.35101026	6.15	0.0005

Procedimiento GLM			
Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para RENDETANOL			
NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.			
Alfa			0.05
Error de grados de libertad			21
Error de cuadrado medio			0.057068
Valor crítico del rango estudentizado			4.42436
Diferencia significativa mínima			0.4315
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
Tukey Agrupamiento	Media	Número de observaciones	TRT
A	8.5217	6	1102.5
A	8.3400	6	1212
B	7.5900	6	1102
B	7.2650	6	1212.5
C	5.9733	6	1103
C	5.6667	6	1213