

Jorge Washington Delgado Noboa

Producción de etanol anhidro a partir de la fermentación de residuos de cacao para uso como biocombustible

Director/es

Peña Llorente, José Ángel
Soler Herrero, Jaime

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

PRODUCCIÓN DE ETANOL ANHIDRO A PARTIR
DE LA FERMENTACIÓN DE RESIDUOS DE CACAO
PARA USO COMO BIOCOMBUSTIBLE

Autor

Jorge Washington Delgado Noboa

Director/es

Peña Llorente, José Ángel
Soler Herrero, Jaime

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Ingeniería Química y del Medio Ambiente

2023

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA



**Departamento de Ingeniería
Química y Tecnologías
del Medio Ambiente**

Universidad Zaragoza



Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías
del Medio Ambiente

Instituto de Investigación en Ingeniería de Aragón

***Producción de etanol anhidro a partir de la
fermentación de residuos de cacao para
uso como biocombustible***

Memoria para optar al grado de Doctor por la
Universidad de Zaragoza presentada por:

Jorge Delgado Noboa

2022

AGRADECIMIENTOS

“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad”

Albert Einstein

En el año 2014, luego de haber transcurrido siete años de mi titulación como Ingeniero Químico y un año de la titulación como Magíster en Planificación y Gestión Energética, tuve la oportunidad de conocer al Dr. Jaime Soler Herrero, quien por un proyecto entre la Universidad de Cuenca y La Universidad de Zaragoza viajo a Ecuador. En su primera estancia pude participar de varias actividades que él desarrolló, es así que, tras sus conferencias, charlas y experiencias, la investigación llamó a mi puerta y me inscribí al Doctorado en Ingeniería Química y del Medio Ambiente en la Universidad de Zaragoza, teniendo el apoyo del Dr. Miguel Menéndez Sastre Coordinador del Programa de Doctorado. Meses más tarde me admitieron al programa y me asignaron como tutores a los Doctores Jaime Soler Herrero y José Ángel Peña Llorente.

Esta etapa de mi vida desde el 2015 hasta el 2022 ha sido llena de aprendizajes, constantes cambios y desafíos en todos los ámbitos de mi vida, generando un gran impacto en el plano académico y profesional, pero sobre todo en el ámbito emocional, afectivo y personal.

A lo largo de este tiempo y pese a los inconvenientes que se presentaron, los malos momentos, las largas jornadas de trabajo, las noches sin dormir y el estrés permanente, no fueron motivos suficientes para arrepentirme de esta decisión que ha forjado mi carácter y me ha permitido ampliar mi

conocimiento para ponerlo a disposición de las nuevas generaciones de Ingenieros Químicos de mi ciudad y país.

Por las experiencias vividas, por los conflictos resueltos, por las amistades sinceras y verdaderas, por el amor incondicional y por el crecimiento personal y profesional, quiero dar las gracias.

Quiero agradecer primero a Dios y la Virgen María, por iluminar mi vida y mi mente, ser mi fuerza y poner en mi camino personas que han sido mi soporte, fortaleza y compañía durante esta etapa.

A la Universidad de Zaragoza, a todo su personal, y de manera especial a los Doctores Miguel Menéndez Sastre, Javier Herguido Huerta, José Ángel Peña Llorente y Jaime Soler Herrero, por su apoyo en diferentes etapas de mi formación doctoral que han reafirmado la trayectoria de apoyo y amistad entre la Universidad de Zaragoza y la Universidad de Cuenca.

De manera especial agradezco a mis Directores-Tutores, los Doctores Jaime Soler Herrero y José Ángel Peña Llorente, quienes con su conocimiento y su paciencia me han permitido alcanzar esta meta, gracias de todo corazón. Porque me han brindado la oportunidad de aprender de ustedes, de su larga trayectoria tanto académica como investigadora, así como de la capacidad para resolver problemas, del ingenio con el que cuentan y del elevado espíritu altruista que poseen.

Gracias a la Universidad de Cuenca, por el apoyo en varias actividades desarrolladas en este tiempo, a compañeros, colegas y amigos; a los estudiantes de Ingeniería Química por involucrarse en la investigación, obteniendo como resultado que muchos se apasionen por esta área del conocimiento y deseen continuar con su formación profesional. A ustedes mis queridos estudiantes va mi agradecimiento y la dedicatoria de esta

tesis, para que con su esfuerzo y capacidad puedan alcanzar sus objetivos en la vida y logren ir más allá de lo que el medio les permita desarrollarse.

Sin duda alguna, mi mayor agradecimiento va para mi familia, mi cable a tierra, a mi esposa Stephany, a mis hijos Jorge Andrés y Victoria Fernanda, a mis padres Jorge Vicente y María Luisa, por ser mi fuerza impulsora y mi refugio en mis peores momentos. Gracias a ustedes, ya que en todo este tiempo fueron los más sacrificados, no se olviden que son y serán lo mejor de vida. Gracias también a mis hermanas, sobrinos y sobrinas.

Finalmente, doy gracias a la vida, por lo que pone, por lo que quita y por lo que acomoda, permitiéndome comprender que nuestra estancia en este mundo es tan corta, que oscurecerla, es una pérdida de tiempo y energía.

“Solo un exceso es recomendable en el mundo, y es el exceso de gratitud”

Jean de la Bruyère

Índice

1.	Introducción	3
1.1.	Contexto actual de la crisis energética	3
1.1.1.	Mercado energético	4
1.1.2.	Mercado energético en Ecuador	6
1.2.	Biocombustibles	10
1.2.1.	Bioetanol	14
1.2.2.	Gasolina Ecopaís	15
1.2.3.	Ventajas de la producción de bioetanol	18
1.2.4.	Desventajas del uso de bioetanol	19
1.2.5.	Uso de desechos agroindustriales para producción de biocombustibles	21
1.2.6.	Producción industrial de etanol a partir de residuos	22
1.2.7.	Industria del cacao	28
1.3.	Producción de etanol a partir de mucílago de cacao	31
1.3.1.	Proceso fermentativo	33
1.3.2.	Cinéticas de producción de etanol	35
1.3.3.	Destilación de mezclas etanol-agua	35
1.4.	Objetivos de la Tesis	38
1.4.1.	General	38
1.4.2.	Específicos	38
1.5.	Resumen de la sección	39
2.	Fermentación del Mucílago	43
2.1.	Caracterización del mucílago de cacao CCN-51	43
2.1.1.	Muestreo y almacenamiento	43

2.1.1.1. Selección	44
2.1.1.2. Recolección	46
2.1.1.3. Extracción del mucílago	48
2.1.1.4. Estandarización	51
2.1.2. Caracterización del mucílago	52
2.1.3. Determinación de azúcares	53
2.1.4. Análisis de micronutrientes, carbono orgánico total y nitrógeno	55
2.1.5. Poder calorífico	57
2.2. Levadura	58
2.3. Antiespumantes	60
2.3.1. Análisis de la eficacia de los antiespumantes	61
2.4. Fermentación	63
2.4.1. Biorreactor	64
2.4.1.1. Acondicionamiento y operación del biorreactor	66
2.4.1.2. Parámetros óptimos de operación	69
2.4.2. Modelización	75
2.4.2.1. Modelo de Gompertz modificado	77
2.4.2.2. Modelo de Monod	80
2.4.2.3. Modelo logístico	81
2.4.2.4. Modelo de Andrews y Levenspiel	83
2.5. Resumen de la sección	89
3. Purificación del Etanol	93
3.1. Destilación	94
3.1.1. Destilación simple	96

3.1.2.	Destilación con reflujo	98
3.1.3.	Destilación extractiva con glicoles	101
3.2.	Adsorción mediante tamices moleculares	104
3.2.1.	Modelos matemáticos de la adsorción	108
3.2.1.1.	Modelo de Yoon-Nelson	110
3.2.1.2.	Modelo del Tiempo de Servicio de la Altura de un Lecho (BDST)	112
3.2.1.3.	Modelo de Thomas	114
3.2.1.4.	Modelo de Dosis Respuesta	116
3.2.1.5.	Modelo de Wolborska	118
3.2.1.6.	Modelo de Adams-Bohart	120
3.3.	Resumen de la sección	121
4.	Simulación del proceso	125
4.1.	Simulación del modelo de fermentación	125
4.1.1.	Modelado de sistemas mediante ecuaciones diferenciales parciales	126
4.2.	Simulación del proceso en Aspen Plus	130
4.2.1.	Fermentación	133
4.2.1.1.	Pasteurización e inversión de azúcares	134
4.2.1.2.	Acondicionamiento	135
4.2.1.3.	Reactor de fermentación	135
4.2.1.4.	Recuperación de etanol	136
4.2.2.	Deshidratación	138
4.2.2.1.	Eliminación de incondensables	139
4.2.2.2.	Destilación primera etapa	141
4.2.2.3.	Destilación con reflujo segunda etapa	143

4.2.2.4. Destilación extractiva	146
4.2.2.5. Filtración por tamices moleculares	149
4.3. Análisis Económico	151
4.3.1. Costes de capital (CAPEX)	153
4.3.2. Costes operacionales (OPEX)	154
4.4. Resumen de la sección	157
5. Resumen de los resultados	161
5.1. Producción industrial de etanol a partir de residuo mucilaginoso de cacao	161
5.2. Caracterización del mucílago de cacao CCN-51	162
5.3. Operación en biorreactor tipo <i>batch</i> (CSTR)	163
5.4. Métodos Analíticos y Modelado Cinético de la fermentación del mucílago de cacao CCN-51	165
5.5. Purificación del Etanol	167
5.6. Modelado cinético del proceso con el uso de <i>Aspen Custom Modeler</i> (ACM)	169
5.7. Simulación en <i>Aspen Plus</i> y análisis tecnoeconómico	170
6. Conclusiones	177
Anexo A. Cultivo de Cacao en el Ecuador durante el año 2015	181
Anexo B. Cuantificación de Grados Brix y pH	185
Anexo C. Cuantificación Acidez titulable	186
Anexo D. Determinación del Ácido Acético	187
Anexo E. Espectrometría de absorción atómica para la cuantificación de sodio, potasio, calcio y mercurio	189
Anexo F. Espectroscopia FT-IR	191
Anexo G. HPLC para determinación de azúcares	193
Anexo H. Espectrofotometría UV-visible para la cuantificación de azúcares totales	195

Anexo I. Determinación de micronutrientes mediante detección de trazas por Espectrometría de Masas	197
Anexo J. Determinación del Carbono orgánico total	199
Anexo K. Determinación de nitritos	201
Anexo L. Determinación de nitrógeno de amoníaco	202
Anexo M. Poder calorífico por bomba calorimétrica	203
Anexo N. Determinación de la concentración peso/volumen de etanol [g/L]	205
Anexo O. Cuantificación de biomasa mediante liofilización	207
Anexo P. Conteo de levaduras	208
Anexo Q. Artículo sobre el modelado de la obtención de etanol	210
Anexo R. Índice de refracción	217
Anexo S. Análisis de las muestras de alcohol en los destilados	219
Anexo T. Determinación del método de discretización	222
Anexo U. Simulación mediante Aspen Plus	224
U.1. Inicio de la simulación	224
U.1.2. Selección de unidades	225
U.1.3. División del proceso en módulos y modelos	225
U.2. Estructuración y especificación de las condiciones de operación	227
U.2.1. Fermentación	227
U.2.2. Recuperación de etanol	229
U.2.3. Especificación de diseño	232
U.2.4. Destilación y Rectificación	235
U.2.5. Destilación extractiva	239
U.2.6. Tamices moleculares	242

U.3. Análisis de Costes	247
7. Bibliografía	251

Capítulo I

Introducción



1. Introducción

1.1. Contexto actual de la crisis energética

Los combustibles fósiles, como el petróleo, el carbón y el gas natural, se han convertido en las principales fuentes de energía en la era actual. Sin embargo, se prevé que estas fuentes se agotarán en los próximos 40 a 50 años. Los daños ambientales provocados por su uso, como el calentamiento global, la lluvia ácida y el *esmog* urbano, han llevado a la humanidad a buscar nuevas formas de utilizar las energías renovables como la solar, eólica, biocombustible, etc. que son menos dañinas para el medio ambiente de forma sostenible (Saini et al., 2015; Simkin & Dibb, 2011). Aunque su expansión se ha visto limitada, como puede verse en la Figura 1.1, debido a sus elevados requerimientos tecnológicos y elevados costes (Datta et al., 2019; Viesturs & Melece, 2014). La energía nuclear es objeto de controversias, por lo que en muchos países está siendo reemplazada debido a su peligrosidad. Este hecho, aunado a los riesgos geopolíticos relacionados con el mercado energético, ha impulsado el desarrollo e investigación de nuevas fuentes energéticas (García, 2018; IEA, 2018).

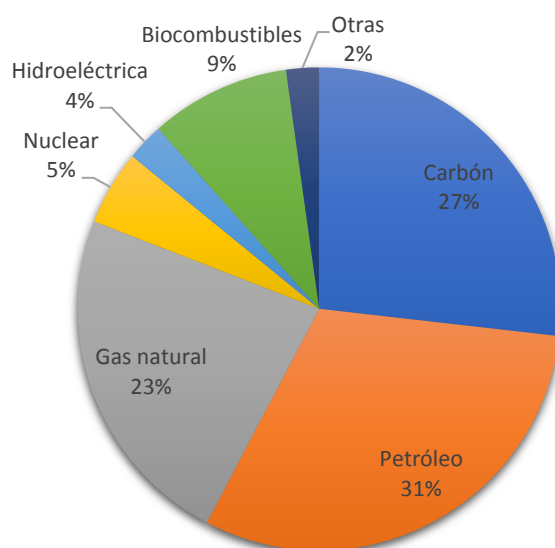


Figura 1.1. Matriz producción primaria Mundial en 2019. Adaptado de Olade (2021)

1.1.1. Mercado energético

El mercado energético es muy susceptible a cambios drásticos interanuales, como lo destacan las estadísticas de la Agencia Internacional de Energía (IEA), al ser un mercado muy dependiente de las influencias geopolíticas (IEA, 2019b). Esta variabilidad también es debida a la gran dependencia del mercado energético, tanto los mercados bursátiles como las de las políticas estatales y regionales (García, 2019). Dado que el petróleo y gas natural son materiales no renovables obtenidos por extracción, son pocos los países con participación representativa (Figura 1.2) (IEA, 2018).

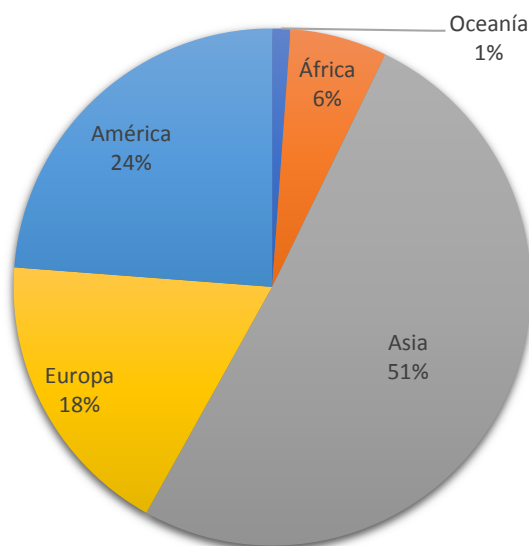


Figura 1.2. Producción energética por continente en 2019. Adaptado de Olade (2021).

A esta concentración de países representativos en el mercado energético, se debe agregar la limitada variedad de fuentes, las mismas que han permanecido casi invariantes en las últimas décadas (Tabla 1.1). Solo en los años recientes han crecido ligeramente las producciones energéticas alternativas, como la energía eólica o solar (Höök & Tang, 2013). A pesar de los avances tecnológicos y mejoras en la eficiencia, los combustibles fósiles siguen dominando más del 80 % del mercado y esta situación se puede atribuir a la facilidad de transporte, producción y utilización (IEA, 2019b).

Tabla 1.1. Comparativa porcentual de la producción energética entre los años 1976 - 2019. Adaptado de Olade (2021).

<i>Fuente energética</i>	<i>1976</i>	<i>2019</i>
Carbón	24.7	26.8
Petróleo	46.2	30.9
Gas natural	16.1	23.2
Nuclear	0.9	5.0
Hidroeléctrica	1.8	2.5
Biocombustibles	10.2	9.4
Otras	0.1	2.2

El consumo energético ha crecido de manera notable en las últimas décadas, impulsado por el aumento poblacional y nuevos requerimientos energéticos producto del avance tecnológico en áreas como el transporte y productos electrónicos. Este crecimiento no se produjo de manera homogénea, siendo los países desarrollados donde se produjo el mayor incremento. En particular, se acentuó en la región del Asia-Pacífico gracias al auge de las economías de China, India, Vietnam, Corea del Sur y Japón (Mofijur et al., 2015), como puede apreciarse en la Figura 1.3.

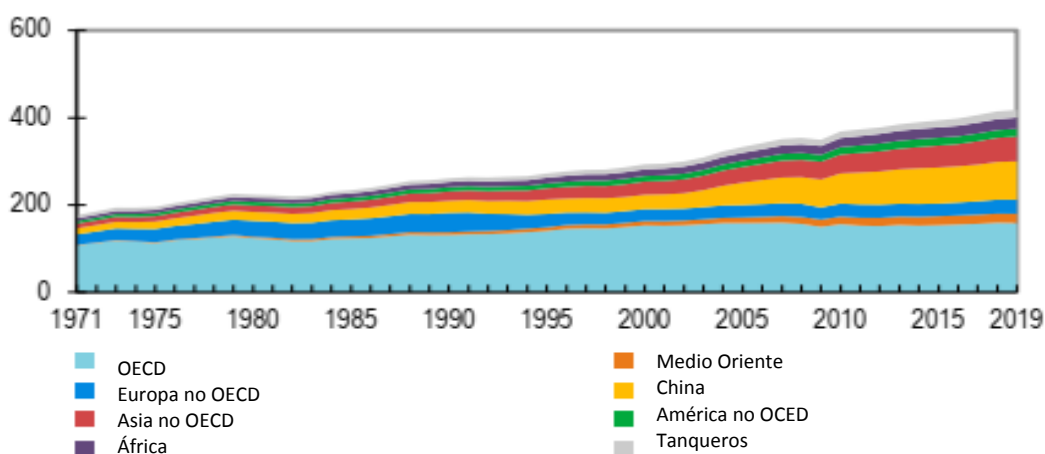


Figura 1.3. Consumo energético por región desde 1971 al 2019. Adaptado de Olade (2021).

La producción eléctrica en la región latinoamericana, por su parte, se encuentra dominada por la producción hidroeléctrica y termoeléctrica, con un porcentaje mayor al 85 % del mercado (Figura 1.4). Esto, junto con marcadas variaciones de producción interanual, son explicables por la situación geopolítica (García, 2018; IEA, 2018).

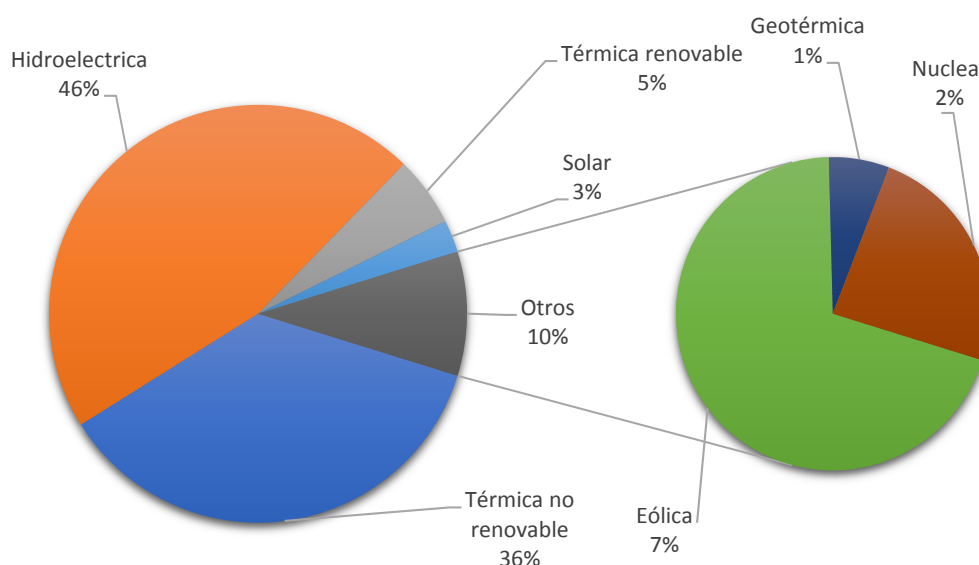


Figura 1.4. Producción energética en Latinoamérica (Olade, 2021).

1.1.2. Mercado energético en Ecuador

Dada la limitada producción de Ecuador comparada con los países de la región, este representa una parte muy pequeña del mercado energético latinoamericano, siendo su mercado principalmente representado por la explotación petrolífera e hidroeléctrica (Figura 1.5) (ESIN, 2014; IEA, 2018; Olade, 2021). Por su parte, el mercado de generación eléctrica está dominado por la producción hidroeléctrica (Figura 1.6). Al ser un país pobremente industrializado, sus necesidades energéticas provienen principalmente del transporte (Figura 1.7). Por otro lado, en lo que respecta al aprovechamiento de la biomasa, el uso de leña ha disminuido de manera constante en años recientes, mientras que la producción de etanol carburante ha disminuido a partir del año 2018, producto del ya mencionado cambio de políticas públicas, combinado con los estragos de la pandemia del COVID-19 (Figura 1.8) (Olade, 2021).

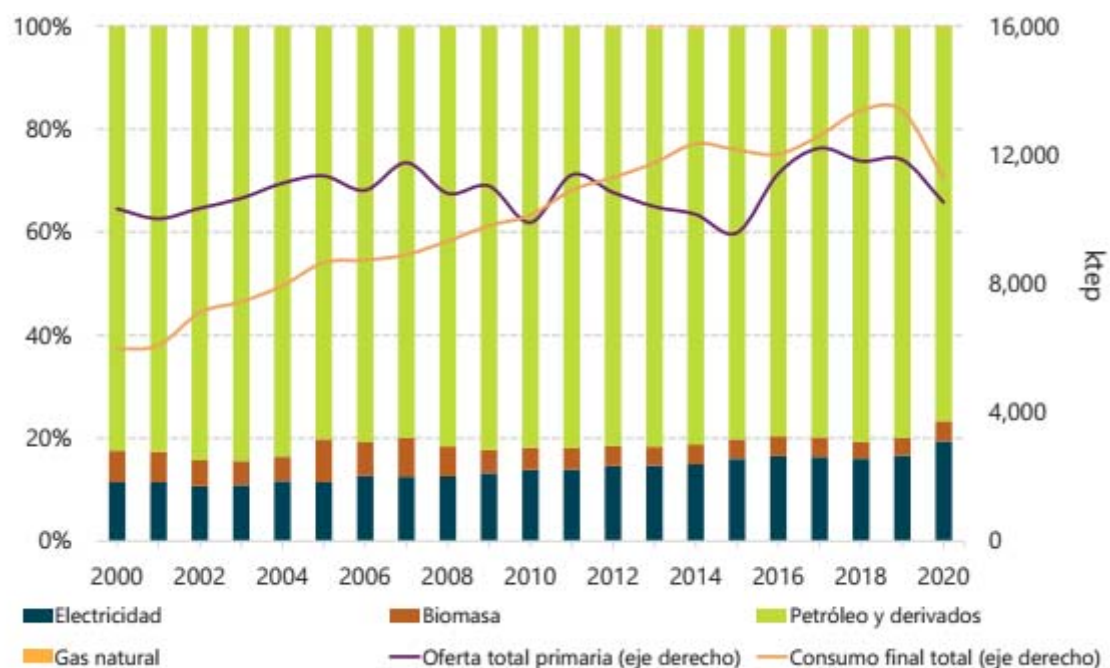


Figura 1.5. Consumo energético en Ecuador entre 2000 y 2020 (Olade, 2021).



Figura 1.6. Producción eléctrica por fuente en Ecuador 2000-2020 (Olade, 2021).

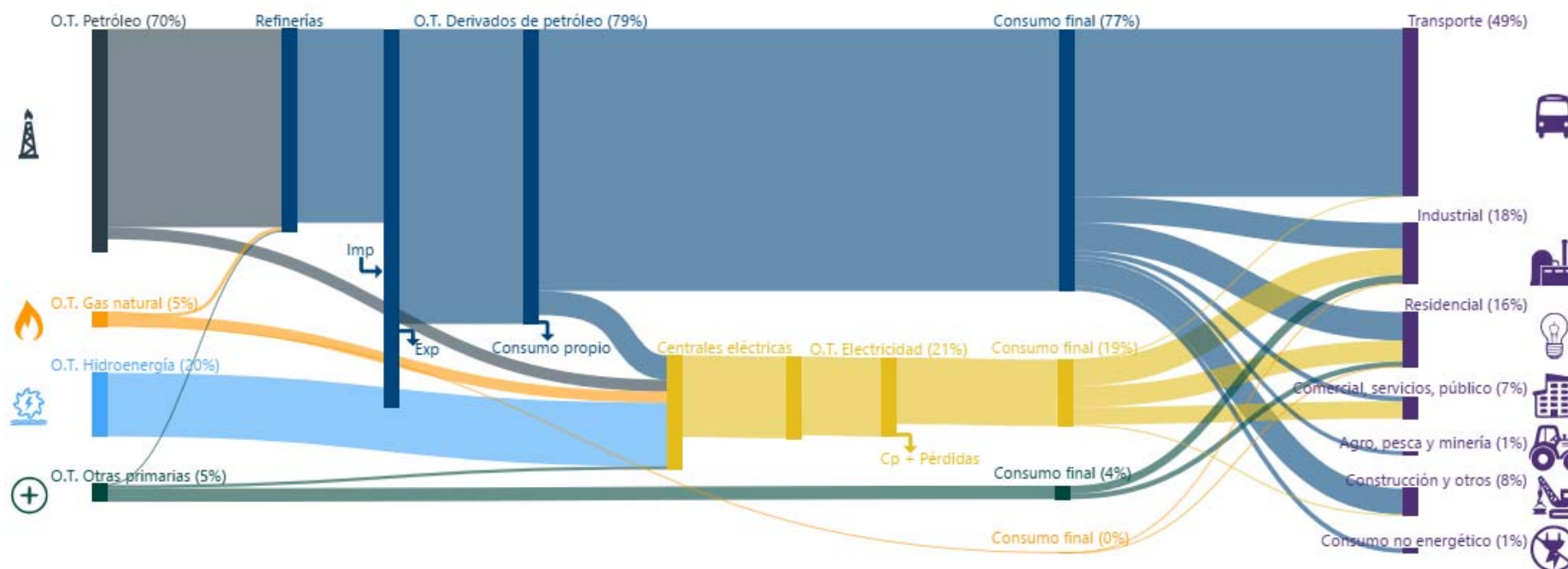


Figura 1.7. Balance energético del Ecuador durante el año 2020 (Olade, 2021).

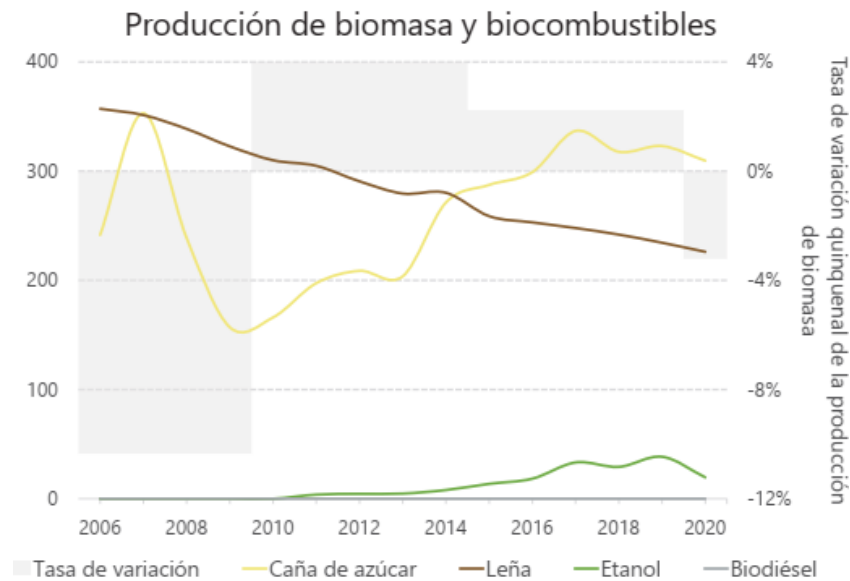


Figura 1.8. Producción de biomasa y biocombustibles en Ecuador (Olade, 2021).

Como puede intuirse a partir de los datos presentados en la Figura 1.8, la biomasa aún puede considerarse una fuente energética atractiva, al ser el Ecuador un país mayoritariamente agrícola, se consideró analizar una agroindustria como es la cacaotera. El cultivo del árbol de cacao a gran escala se ha implementado en varios países tropicales a lo largo del mundo, siendo sus semillas la materia prima principal para la manufactura del chocolate, industria que mueve miles de millones de dólares anualmente (Kadow et al., 2015). La explotación de semillas de cacao genera abundantes residuos (entre cáscaras y mucílago), biomasa residual que en Ecuador no ha sido valorada como recurso energético, siendo considerados desechos, que al ser dejados a la intemperie pueden constituirse focos de propagación de plagas y enfermedades que generan pérdidas en el sector cacaotero de alrededor del 4 % de su producción (ESIN, 2014). El aprovechamiento de estos desechos es una alternativa que contribuye económica y ambientalmente; también aporta en el cambio de la matriz energética y productiva que impulsa el Estado ecuatoriano, así como en el Plan Nacional del Buen Vivir (CNP, 2017).

1.2. Biocombustibles

El término *biocombustible* o *agrocombustible*, se aplica a combustibles líquidos o gaseosos para el sector del transporte que se producen principalmente a partir de biomasa. Se puede producir una variedad de combustibles a partir de los recursos de biomasa, incluidos los combustibles líquidos, como el etanol, el metanol, el biodiésel, el diésel o gasolina *Fischer-Tropsch* y los combustibles gaseosos, como el hidrógeno y el metano (Demirbas, 2008). Aunque los más empleados son el bioetanol y el biodiésel (Martínez & Montoya, 2013; Pulyaeva et al., 2020).

Un biocombustible puede funcionar tanto como un combustible o como un aditivo. Un ejemplo lo constituye la estrategia de mezclar el combustible con etanol (Shahi & Khajeh Mehrizi, 2021). Por lo que son considerados como una alternativa productiva para países en desarrollo, como es el caso de Ecuador. Estas incluyen razones de seguridad energética, preocupaciones ambientales, ahorro de divisas y problemas socioeconómicos relacionados con el sector rural (Demirbas, 2008).

La biomasa lignocelulósica es una de las fuentes de energía alternativa más adecuadas para hacer frente a los retos de la seguridad energética (Tayyab et al., 2018). La celulosa y la hemicelulosa se pueden procesar química y enzimáticamente para producir glucosa y xilosa (Zamora et al., 2014). Sin embargo, el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica a menudo libera una variedad de compuestos inhibidores de la fermentación. Estos se pueden clasificar en: ácidos débiles (ácido acético, ácido fórmico y ácido levulínico), derivados de furano (furfural y 5-hidroximetilfurfural) y compuestos fenólicos (ácido cumárico, siringaldehído y vainillina) (J. S. Lee et al., 2013).

La sacarosa y fructosa se pueden incorporar mediante rutas metabólicas convergentes a la fermentación para sintetizar etanol. Sin importar la materia prima, el etanol se debe someter a un proceso de refinación para usarse como biocombustible (ver Figura 1.9) (Zamora et al., 2014).

La eficiencia de la producción de etanol está restringida principalmente por la materia prima escogida, aunque puede mejorarse sustancialmente, manipulando factores como temperatura, concentración o la cepa de levadura a utilizarse. Si bien es cierto, teóricamente es posible emplear cualquier tipo de biomasa vegetal, rango que va desde alimentos ricos en azúcares simples hasta desechos agrícolas ricos en celulosa, no todos pueden considerarse económicamente viables. Lo cual permite clasificar en varios tipos, llamados *generaciones*, dependiendo del tipo de azúcar más abundante (Ramos et al., 2016). Siendo los dos principales:

- a. **Primera generación:** están directamente relacionados con una biomasa generalmente comestible. Se producen a partir de aceites o azúcares comestibles vegetales (maíz, caña de azúcar, girasol o soja). Si tiene alto contenido de azúcares, se opta por convertirlos en alcoholes por fermentación. Si se parte de plantas ricas en grasas o aceites, se recurre a una transesterificación para generar ésteres grasos (R. A. Lee & Lavoie, 2013).
- b. **Segunda generación:** Se obtienen de materias primas no aprovechables para alimentación humana, como residuos forestales y agrícolas con un elevado contenido de celulosa y lignina. También pueden considerarse como materia prima residuos alimenticios, como el aceite reciclado de cocina, pues estos ya no tienen un uso alimentario. Hay varias formas de producirlos, de las cuales la vía bioquímica y la termoquímica son las más conocidas. La primera emplea microorganismos para reducir a azúcares simples las moléculas de celulosa. La forma termoquímica utiliza alta presión y temperatura para pasar de una amplia variedad de tipos de biomasa a combustibles (R. A. Lee & Lavoie, 2013).

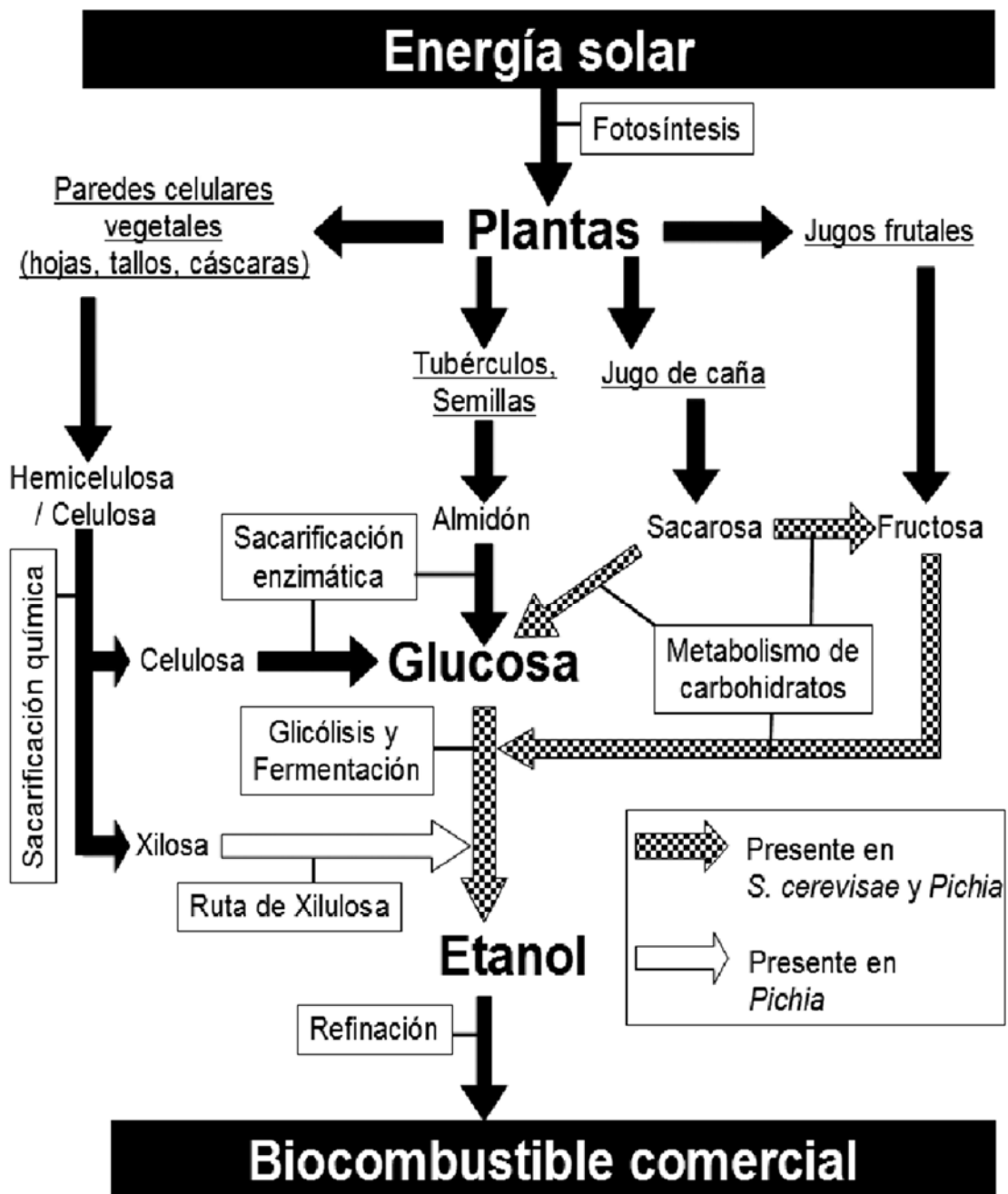


Figura 1.9. Materias primas, rutas metabólicas y procesos para la producción de bioetanol. Adaptado de Zamora et al. (2014).

Actualmente, la principal materia prima para la producción de etanol es la caña de azúcar, en forma de jugo de caña o como melazas, seguida por el maíz (Naik et al., 2010; Saura et al., 2009). Es posible obtener cerca de 70 L de etanol/ton de caña, y si se emplean melazas, se obtienen alrededor de 250 L de etanol y unos 100 kg de azúcar. En lo concerniente al rendimiento de producción, se ha estimado un rendimiento de 219 litros de etanol a partir de 1 tonelada de melazas con un contenido de azúcares de 46 %, le sigue el maíz con una producción de 442 L/ton (Saura et al., 2009). La predilección por el uso de la caña de azúcar como materia prima, se justifica por requerir una cantidad inferior de energía, maquinaria y mano de obra para su recolección y tratamiento previo para la fermentación y el no requerimiento de digestión enzimática para volverlo hidrolizable, como sucede con el maíz o fuentes lignocelulósicas como residuos madereros o agrícolas.

En Ecuador, el desarrollo de biocombustibles fue promovido por el Plan Nacional del Buen Vivir (CNP, 2017), en particular promoviendo la producción de etanol. En concordancia con lo señalado en el Decreto Ejecutivo No. 1303, el que detalla que el Código Orgánico de la Producción, Comercio e Inversiones, busca fomentar la producción nacional, comercio y consumo sustentable de bienes y servicios con responsabilidad social y ambiental, así como su comercialización y uso de tecnologías ambientalmente limpias y de energías alternativas (Erique, 2017).

1.2.1. Bioetanol

El bioetanol (o etanol de origen orgánico) es obtenido mediante un proceso similar a la preparación de la cerveza, donde azúcares son fermentados y convertidos en etanol, el cual es destilado y purificado. Este combustible es utilizado para incrementar el octanaje y mejorar la calidad de las emisiones de la gasolina, al convertirla en un combustible oxigenado (Gupta & Verma, 2015).

El empleo de otras sustancias como reemplazo o aditivo a los combustibles fósiles no es una idea moderna, estando presente ya varias décadas en el mercado (Amorim et al., 2011). En particular, el uso del etanol como aditivo proviene de finales del siglo XIX, dado que su densidad energética es 30 J/kg y genera 1.91 kg de CO₂/kg de etanol (Almas, 2014). La eficiencia de la producción de etanol ha aumentado constantemente, pero solo los créditos fiscales hacen que el etanol combustible sea comercialmente viable porque los precios del petróleo son, comparablemente, bajos. La motivación original para la producción de etanol combustible fue volverse más independiente de las importaciones de petróleo; ahora, el énfasis está en su uso como aditivo de la gasolina (Wheals, 1999).

La producción y posterior uso del etanol como agente carburante es objeto de polémica, ya que, para unos, se perfila como un recurso energético potencialmente sostenible que puede ofrecer ventajas medioambientales y económicas a largo plazo en contraposición a los combustibles fósiles; mientras que, para otros, es el responsable de grandes deforestaciones y del aumento del precio de los alimentos, al suplantar selvas y terrenos agrícolas para su producción (Giampietro & Mayumi, 2009). Actualmente, los principales desafíos científicos son el desarrollo de nuevas tecnologías para la producción de bioetanol a partir de materias primas de primera y segunda generación que presenten balances energéticos positivos y cumplan adecuadamente los criterios de sostenibilidad ambiental (Amorim et al., 2011).

La materia prima para la producción de bioetanol puede clasificarse en:

- **Alto contenido de sacarosa:** Azúcar, remolacha, sorgo dulce o melaza.
- **Alto contenido de almidón:** Maíz, papa o mandioca.
- **Alto contenido de celulosa:** Madera o residuos agrícolas.

Dada la gran variedad de materias primas que pueden ser considerados para este fin, es necesario establecer su viabilidad y seleccionar el proceso con la mejor relación rendimiento/costo. Los criterios que pueden ser usados para esta selección, según Humbird et al. (2011), son:

- Disponibilidad en el ámbito local y garantía de accesibilidad durante un periodo de tiempo suficientemente largo, o que pueda ser almacenada durante un periodo razonable de tiempo.
- No requerir pretratamientos costosos, que podrían encarecer el procesamiento, volviéndolo económicamente inviable.
- Disposición de cantidades apreciables y no poseer aplicaciones o usos competidores con el proceso a implementarse.
- Existencia de programas de incentivo gubernamentales que prioricen el uso de biocombustibles o subsidios en su producción.

1.2.2. Gasolina Ecopaís

En Ecuador, el principal exponente de los biocombustibles es una variante de la gasolina denominada *Ecopaís*, la cual es una mezcla de etanol para combustibles o etanol carburante. Los requerimientos del etanol carburante se detallan en la Tabla 1.2, mismos que debe cumplir el producto obtenido en esta investigación. Su producción empezó en el año 2010, implementándose en la totalidad del país para el año 2016. El gobierno esperaba reemplazar a la gasolina extra (gasolina de bajo octanaje) para el año 2017, estimando que se necesitaría destinar la explotación de 30 000 hectáreas de caña de azúcar para este objetivo. Este plan buscaba reducir la contaminación por emisiones en el equivalente a 80 000

vehículos (Petroecuador, 2018). Actualmente, se distribuye en las provincias de Guayas, Santa Elena, Los Ríos, El Oro, Manabí, Esmeraldas, Loja, Zamora Chinchipe y Azuay (Petroecuador, 2020).

Tras el cambio de gobierno y de sus prioridades frente a la producción energética, en el año 2017, ya no se considera la eliminación de la gasolina extra como una meta productiva nacional (CNP, 2017). A esto hay que agregar, que debido a la imposición de nuevos aranceles y eliminación de subsidios a las gasolinas a partir del año 2018 (Petroecuador, 2018), se propició el aumento del consumo de la gasolina extra frente a otros combustibles. La evolución de la venta anual de los dos productos se puede visualizar en la Figura 1.10.

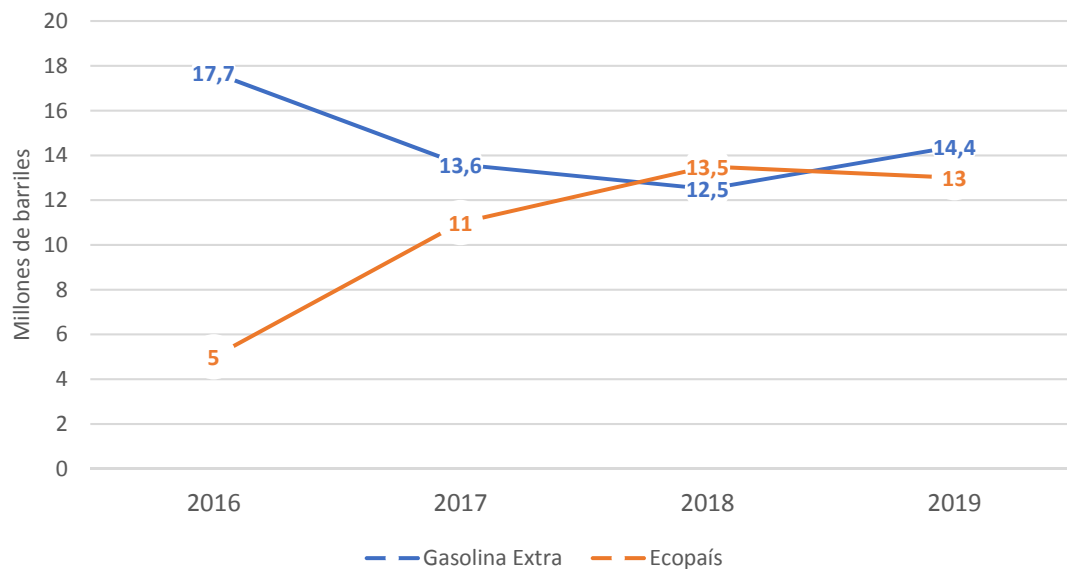


Figura 1.10. Comparación en venta anual en Ecuador en millones de barriles de combustible. Adaptado de Petroecuador (2020).

Tabla 1.2. Requisitos para el etanol usado para fabricar gasolina Ecopaís.

Adaptado de Petroecuador (2018).

<i>Requisitos</i>	<i>Unidad</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>
Contenido de etanol	% en masa	99.6	---
Acidez total (como ácido acético)	mg/100 mL	---	3.0
Conductividad eléctrica	μS/m	---	500
Densidad a 20 °C	kg/m ³	---	791.5
Contenido de cloruros	mg/L	---	32
Contenido de agua	% en masa	---	0.3
Contenido de cobre	mg/kg	---	0.1
Residuo por evaporación	mg/100 mL	---	5.0

Se considera que el uso de este combustible tiene múltiples ventajas, destacando la reducción de las emisiones de CO₂ y la disminución de la salida de divisas porque se importa menor cantidad de naftas de alto octano (NAO). Además, beneficia al sector cañicultor y a los productores de etanol, ya que promueve el desarrollo agroindustrial y aumenta el empleo rural (Petroecuador, 2020).

El presente trabajo de investigación trata de responder a esta problemática, al considerar una fuente secundaria de biomasa, como los desechos de la agroindustria y en particular la cacaotera. Este esfuerzo se justifica no solo en la necesidad económica de sustituir el consumo de derivados del petróleo, sino que el uso de etanol como aditivo de la gasolina (gasolina *Ecopaís* en Ecuador) presenta las siguientes ventajas:

- Reducción de emisiones de NOx, CO e hidrocarburos ligeros.
- Aumento del octanaje de las gasolinas.
- Creación de nuevos mercados para productos agrícolas.
- Aporte a la economía circular al utilizar materia prima actualmente desechada.

Aunque se estima que la producción de bioetanol a partir de *“tecnologías de primera generación”* aumentará a más de 100 mil millones de litros para 2022 (Saini et al., 2015), estas materias primas compiten con los alimentos, son insuficientes para satisfacer la creciente demanda de combustibles, y tienen un impacto negativo en la biodiversidad e incluso pueden conducir a la deforestación. El impacto acumulativo de estas preocupaciones ha aumentado los intereses en el desarrollo de *“etanol de segunda generación”* a partir de materiales lignocelulósicos no alimentarios como residuos agrícolas, madera, papel y residuos sólidos urbanos, que constituyen el componente orgánico renovable más abundante en la biosfera (Saini et al., 2015).

1.2.3. Ventajas de la producción de bioetanol

Se puede afirmar que los biocombustibles en general presentan las siguientes ventajas: a) pueden obtenerse de fuentes comunes de biomasa, b) no suponen una liberación neta de carbono a la atmósfera, al formar parte de ciclo de dióxido de carbono, c) tienen un considerable potencial ecológico al sustituir a los combustibles de origen fósil, d) suponen un beneficio para la economía y los consumidores y e) son biodegradables y contribuyen a la sostenibilidad (Demirbas, 2008; Khongsay et al., 2012).

Si bien es cierto que no es posible establecer una lista única de ventajas, aplicable a todas las situaciones, ambientes y lugares, sí se puede afirmar que la producción de bioetanol a partir de los desechos de la agroindustria tiene las siguientes ventajas en el caso de Ecuador:

- El proceso de producción de etanol a partir de azúcares (fermentación), es conocido desde la antigüedad, estudiado y modelado, lo que garantiza que exista mucho material investigativo y datos técnicos, incluida la fermentación del mucílago de cacao (Anvoh et al., 2009; Romero Cortes et al., 2018).

- La purificación de etanol (destilación, rectificación y desecación) se utiliza ampliamente en el mundo, en especial por la producción de bebidas alcohólicas, lo cual asegura el acceso a la tecnología necesaria.
- En Ecuador existe gran variedad de cultivos, debido a la orografía del país, que le otorga una amplia diversidad de climas, y por ende biomasa susceptible de ser considerada apta para la producción (ESIN, 2014).
- Existe interés gubernamental por la investigación, desarrollo e implementación de tecnologías alternativas y más amigables con el medio ambiente (CNP, 2017).
- La agroindustria genera gran cantidad de desechos, mismo que en su mayoría no están siendo utilizados para otros fines (ESIN, 2014), y muchos, como los de la industria cacaotera, son tóxicos (por su alto contenido de neurotoxinas como la teobromina y su propensión a la formación de micotoxinas peligrosas), lo que promueve la investigación de nuevos métodos para su eliminación o aprovechamiento.

1.2.4. Desventajas del uso de bioetanol

Complementando al apartado anterior, es necesario recalcar que el uso, fabricación e investigación de biocombustibles poseen considerables desventajas que les han impedido ser competitivos contra los combustibles fósiles. Entre estas desventajas se pueden recalcar:

- Los costes de producción pueden hacerla poco atractiva, en comparación con el refino de petróleo al requerir una mayor cantidad de tiempo, material y energía (Cury et al., 2017).
- El peligro de la sustitución de cultivos agrícolas alimentarios por cultivos destinados a la producción de combustibles.
- Necesidad de modificaciones más o menos complejas en los motores de combustión interna.
- Surgimiento de los vehículos eléctricos.

- Dificultades para recolectar y almacenar la materia prima (por su facilidad de contaminación por microorganismos aerobios) y el almacenamiento del etanol producido al ser este altamente corrosivo y propenso a absorber humedad ambiental.
- Efectos medioambientales consecuencia del empleo de agroquímicos.

De lo anterior, puede concluirse que la producción de bioetanol combustible puede parecer menos atractiva, que otras formas de generación energética como la producción de hidrógeno (IEA, 2019a). Así que el presente estudio debe verse, no solo como una búsqueda de producción sostenible de etanol para combustible, más bien como la búsqueda de una aplicación a los residuos de la industria cacaotera, mismos que actualmente están siendo desperdiciados. Los residuos agrícolas generados como desechos durante o después del procesamiento de cultivos agrícolas son uno de los recursos de biomasa lignocelulósica y renovable disponibles en grandes cantidades para la producción (Saini et al., 2015).

1.2.5. Uso de desechos agroindustriales para producción de biocombustibles

El uso de biocombustibles presenta diversos retos, lo que ha impedido que su uso se generalice. Los dos principales son sus costes productivos y la materia prima necesaria para su fabricación. Una de las vías que se baraja, para tratar con estas problemáticas, es el empleo de material de desecho de la agroindustria, que carece de otros empleos (Cury et al., 2017). Por su parte, los residuos de la industria cacaotera se caracterizan por:

- Pueden ser ricos en lignocelulosa de difícil fermentación o procesamiento.
- Su recolección no siempre puede ser automatizada, debido a que las mazorcas¹ crecen directamente del tronco del árbol.
- Muchos de los residuos son utilizados como material de compostaje.
- Pueden contener sustancias tóxicas que inhiban los procesos biológicos.

Todas estas problemáticas requieren ser analizadas a lo largo de este trabajo de investigación, tomando en cuenta la realidad del país y la región objetivo. A continuación, se describirá brevemente estas consideraciones:

- Los desechos de la industria cacaotera son variados y en general de difícil tratamiento. Su uso es muy limitado, incluso para ser considerados para el compostaje, dada su toxicidad derivada de la presencia de teobromina y otros tóxicos en las cáscaras (Elika, 2009), por lo cual se eligió un residuo no tóxico como el mucílago (Romero Cortes et al., 2018).
- El mucílago como tal debe ser recolectado *in situ*, al momento de la retirada de las semillas, requiriendo de la implementación de estaciones de almacenamiento y refrigeración para evitar su fermentación temprana (Romero Cortes et al., 2018).

¹ El fruto del cacao es una baya denominada maraca o mazorca, que tiene forma de calabacín alargado, se vuelve roja o amarillo púrpuro y pesa aproximadamente 450 g cuando madura (ANECACAO, 2016).

- Dada la naturaleza de la industria del cacao en Ecuador, no existe un uso para el mucílago. En la actualidad es descartado inmediatamente dado que se fermenta rápidamente (Vallejo et al., 2010).

1.2.6. Producción industrial de etanol a partir de residuos

Debido al rápido crecimiento de la población y la industrialización, la demanda mundial de etanol aumenta continuamente. Los cultivos convencionales como el maíz y la caña de azúcar no pueden satisfacer la demanda mundial de producción de bioetanol debido a su valor principal de alimentos y piensos (Nuanpeng et al., 2011). Por tanto, las sustancias lignocelulósicas como los desechos agrícolas son materias primas atractivas para la producción de bioetanol. El etanol obtenido de residuos agrícolas podría ser una tecnología prometedora, aunque el proceso tiene varios desafíos y limitaciones, como el transporte y manipulación de biomasa, y métodos de pretratamiento eficientes (Saini et al., 2015; Sarkar et al., 2012).

Como se aprecia en los resultados experimentales de la Tabla 1.3, los cultivos más prometedores, con base en el rendimiento por hectárea de cultivo, para convertirse en materia prima para la industria del bioetanol, son la caña de azúcar y la papa, pero en el caso del primer cultivo está limitado a condiciones climatológicas específicas. Mientras que la explotación de la papa podría afectar a la seguridad alimentaria de una región, lo que obliga a buscar fuentes alternativas de materias primas menos eficientes, pero que protejan la seguridad alimentaria, como pueden ser los residuos de la industria cacaotera (Romero Cortes et al., 2018; Vallejo et al., 2010).

En cualquier proceso de producción industrial, existen distintas configuraciones, especificaciones, modelos y diseños industriales que pueden ser total o parcialmente aplicables a la generación de alcohol a partir de los diversos residuos

del cacao. El comparar estas diferentes alternativas va más allá del alcance de esta investigación, pero sí se analizarán decisiones de diseño a escala de laboratorio y experimentación. Por tanto, para complementar este capítulo introductorio se describirán también, a grandes rasgos, las etapas de producción y otros aspectos económicos, técnicos y metodológicos relevantes para este objetivo.

Tabla 1.3. Rendimiento potencial de bioetanol por hectárea cultivada y de diversas materias primas. Adaptado de Zamora et al. (2014)

Materia prima	Producción [g etanol/100 mL o 100 g de materia prima]	Rendimiento del cultivo [Tm ha ⁻¹ /L Tm ⁻¹]	Rendimiento potencial [kg de etanol/ha]
Jugo de uva	7.0	11.8 / 800	660
Jugo de manzana	6.3	9.2 / 700	405
Jugo de piña	3.2	42 / 480	645
Jugo de caña	7.0	76 / 580	3 085
Almidón de papa	8.8	27	2 376
Almidón de camote	8.6	21	1 806
Hojas de caña	1.1	17	187

Estos valores fueron obtenidos en condiciones de laboratorio; a escala industrial, es previsible que los volares en general serán menores.

El fruto del cacao tiene más de 300 compuestos con cierto grado de toxicidad como: ésteres, hidrocarbó lactonas, monocarbonilos, piroles y en particular la teobromina (Kalvatchev et al., 1998). La teobromina es un alcaloide de la familia de las metilxantinas, familia que incluye a la cafeína; a altas dosis, se observan en humanos, náuseas y anorexia, durante exposiciones prolongadas se presentan sudoraciones, temblores y severos dolores de cabeza. La teobromina se presenta en altas concentraciones en la cáscara, por lo que no se usa como alimento de ganado o para compost (Elika, 2009).

En el mucílago la teobromina no está presente, por lo que incluso puede ser consumido como alimento, o servir como materia prima sin riesgos de envenenamiento, siendo esta una de las razones para ser escogido para esta investigación, dadas las dificultades de los otros desechos y la inexistencia de estudios relacionados con su fermentación alcohólica (Romero Cortes et al., 2018).

El proceso puede describirse brevemente (Figura 1.11) mediante una secuencia de 6 etapas, tanto a escala de laboratorio, como a escala industrial:

- **Recolección de la materia prima:** el mucílago se extrae directamente de las mazorcas de cacao. Su recolección consiste en un proceso manual, igual que su posterior tratamiento, siendo utilizados machetes y costales para su cosecha (Ardhana & Fleet, 2003), por lo que la eficiencia de este proceso dependerá en gran medida del nivel de tecnificación disponible, teniendo como premisa que, a mayor tecnificación menor producto desperdiciado. Los residuos lignocelulósicos, por lo general, son usados como abono, alimento para el ganado (en el caso del cacao no es recomendable por la presencia de teobromina) o como combustible sólido, opciones que no serán consideradas en la presente investigación.
- **Limpieza y almacenamiento:** el mucílago es muy susceptible a la contaminación microbiana o por levaduras nativas, requiriendo ciertos niveles de higiene, tecnificación y refrigeración mínimos para garantizar que el producto sea apropiado para las siguientes etapas.
- **Pretratamiento:** los procesos que involucra esta etapa se diseñan de manera específica para la materia prima, que pueden involucrar pasteurización, filtración, etc. Para el presente trabajo, el pretratamiento va en el orden de eliminación de posibles contaminaciones microbianas.
- **Fermentación:** es la etapa limitante desde el punto de vista del rendimiento, dado que sobre ella se articulan las demás etapas. Tiene como límite el rendimiento estequiométrico de la conversión de un azúcar a etanol, perdiéndose lo demás, como dióxido de carbono (responsable de

generación de espumas que pueden afectar al proceso), calor (por lo que debe haber una refrigeración constante) y los compuestos orgánicos volátiles o VOC (entre los que se incluye el propio etanol). Desde el punto de vista estrictamente ecológico, es la etapa que genera más contaminación debido a los gases emitidos y residuos no fermentables.

- **Destilación:** es la etapa donde se consumirá la mayor cantidad de energía dado que las torres de destilación utilizan vapor vivo y no combustión directa, existiendo en el mercado diferentes arreglos y modelos de platos y válvulas. Las principales pérdidas calóricas se producen a través del aislamiento de la torre y vapores con alto contenido alcohólico que pueden filtrarse.
- **Desecación:** el etanol forma un azeótropo con el agua (95.6 % en volumen de etanol), por lo que la destilación simple no puede alcanzar la pureza requerida. Para la eliminación de los últimos remanentes de agua (en general cantidades menores del 5 %), existen diversos procesos o equipos disponibles; cada uno con sus propias características y desafíos tecnológicos, ya que puede incluir el uso de sustancias que rompan el azeótropo como el ciclohexano, o zeolitas si se requiere absorción.

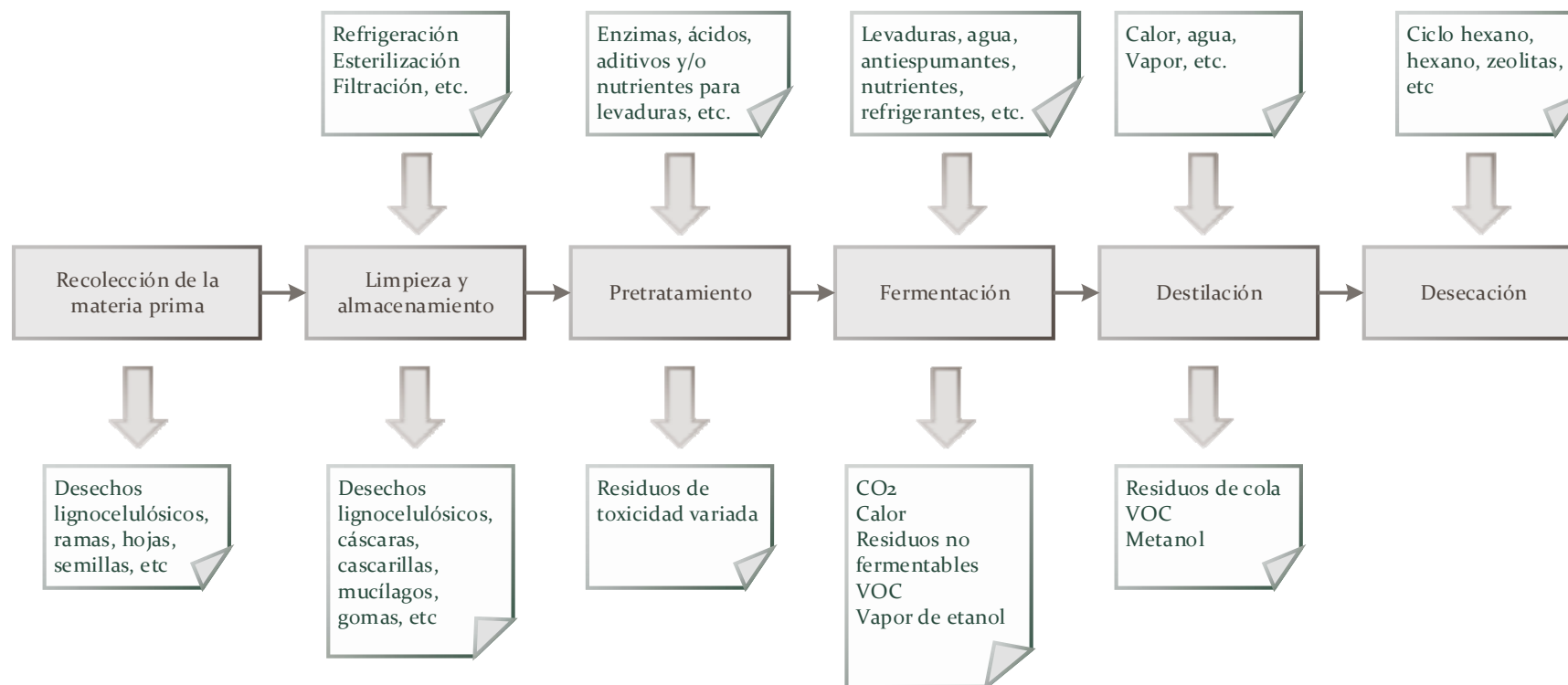


Figura 1.11. Diseño básico (diagrama de bloques) del proceso de obtención de etanol anhidro.

A partir del resumen esquemático de las diferentes etapas del proceso (Figura 1.11), es posible destacar dos principales problemáticas a la hora de una posible implementación de un procesamiento industrial, a más del que sería la instalación de procesamiento, serían:

- a. **Tecnificación del campo:** la producción agrícola en Ecuador es en su mayoría de subsistencia, pobremente tecnificado y consistente en pequeños monocultivos. En estas condiciones es muy difícil plantear compras de equipo y maquinaria si no existe un incentivo económico que sustente la inversión, en particular en lo que se refiere al almacenamiento y manipulación del mucílago, por requerir refrigeración y un alto nivel de asepsia, por lo que este debe ser realizado de manera centralizada (Ardhana & Fleet, 2003).
- b. **Consumo energético:** el proceso de purificación requiere grandes cantidades de energía, en particular la destilación, por lo que puede llegarse a un nivel donde el rendimiento energético sea negativo, si no se asegura un flujo de materia prima lo suficientemente grande.
- c. **Accesibilidad a la materia prima:** la cosecha del cacao es principalmente por temporada, por lo que no se puede considerar la existencia de un acceso regular a las plantaciones y coordinación con los productores para la recolección del mucílago mediante una compra directa al agricultor.

1.2.7. Industria del cacao

El árbol *Theobroma cacao* L. es una especie de la familia *Malvaceae*, nativa de América Central y del Sur, específicamente la cuenca del Amazonas (Vásquez et al., 2019). Solamente las semillas fermentadas y secas son comercializables, mismas que corresponden al 10 % del peso fresco de la fruta. El resto de la fruta, es decir, su mucilago, cascarilla de la semilla y cáscara de la fruta, es desechada (Figura 1.12) (Kalvatchev et al., 1998).

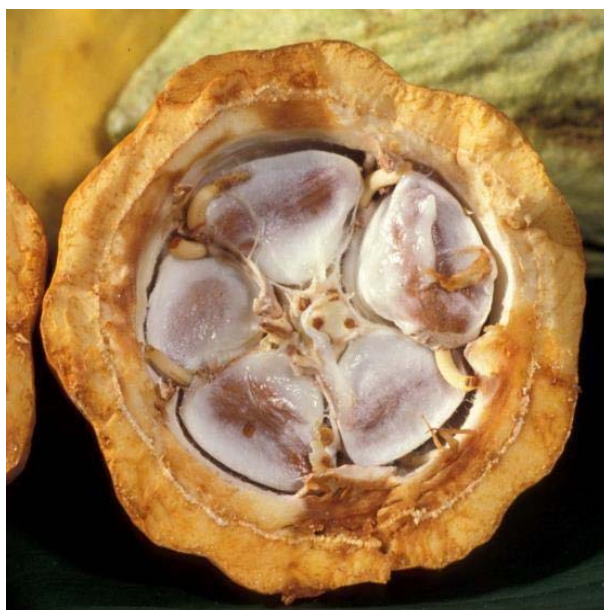


Figura 1.12. Estructura del Cacao (cotiledones y cáscara). Adaptado de De La Cruz et al. (2009).

El árbol del cacao para su adecuado crecimiento necesita un clima húmedo subtropical, es decir, con temperaturas promedio entre los 20 °C y los 30 °C y una precipitación anual de 1 500 – 2 000 mm. Es un árbol de tierras bajas y su cultivo a más de 900 metros del nivel del mar difícilmente tiene éxito. Deben estar a la sombra, por lo cual normalmente se encuentran bajo árboles más grandes, palmeras o plataneras. Además, necesita suelo rico en nitrógeno y en potasio. La recolección del cacao se hace dos veces al año, aunque la segunda suele ser menos abundante (ESIN, 2014). Por estas razones las zonas donde su cultivo es viable son limitadas (Figura 1.13).

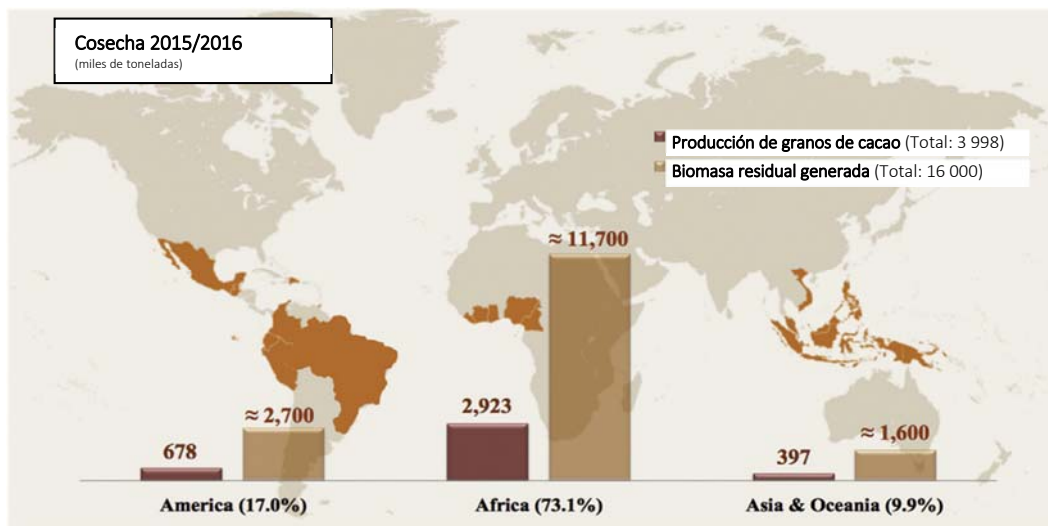


Figura 1.13. Producción de granos de cacao y generación de biomasa residual.

Adaptado de Vásquez et al. (2019).

El cacao requiere un clima húmedo subtropical y suelo fértil (Agrocalidad, 2012), lo que conlleva que el espacio territorial apto para su cultivo sea limitado a algunas regiones centrales de la región costanera (Tabla 1.4) y zonas de la región 6 donde se realizó el estudio (Tabla 1.5 y Anexo A) y al uso de solo determinados *clones*²:

- Cacao Nacional EET-559 altamente productivo, calidad fino o de aroma.
- CCN-51 altamente productivo.
- Variedad Super Cacao altamente productivo.

² **Clones de cacao:** son grupos de plantas reproducidas vegetativamente originadas de un solo árbol de rendimiento sobresaliente. Todos los individuos presentan condiciones similares en la apariencia física.

Tabla 1.4. Producción cacaotera en Ecuador en el año 2016. Adaptado de CFN (2018)

<i>Provincia</i>	<i>Área Cosechada</i> [ha]	<i>Producción</i> [Tm]	<i>Rendimiento</i> [Tm/ha]	<i>Porcentaje</i> [%]
Guayas	89 607	49 233	0.5	28
Manabí	94 904	22 309	0.2	13
Los Ríos	96 200	41 187	0.4	23
Esmeraldas	61 824	18 083	0.3	10
Otras	111 722	46 739	0.4	26
Total	454 257	177 551	-	100

Tabla 1.5. Producción cacaotera en la zona 6 en el año 2016. Adaptado de CFN (2018).

<i>Provincia</i>	<i>Cantón</i>	<i>Superficie</i> [km ²]	<i>Producción absoluta</i> [Tm/año]	<i>Densidad de producción</i> [Tm/km ² /año]	<i>Residuos</i> [Tm/año]
Cañar	Cañar	1 798.51	1 473.72	0.82	18 246.39
	La Troncal	318.89	1 511.40	4.74	18 712.92
Azuay	Pucará	585.09	374.67	0.64	4 638.89

Desde el punto de vista comercial, puede considerarse que existen dos tipos de cacao:

- Cacao corriente que se destina a la producción de manteca y cacao en polvo.
- Cacao fino o de aroma, utilizado en la elaboración de chocolates especiales.

El cultivo en Ecuador ha crecido en los últimos años motivado por el aumento de precio en el comercio internacional y la disminución de la producción internacional, aunque en años recientes el costo por tonelada ha disminuido de alrededor de mil dólares la tonelada a inicios de 2015 a cerca de 700 en 2017 (CFN, 2018) (Tabla 1.6).

Tabla 1.6. Exportaciones Nacionales por Año (2014-2017). Adaptado de CFN (2018).

<i>Año</i>	<i>Millones de toneladas</i>	<i>Millones de dólares</i>
2014	223.34	710.15
2015	257.70	812.38
2016	253.02	750.03
2017	307.49	688.98
Total	1 240.86	3 487.38

1.3. Producción de etanol a partir de mucílago de cacao

El mucílago de cacao es la pulpa de sabor dulce y ácido que recubre los granos del fruto, su función es proveer las condiciones adecuadas para el proceso de fermentación y para la formación de sustancias precursoras del sabor y aroma (Figura 1.14).



Figura 1.14. Disolución de mucílago de cacao. Adaptado de De la Cruz (2012).

Es una sustancia viscosa que se coagula en presencia de etanol o una solución acuosa de goma o dextrina (Vallejo et al., 2010). Está compuesto principalmente de polisacáridos celulósicos, gomas y pectinas (Tabla 1.7). Presenta un pH ácido debido a la presencia de ácido cítrico, lo cual es un medio adecuado para las levaduras (Jiménez y Bonilla, 2012).

Tabla 1.7. Composición química del mucílago de cacao. Adaptado de Vallejo, et al. (2016).

Parámetros	Valores
Humedad (%)	85.30 ± 8.60
Sólidos disueltos totales (°Brix)	16.17 ± 0.74
Glucosa [g/L]	214.24 ± 6.42
Sacarosa [g/L]	21.31 ± 3.21
pH	3.75 ± 0.81
Acidez titulable (meq/L)	170 ± 6.28
Ácido cítrico (mg/L)	9.14 ± 0.64
Ácido málico (mg/L)	3.60 ± 0.50
Ácido acético(mg/L)	2.28 ± 0.70
Ácido oxálico (mg/L)	1.27 ± 0.72
Ácido láctico (mg/L)	1.23 ± 0.01
Ácido fumárico (mg/L)	0.02 ± 0.01
Vitamina C (mg/1000 mL)	18.30 ± 7.50
Ceniza (%)	3.76 ± 0.84
Fósforo total (mg/L)	62.47 ± 3.43
Calcio (mg/L)	171.50 ± 34.01
Magnesio (mg/L)	82.50 ± 0.81
Sodio (mg/L)	30.50 ± 3.77
Potasio (mg/L)	950 ± 16.32
Grasa (%)	3.54 ± 0.2
Proteínas totales [g/L]	7.20 ± 0.21

Al poseer una cantidad elevada de agua y ácido cítrico, el mucílago es fácilmente contaminable por microorganismos y susceptible a la oxidación una vez expuesto al aire, por lo que una correcta recolección y preservación será determinante en el rendimiento del proceso posterior, que es la fermentación propiamente dicha.

1.3.1. Proceso fermentativo

La fermentación es un proceso que ayuda a descomponer moléculas orgánicas grandes a través de la acción de microorganismos en otras más simples (Sharma et al., 2020). La fermentación alcohólica es un proceso biológico de respiración celular en plena ausencia de oxígeno, por parte de microorganismos especialmente adaptados que procesan los hidratos de carbono como la glucosa, fructosa, sacarosa, y en general cualquier sustancia que tenga una fórmula empírica de la glucosa (una hexosa) para obtener como productos finales: un alcohol en forma de etanol ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$), dióxido de carbono (CO_2) en forma de gas y moléculas de adenosín trifosfato (ATP) que consumen los propios microorganismos en su metabolismo celular (Silva et al., 2014). Si se toma como referencia la variación en el número de microorganismos, existen fases claramente establecidas (Figura 1.15):

- A. **Fase de latencia:** los microorganismos se aclimatan a las condiciones del medio, no hay crecimiento celular o este es muy reducido.
- B. **Fase de crecimiento exponencial:** los microorganismos empiezan a multiplicarse exponencialmente, alcanzando el máximo de su densidad poblacional. La concentración de azúcares declina rápidamente.
- C. **Fase estacionaria:** la población de microorganismos ha llegado a su máximo valor admisible, deteniéndose el crecimiento microbiano. La velocidad de fermentación y la temperatura permanezcan constantes.
- D. **Fase declinante:** las bajas concentraciones de azúcares o ausencia de los mismos, al igual que la elevada concentración de alcohol etílico, empieza a matar las levaduras y la población disminuye, lo que causa que la velocidad de fermentación disminuya.

Para este trabajo se eligió la levadura *S. Cerevisiae* por su alto rendimiento y la gran cantidad de información disponible de su cinética (Albarracín et al., 2015; Castelain, 2013; Humbird et al., 2011; Romero Cortes et al., 2018; Saura et al., 2009).

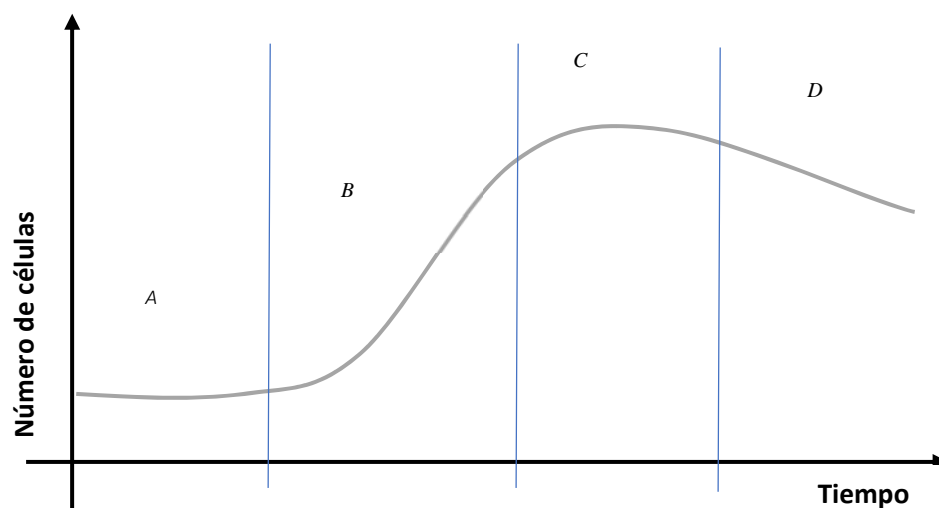


Figura 1.15. Curva de crecimiento típico de un cultivo microbiano.

En la Figura 1.16 se representa una curva de crecimiento típica, donde se comparan el crecimiento de las levaduras, el aumento de la concentración de etanol y la disminución de la concentración de la glucosa frente al tiempo.

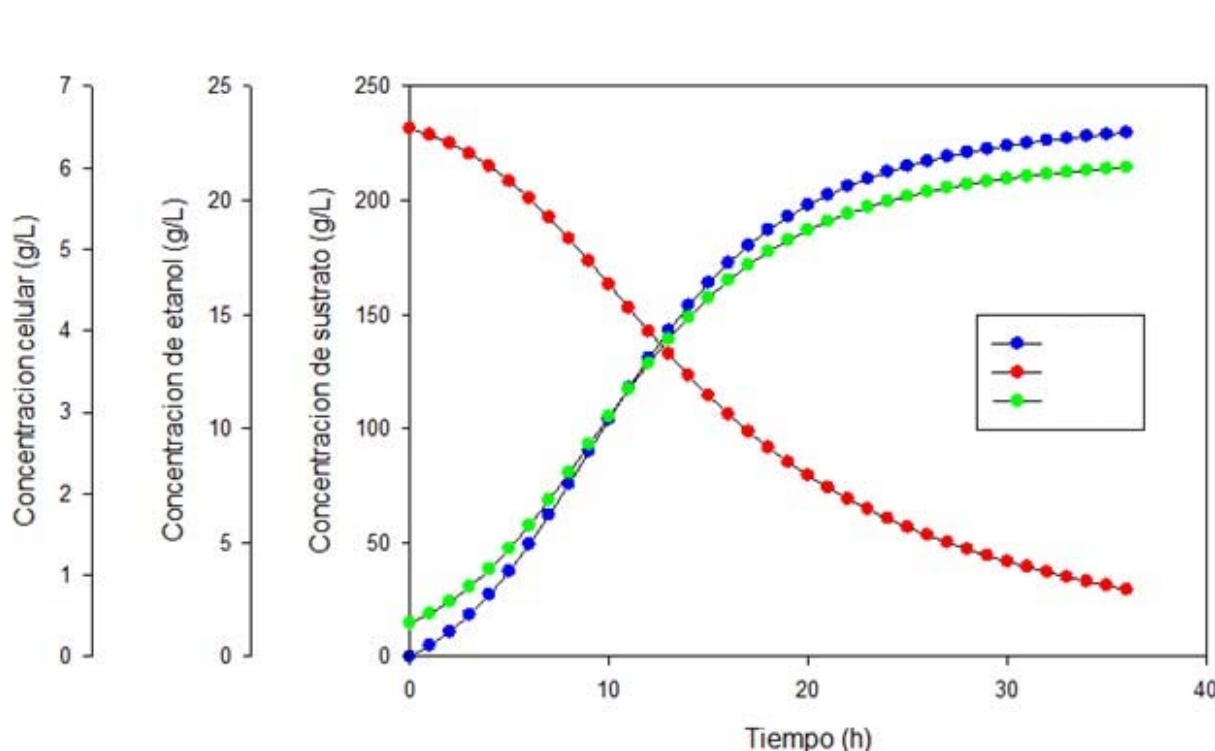


Figura 1.16. Fermentación con *S. Cerevisiae* durante la producción de etanol a partir de glucosa en cultivo discontinuo.

1.3.2. Cinéticas de producción de etanol

El análisis, modelado y determinación de condiciones óptimas, es de vital importancia para asegurar la máxima rentabilidad posible en cada etapa. Por lo cual, estos serán los aspectos a profundizar en la presente investigación. La fermentación alcohólica, al igual que cualquier proceso biológico, es factible únicamente dentro de un limitado rango de condiciones físico-químicas (Tabla 1.8); al estar basada en un ser vivo, sensible a ciertas condiciones que pueden inhibir su metabolismo (Berbegal et al., 2020).

De lo anterior, se desprende que el modelado se presentará en dos fases:

- a. **Preparación de la materia prima**, para alcanzar las condiciones óptimas prefermentativas (muestreo, almacenamiento, aditivos y estandarización).
- b. **Optimización de las variables operativas de la fermentación** (concentraciones, temperaturas y tiempos).

Tabla 1.8. Condiciones recomendadas de fermentación para *S. Cerevisiae*.

Factor	Impacto	Valores recomendados
Temperatura	Las levaduras resisten a las bajas temperaturas, permaneciendo en un estado de inactividad. La mayoría actúan entre 5 y 37 °C. Muriendo a temperaturas mayores a los 52 °C fenómeno conocido como esterilización.	25 – 35 °C (Castelain, 2013)
pH	Cada microorganismo posee un pH óptimo donde tienen mayor velocidad de crecimiento y rendimiento.	4.0 – 6.5 (Castelain, 2013)
Azúcares	Altas concentraciones provocan que se eleve la presión osmótica sobre las levaduras, lo que impide que no actúen sobre los mismos.	10 – 18 % (Garzón & Hernández, 2016) 40 g/L (Kallis et al., 2019)
Nutrientes	Las levaduras requieren fuentes de nitrógeno, fósforo y azufre, para asegurar un crecimiento adecuado.	4 g/L extracto de levadura 1 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄ , 1 g/L KH ₂ PO ₄ , 5 g/L MgSO ₄ (Kallis et al., 2019)

1.3.3. Destilación de mezclas etanol-agua

El etanol obtenido del proceso de fermentación debe ser purificado para alcanzar los estándares requeridos (Tabla 1.2). Para cumplir con este objetivo se debe recurrir a varios procesos basados en la destilación. Es imposible purificar la mezcla alcohol-agua

únicamente recurriendo a la destilación simple, dado que el etanol forma un azeótropo con el agua a 95.6 % en peso de alcohol, siendo la concentración máxima que puede alcanzarse en la destilación atmosférica (Figura 1.17). Los sistemas de destilación modernos son sistemas de contacto vapor/líquido de etapas múltiples, continuos, a contracorriente, que operan dentro de las leyes físicas que establecen que diferentes materiales hierven a diferentes temperaturas (Katzen & Madson, 2009; Spaho, 2017).

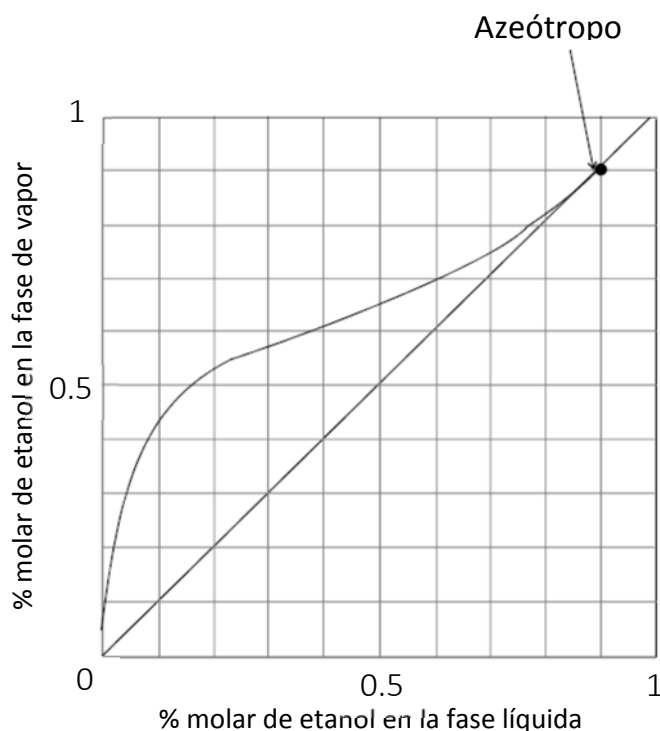


Figura 1.17. Curva de equilibrio líquido/vapor para un sistema etanol/agua a presión atmosférica. Adaptado de Katzen & Madson (2009).

Para romper el azeótropo, pueden tomarse diferentes vías, siendo una de ellas el agregar aditivos como el benceno y el ciclo hexano (destilación azeotrópica) (Udeye et al., 2009), que modifican el equilibrio de fases líquido-vapor o agregando un elemento de alto punto de ebullición que no forme azeótropos como son los glicoles (destilación extractiva). Las mezclas etanol-gasolina tienen muy baja tolerancia al agua, en concentraciones superiores al 3 % en volumen puede causar graves daños al motor, además de problemas de corrosión y formación de fases. Por lo que, es de vital importancia alcanzar la máxima pureza (Vásquez et al., 2006).

Para esta investigación, teniendo en consideración lo expuesto en estudios similares (Phukoetphim et al., 2017; Sobočan & Glavič, 2000; Thangprompan et al., 2013), se establecieron tres etapas de purificación de etanol obtenido de la fermentación:

- a. **Rectificación a presión atmosférica**, proceso que permite alcanzar concentraciones cercanas al azeótropo.
- b. **Destilación extractiva**, utilizando un glicol como agente de arrastre, el cual permite sobrepasar la concentración azeotrópica.
- c. **Tamizado molecular**, para eliminar todas las trazas de humedad.

1.4. Objetivos de la Tesis

1.4.1. General

Determinar los parámetros óptimos para la producción de etanol carburante a partir de mucílago de cacao CCN-51, mediante experimentación y aplicación de modelos matemáticos en las etapas de fermentación, y deshidratación. Finalmente, desarrollar un modelo personalizado de fermentación en *Aspen Custom Modeler*[®] y un modelo global de producción de bioetanol a escala piloto en *Aspen Plus*[®].

1.4.2. Específicos

En concordancia con el objetivo general antes descrito, se buscará completar los siguientes objetivos específicos:

- Proceder a la caracterización físico-química del mucílago de cacao CCN-51.
- Diseñar un proceso experimental de fermentación y optimizar sus parámetros en función de la producción máxima de etanol.
- Obtener alcohol anhidro a partir del fermentado, aplicando procesos de deshidratación sucesiva como: destilación con reflujo, destilación extractiva y adsorción con tamices moleculares.
- Aplicar modelos matemáticos para analizar y describir la fermentación del mucílago y adsorción de humedad con tamices moleculares para la obtención de etanol anhidro.
- Modelar una unidad personalizada de fermentación de mucílago de cacao CCN-51 en *Aspen Custom Modeler*, siendo esta un biorreactor discontinuo (*batch*).
- Simular el proceso global de producción de etanol carburante a escala piloto a partir de mucílago de cacao CCN-51 en *Aspen Plus*[®].

1.5. Resumen de la sección

El mercado energético tiene una alta dependencia de factores externos como la geopolítica y las prioridades gubernamentales sobre el medioambiente, siendo el petróleo y el gas natural las principales fuentes de energía a nivel mundial, con una cuota de mercado superior al 80 %. Esta dependencia de una fuente no renovable, como lo es el petróleo, hace necesario que se deba buscar nuevas fuentes renovables. La producción de energía a partir de fuentes renovables es compleja y no exenta de polémica. Ante esta perspectiva, es imperante continuar con la búsqueda de nuevas materias primas y procesos viables, como lo son los biocombustibles.

El Ecuador es un país cuya producción energética es principalmente dependiente de su industria petrolera (con una extracción que se encuentre entre los 350 000 y 400 000 barriles diarios) e hidroeléctrica. Por su parte, la industria agrícola presenta una escasa industrialización en diversas áreas, siendo realizada principalmente de manera artesanal, por lo que esta actividad representa un amplio espacio del mercado laboral y productivo del país. Este hecho justifica una búsqueda de aumentar la productividad en cultivos y explotaciones agrícolas, y además de la utilización de sus desechos como lo son los de la industria cacaotera.

Los residuos de la industria cacaotera son peligrosos al contener varias toxinas, además de ser fuente de diversas micotoxinas. Por esta razón, a diferencia de otros residuos, su uso como alimento para animales o para el compostaje, es muy limitada. Este motivo hace más relevante la búsqueda de establecer empleos alternativos para estos residuos como lo es la producción de combustibles. De entre los distintos residuos de la industria cacaotera, el mucílago, al ser menos tóxico y fácilmente fermentable, se muestra como el más prometedor. Para 2019 se generaron un total de 110 635 toneladas de mucílago. Normalmente, se desperdician más de 150 litros de mucílago por tonelada de almendras de cacao húmedas.

El procesamiento y recolección del mucílago es complejo, dado la imposibilidad de automatización o el uso de maquinaria en el proceso de recolección de las bayas y las semillas del cacao. Esto no es necesariamente una limitante que deje fuera a los residuos del cacao, esto por ser una gran oportunidad para ayudar a la economía circular de un sector mayoritariamente pobre y de economía de subsistencia.

La fermentación es un proceso altamente usado e investigado, por lo que existe abundante información sobre su cinética y modelado, razón por lo cual utilizar una levadura comercial como la *S. Cerevisiae*, facilita aún más un estudio experimental. El proceso de obtención de alcohol anhidro presenta varias dificultades tecnológicas, en particular romper el azeótropo alcohol-agua y llegar a la máxima pureza posible, pero al mismo tiempo es un proceso conocido y en general detallado y estudiado desde diversos enfoques. Plantear un proceso y sus parámetros de operación es una opción simple desde un punto de vista experimental, lo que le permite generar diversas alternativas tecnológicas.

Capítulo II

Fermentación



2. Fermentación del Mucílago

En capítulo anterior, se discutieron las posibilidades dentro del mercado energético de los biocombustibles, al igual que sus ventajas y limitantes. Asimismo, se definió la consideración del mucílago de cacao como una materia prima viable, siendo entonces necesario una validación experimental del proceso fermentativo y determinar así su rendimiento y variables operativas, para una posible producción industrial.

Por su parte, en este capítulo se analizan tanto las propiedades del mucílago como la cinética de la producción de etanol. Para lo cual, el apartado experimental fue dividido en tres etapas: 1) caracterización del mucílago, 2) estudio de su cinética fermentativa y 3) modelado del proceso comparando diferentes modelos cinéticos. Además de describir los métodos de muestreo para la materia prima necesaria.

2.1. Caracterización del mucílago de cacao CCN-51

Para garantizar una caracterización adecuada del mucílago, asegurando que sus medidas sean representativas, se planteó una estrategia de muestreo que consideraron principalmente su distribución geográfica, debido a la accidentada geografía del país.

2.1.1. Muestreo y almacenamiento

Dada la variada naturaleza de las fuentes de biomasa disponibles, se requiere una estrategia de muestreo adaptada a sus características (Saini et al., 2015). Por lo cual, para establecer un plan adecuado de muestreo del mucílago se consideró cuatro aspectos: selección, extracción, estandarización y almacenamiento (Mostacedo & Fredericksen, 2000).

2.1.1.1. Selección

Al tratarse de un producto agrícola para establecer un adecuado plan de muestreo, es necesario tener en cuenta factores geográficos y climáticos del cultivo, junto a las características propias del cultivo y su distribución (Chávez & Leandro, 2021). Por lo cual, se realizaron las siguientes consideraciones para cumplir con estos requerimientos:

- a. **Caracterización por región o zona:** el primer paso fue determinar en qué región se localizaba la mayor concentración de cultivo de cacao, a partir del censo sobre cultivos (Anexo A), siendo esta la zona agrícola 6 (Figura 2.1).
- b. **Caracterización por plantación:** analizando los datos por localidades, disponibles en el mencionado censo, dentro la zona 6 (Anexo A) se determinó que el cultivo del clon deseado se encontraba concentrado en su sector noroccidental.
- c. **Muestreo de cacao para investigación:** finalmente, para determinar el número de muestras a tomar se recurrió a un método estadístico en la zona determinada en la etapa anterior (área noroccidental de la zona 6).

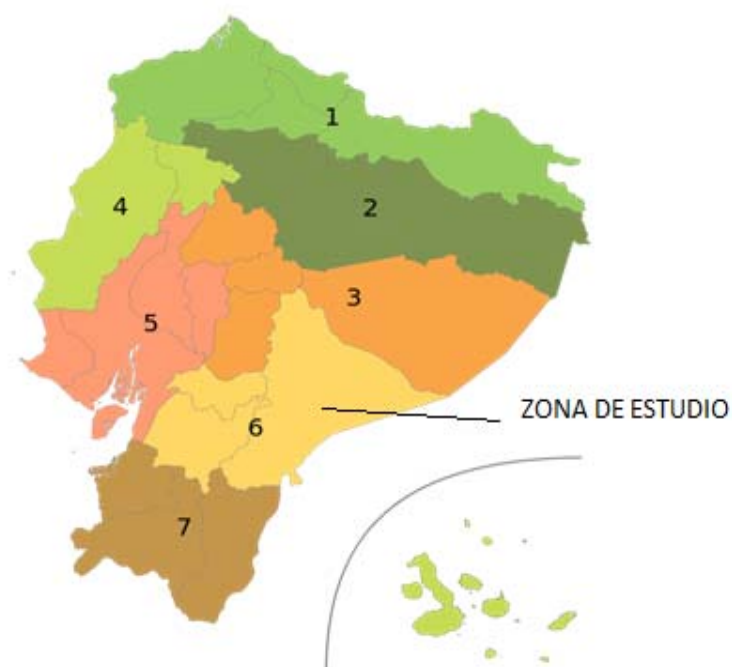


Figura 2.1. Zonas agrícolas del Ecuador.

Para establecer la población de muestreo se consideró un cuadrante de terreno de 10 m x 10 m, que es el recomendado para este tipo de árboles (Chávez & Leandro, 2021), mediante el cual se determinó la población (ec.2.1.). En esta ecuación se calcula el número de cuadrantes (N) como el cociente entre la superficie cultivable y la superficie del cuadrante de muestreo expresado en km².

$$N = \frac{2\,702\text{ [km}^2\text{]}}{0.0001\text{ [km}^2\text{]}} \quad (\text{ec.2.1.})$$

Para determinar la muestra de cuadrantes se utilizó la norma técnica ecuatoriana NTE INEN 177:95. Atendiendo a esta norma, se puede calcular el número de muestras (n) siguiendo la ecuación (ec.2.2).

$$n = \frac{Nz_{\alpha}^2pq}{d^2(N-1) + z_{\alpha}^2pq} \quad (\text{ec.2.2.})$$

Los parámetros utilizados en la ecuación (ec.2.2.) se muestran en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Valor de los parámetros usados en la ec.2.2.

<i>Parámetro</i>	<i>Símbolo</i>	<i>Valor</i>
Número total del universo	N	27 020 000
Proporción de individuos que poseen la característica de estudio*	p	0.5
proporción de individuos que no poseen esa característica (1-p)	q	0.5
Constante dependiente del nivel de confianza	Z	1.96
Precisión	d	0.3
Tamaño de la muestra	n	10**

* En caso de no conocer su valor se utiliza 0.5 (Lwanga & Lemeshow, 1991)

** El valor obtenido fue 10.67 y se aproximó a la baja.

Para la recolección de las muestras, se identificaron dentro de la zona 6 dos lugares de alta producción de cacao CCN-51: el cantón Camilo Ponce Enríquez en la provincia del Azuay (2 muestras) y el cantón La Troncal en la provincia del Cañar (8 muestras).

2.1.1.2. Recolección

El número de muestras a coleccionar en cada terreno está condicionado por al menos cuatro factores (Chávez & Leandro, 2021):

- a. **Tamaño de la finca:** para el muestreo se siguió la regla que para una hectárea de cacao se requieren al menos tres muestras de árboles.
- b. **Topografía:** se deben tomar muestras en función de la pendiente con la finalidad de crear una muestra representativa (como puede verse en la Figura 2.2, el relieve de la zona se caracteriza por ser montañosa).
- c. **Variedad de cacao plantada:** se recomienda tomar un número de muestras en función de las variedades de cacao existentes dentro de una plantación; es decir, muestras de variedades diferentes se deben tomar y analizar de forma independiente. La variedad CCN-51 fue la elegida para este trabajo.
- d. **Características visibles:** las muestras se deberán agrupar en función de características fácilmente identificables (color de suelo, pedregosidad, encharcamientos de agua, irradiación, irrigación, entre otros).



Figura 2.2. Ejemplo de un cultivo típico de cacao y su relieve en la Zona 6.

Siguiendo estas consideraciones, para tomar una muestra se procedió a coleccionar de dos a tres mazorcas maduras de cada árbol seleccionado con la ayuda de los propietarios. Las mazorcas seleccionadas no debían presentar signos de enfermedad o daño. Estas fueron abiertas en el laboratorio para evitar la contaminación en el campo, por lo cual, usando la cinta adhesiva, se identificó a la mazorca con el número respectivo de la muestra colectada (Figura 2.3).



Figura 2.3. Ejemplo de una muestra de mazorcas tomadas en un punto de recolección.

En la Tabla 2.2, se incluyen los pesos de las muestras en gramos, así como la cantidad de mucílago que finalmente se obtuvo de cada una de ellas. Igualmente, se incluyen las coordenadas UTM (*Universe Transverse Mercator*) de la localización de las referencias geográficas. La Figura 2.4 muestra la localización de los cuadrantes donde fueron tomadas las muestras:

Tabla 2.2. Características de las muestras de mucilago de Cacao CCN-51 en la Zona 6.

Muestras	Mazorcas [g]	Semilla y Mucilago [g]	Mucilago [g]	UTM*	
1	6 800	1 679.8	100.6	639524	9661827
2	6 800	1 207.8	105.6	639630	9661324

3	7 300	1 640.8	109.9	685994	9723222
4	8 000	1 534.5	101.9	696607	9724085
5	8 200	2 173.2	101.2	685912	9722465
6	7 000	1 719.7	103.4	686725	9723407
7	7 900	1 609.7	118.2	678434	9728325
8	6 600	1 356.8	115.4	687554	9724469
9	8 200	1 720.4	111.3	687213	9724437
10	7 000	1 120.3	110.7	687240	9724461

* Coordenadas UTM determinadas mediante un equipo GPS portátil eTrex® 32x

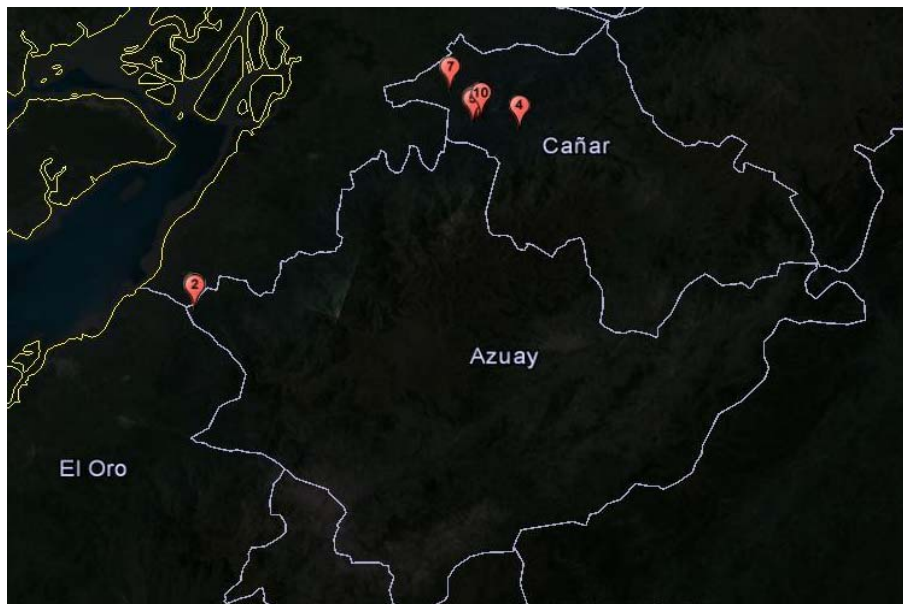


Figura 2.4. Ubicación geográfica de las muestras representadas en la Tabla 2.2.

2.1.1.3. Extracción del mucílago

Dado que no todas las mazorcas maduran uniformemente, se requirió de coordinación con los productores para determinar su madurez, a través de su coloración roja brillante. Todo el proceso de recolección de la mazorca y la separación de las semillas se realizó manualmente, mientras que los tratamientos posteriores y su conservación requiere especial cuidado, debido a que, como se mencionó en apartados anteriores, el mucílago es fácilmente contaminable por organismos anaerobios y requiere refrigeración para evitar una fermentación no controlada. Por lo cual, su extracción

debe hacerse en el laboratorio y en condiciones de esterilidad. Para lograr este objetivo, se siguieron los siguientes pasos:

- a. Se lavaron las mazorcas para dejarlas completamente limpias.
- b. Los granos fueron extraídos, desprendiéndolos de las mazorcas luego de ser cortadas por la mitad.
- c. Se retiraron las venas que rodean a las semillas y se procedió a la recolección de semillas con mucílago.
- d. A través de una mezcladora de paletas se produjo el ablandamiento del mucílago separándose de la pulpa mediante un filtro de tornillo sin fin, a este proceso se lo conoce como fluidificación.
- e. El líquido obtenido luego de una nueva filtración fue llevado a una marmita a vapor, donde se calentó a 88 °C durante 3 minutos.
- f. Posteriormente, el mucílago fue envasado en recipientes de plástico etiquetado de 3 litros y evacuado con vapor (envasado de tapa floja).
- g. Tras el envasado, los recipientes eran almacenados en reposo por 12 horas a temperatura ambiente, para asegurar su correcto enfriamiento.
- h. Finalmente, las muestras fueron congeladas a -18 °C hasta su posterior uso.

La recolección de muestras se realizó durante los meses de agosto a enero, por ser el mejor periodo de tiempo (ANECACAO, 2016). Dado que no todas las mazorcas maduran de manera regular, se requirió de coordinación con los productores para esta recolección (Figura 2.5).

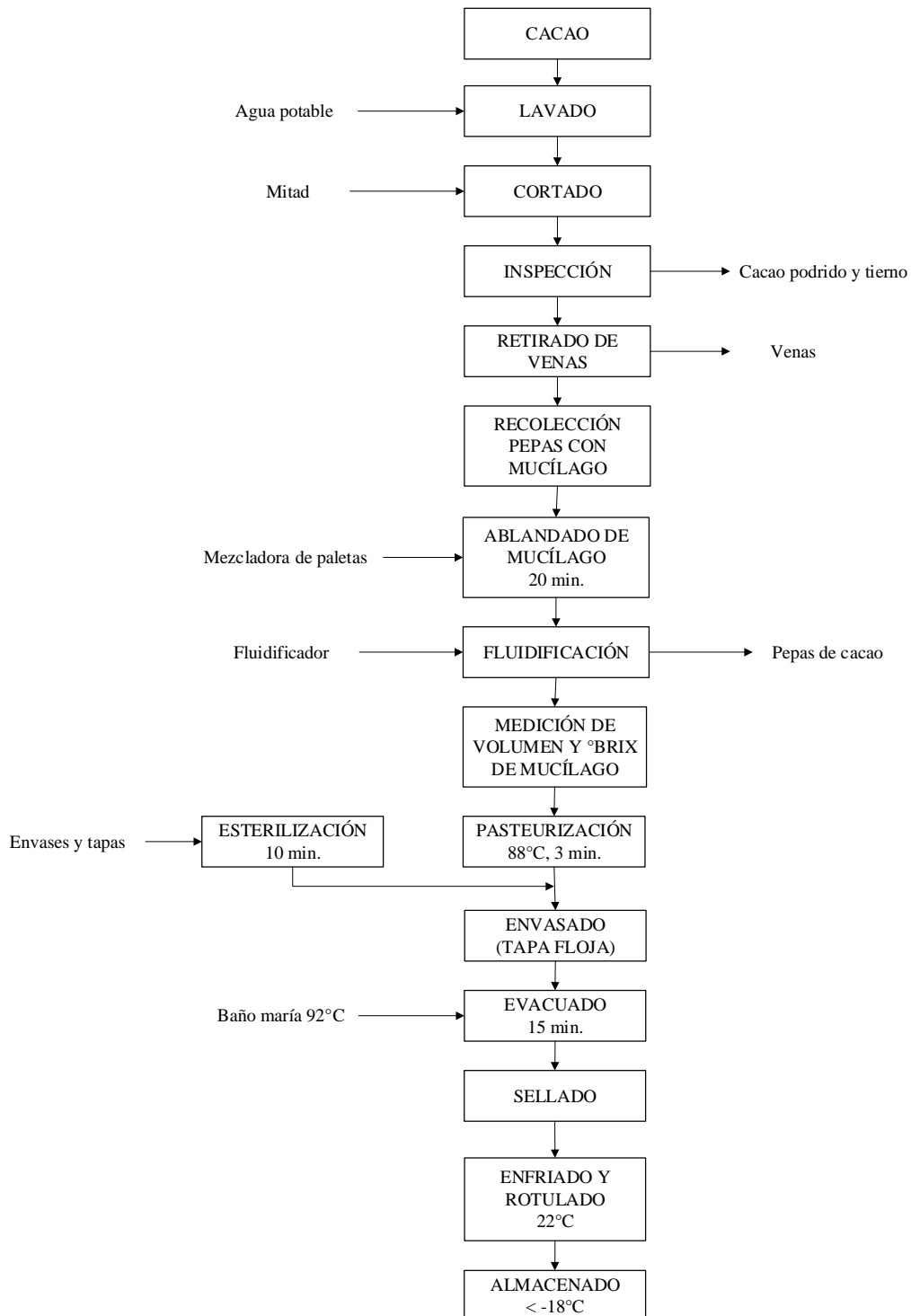


Figura 2.5. Esquema del proceso de extracción del mucílago.

2.1.1.4. Estandarización

Para que el mucílago fuera apto para las pruebas de fermentación se requirió de un tratamiento previo y estandarización, previo a su almacenamiento final y posterior uso.

Para lo cual se realizaron los siguientes pasos:

- a. **Inspección de la materia prima:** Se verificó la pulpa para comprobar si no existía alteraciones o adulteraciones, junto con su contenido de azúcares y pH.
- b. **Tamizado:** Se realizó un tamizado para extraer cualquier objeto extraño.
- c. **Estandarización:** Se estandarizaron las muestras a 20 °Brix mediante concentración por ebullición o disolución con agua destilada a un pH de 3.5.
- d. **Envasado en caliente:** Se envasa en caliente para conseguir un vacío dentro del recipiente a fin de que la materia prima no se deteriore.
- e. **Enfriamiento:** Los envases se enfriaron a temperatura ambiente durante 8 horas.
- f. **Almacenamiento:** El almacenamiento se efectuó mediante congelación a -18 °C.

2.1.2. Caracterización del mucílago

Aunque el objetivo principal de la presente investigación es la determinación de las condiciones necesarias para una potencial producción de etanol a partir de mucílago. Para este objetivo se requiere determinar la concentración de azúcares expresados en grados Brix, su pH, su acidez titulable y la concentración de iones Na^+ , K^+ y Ca^{+2} . Junto a estas medidas se consideró útil determinar diversas propiedades físico-químicas que podrían utilizarse en futuras investigaciones.

Para la caracterización de las diez muestras de mucílago (Tabla 2.3), se siguieron técnicas y metodologías usadas en investigaciones semejantes (Anvoh et al., 2009) adaptadas a los equipos y recursos disponibles, aunque otros fueron realizados en laboratorios independientes, resultados que se detallan en los anexos.

- a. **Concentración de azúcares (°Brix):** Fue determinada mediante un brixómetro ATC, con una escala máxima de 32 °Brix, siendo calibrado mediante el empleo de una solución de glucosa de 10 °Brix (Anexo B).
- b. **pH:** Para su determinación se empleó un potenciómetro Hanna, calibrado con estándares de pH 3.5 y 5.5 (Anexo B).
- c. **Acidez titulable:** Fue determinada mediante un método volumétrico y una solución de hidróxido de sodio, representando la acidez como meq/L de ácido acético (Anexo C y Anexo D).
- d. **Sodio, calcio y potasio:** Para su determinación se utilizó un espectrofotómetro de absorción atómica Varian SpectrAA-110 (Anexo E), utilizando patrones de 10 y 100 ppm para su calibración. Este método tiene como base en la atomización del analito en matriz líquida usando un nebulizador prequemador para crear una niebla de la muestra y un quemador con forma de ranura que da una llama con una longitud de trayecto más larga. La niebla atómica queda desolvatada y expuesta a una energía a una determinada longitud de onda emitida por una lámpara de cátodo hueco.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3. Resumen de parámetros: mucilago de Cacao CCN-51.

<i>Parámetro</i>	<i>Unidad</i>	<i>Medida</i>
Sólidos solubles	°Brix	17.15 ± 0.86
pH	-	4.05 ± 0.004
Acidez titulable	meq/L	245.25 ± 21.19
Calcio	(mg/L)	169.21 ± 31.04
Sodio	(mg/L)	161.85 ± 40.41
Potasio	(mg/L)	462.9 ± 49.96

Como se observa en la Tabla 2.3, las concentraciones de sólidos disueltos, al igual que el pH y la acidez titulable no presentaron variaciones significativas entre las diez muestras, pudiendo asumir que las condiciones de cultivo son similares.

2.1.3. Determinación de azúcares

Si bien la determinación de los °Brix (Tabla 2.3) presenta una visión muy efectiva de la concentración de los azúcares en la muestra, como un complemento se consideró oportuno determinar las concentraciones de los azúcares en forma individual a partir de una muestra aleatoria, ya que como se demostró en la etapa anterior, sus concentraciones eran similares. Para ello se utilizaron los siguientes métodos instrumentales:

- Espectroscopia infrarroja (FT-IR).** Implica la interacción de radiación infrarroja con la materia, midiendo vibraciones producidas por la radiación del espectro infrarrojo (12 800-10 cm^{-1}). Se lo divide en: IR cercano (NIR): 12 800-4000 cm^{-1} , IR medio: 4 000-400 cm^{-1} e IR lejano: 400-10 cm^{-1} . El Anexo F contiene más información sobre la técnica utilizada para la determinación de azúcares.
- Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).** En la HPLC, en su modo isocrático, la muestra pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria (un cilindro con un relleno específico) mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. Sus componentes se retrasan

diferencialmente dependiendo de las interacciones con la fase estacionaria. El grado de retención depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. Puede encontrarse más información acerca de la técnica empleada para la determinación de azúcares en el Anexo G. Esta medición se realizó en un laboratorio externo.

- c. **Espectrofotometría UV-visible.** Esta técnica utiliza luz visible, ultravioleta cercana (UV) e infrarroja cercana (NIR) (longitudes de onda entre 380 nm y 780 nm), que al ser absorbida por las moléculas provoca transiciones electrónicas que pueden ser cuantificadas. El método empleado se detalla en el Anexo H.

La Tabla 2.4 muestra los valores de los distintos azúcares determinados en las muestras, según se obtuvieron mediante las distintas técnicas analíticas mencionadas.

Tabla 2.4. Contenido de azúcares reductores en las muestras de mucílago.

Método	Sacarosa [g/L]	Glucosa [g/L]	Fructosa [g/L]	Total [g/L]
FT-IR	92.00	91.30	88.00	271.30
HPLC	93.44	69.75	55.61	218.80
UV-visible	-	-	-	231.60

Los resultados obtenidos mediante el método HPLC, presentan consistencia al ser comparados con análisis similares (Balladares et al., 2016). Por este motivo puede considerarse sus resultados como los de mayor confianza. No obstante, el uso de técnicas espectrofotométricas es comparativamente más eficiente al momento de realizar los análisis durante la experimentación, por lo que fueron seleccionadas para este tipo de determinaciones (Se et al., 2019). Como puede observarse en la Tabla 2.4, existe una variación importante entre los resultados, la misma es producto de haber sido efectuada en muestras con diferente grado de madurez.

2.1.4. Análisis de micronutrientes, carbono orgánico total y nitrógeno

Como análisis complementarios para una caracterización mucho más detallada del mucílago se decidió analizar otras concentraciones de interés:

- a. **Análisis de trazas elementales o micronutrientes.** Se decidió realizar esta batería de análisis para descartar la presencia de metales pesados como el plomo, que podrían contaminar el producto final o inhibir el proceso fermentativo (Tabla 2.5 y Anexo I). La Tabla 2.5 muestra los resultados obtenidos más significativos en partes por millón (ppm), siendo el más relevante la presencia de azufre. Además, como puede apreciarse, siéndose descartada una presencia significativa de mercurio u otros contaminantes como el plomo. Este análisis se efectuó en un laboratorio externo.

Tabla 2.5. Concentración de micronutrientes en las muestras de mucílago.

<i>Elemento</i>	<i>Concentración</i> [ppm]
Al	0.033
B	0.032
Fe	0.053
Mg	0.076
P	0.017
Pb	0.038
S	22.010

- b. **Carbono Orgánico Total.** Esta determinación permite tener una medida más precisa de la cantidad de materia orgánica en la muestra, complementando la medición de °Brix (ver Tabla 2.3). El carbono orgánico se mide convirtiéndolo a dióxido de carbono (CO₂) por combustión catalítica u oxidación química húmeda, que se mide con un detector infrarrojo. La cantidad es directamente proporcional a la concentración de carbono en la muestra (Tabla 2.6 y Anexo J). Este análisis se realizó en un laboratorio externo.

Tabla 2.6. Carbono Orgánico Total (TOC).

<i>Muestra</i>	<i>Carbono Orgánico Total</i>	
<i>Repeticiones</i> [ppm]	<i>Desviación estándar</i>	<i>Promedio</i>
845.62	24.32	879.35
878.85		
901.43		
891.51		
<i>Resultado</i>	<i>879 351.75 ppm</i> <i>(dilución a 1000 mL)</i>	

- c. **Nitrógeno total y compuestos nitrogenados.** Su concentración permite conocer la presencia materia nutritiva como proteínas y sales nitrogenadas. Para su determinación se utilizaron métodos colorimétricos:
- La determinación de nitritos y nitratos (Tabla 2.7 y Anexo K), se basa en la reacción del ion nitrato con sulfato de brucina en una solución de H₂SO₄ a 100 °C. El complejo coloreado se mide por espectrofotometría a 410 nm. Este análisis se efectuó en un laboratorio externo.
 - Para la determinación de nitrógeno amoniacal (Tabla 2.7 y Anexo L), la muestra se tampona a un pH 9.5 con un tampón de borato y se destila en una solución de ácido bórico. Se adiciona fenol alcalino e hipoclorito para formar indofenol azul que es proporcional a la concentración de amoníaco. El color se intensifica con nitroprusiato de sodio y se mide colorimétricamente. Este análisis se realizó en un laboratorio externo.

Tabla 2.7. Contenido en nitritos, nitratos y nitrógeno amoniacal.

Nitritos [ppm]	Nitratos [ppm]	Amoniacal [ppm]
47 702	<0.014	706 708

- Finalmente, para la determinación del nitrógeno total (Tabla 2.8), se utilizó el método Kjeldahl, mismo que se basa en una mineralización con hidróxido de sodio y posterior destilación con ácido bórico.

Tabla 2.8. Nitrógeno Total Disponible.

Nitrógeno Total Disponible (TNb)		
Mediciones (ppm)	Desviación estándar	Promedio
17.56	1.11	18.98
18.98		
20.26		
19.12		
Resultado	18 977.75 ppm (dilución a 1000 mL)	

2.1.5. Poder calorífico

El poder calorífico de la muestra (calor de combustión) puede definirse ampliamente como el número de unidades de calor liberadas por una unidad de masa de una muestra cuando se quema con oxígeno en un recinto de volumen constante. (Parr Instrument Company, 2007). Para esta determinación se empleó una bomba calorimétrica (Anexo M). Este análisis se realizó en un laboratorio externo. La muestra fue preparada desecándose 250 mL de mucílago mediante liofilización, obteniéndose 22.35 g, que obtuvo un poder calorífico de 13 852 J/g.

2.2. Levadura

El proceso de fermentación alcohólica involucra la transformación de azúcares en etanol, a través de enzimas, sustancias químicas o microorganismos. Se eligió utilizar levadura *Saccharomyces Cerevisiae*, debido a su costo accesible, facilidad de adquisición y manipulación, junto a su resistencia a la inhibición (Eby & Peretti, 2015). A lo anterior se debe agregar que la cinética y metabolismo de esta levadura ha sido ampliamente estudiada, además de existir estudios similares que permitieron establecer puntos de partida para el estudio experimental de la fermentación (véase Tabla 1.8). Aunque mediante procesos de inmovilización se puede mejorar la eficiencia del proceso, esta medida no fue tomada en consideración, debido a que no se empleó una cepa comercial especializada en la producción de etanol (Jin et al., 2012).

La levadura *S. Cerevisiae* (Figura 2.6) sigue rutas metabólicas diferentes según la presencia de oxígeno. En presencia de oxígeno, se somete a la cadena de transporte de electrones mitocondrial y la fosforilación oxidativa, donde la glucosa se convierte en CO_2 , H_2O y energía. En condiciones anaeróbicas, la energía se deriva solo de la etapa de glucólisis y los azúcares a su vez se convierten en subproductos intermedios como el etanol, glicerol y CO_2 . Posteriormente, el etanol se consume utilizando un ciclo de *Krebs* y glioxilato (Kovačević, 2015).

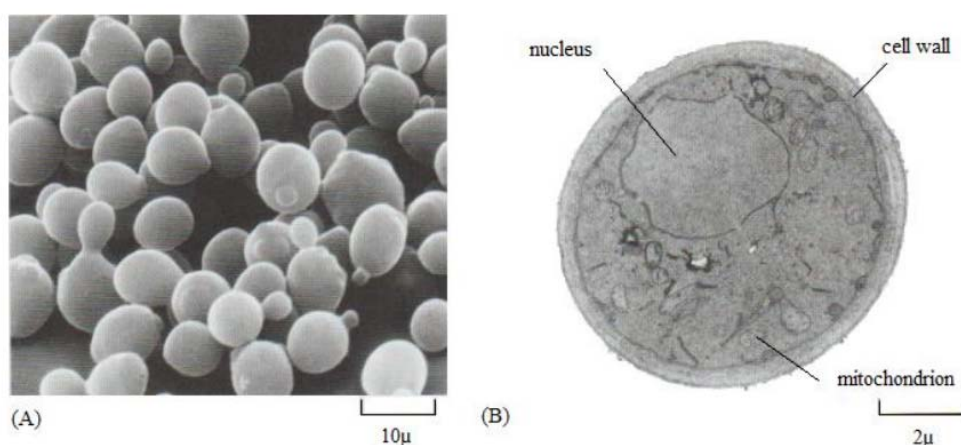


Figura 2.6. Micrografía de *Saccharomyces Cerevisiae*. Adaptado de Kovačević (2015).

El principal componente a considerar en esta etapa del proceso (*prefermentación*) es la adición de las levaduras en forma de extracto nutritivo que dispone de los nutrientes necesarios para el crecimiento de la levadura (ver Tabla 1.8). La *S. Cerevisiae* requiere una actividad acuosa³ (a_w) mínima de 0.65, una temperatura de entre 20 y 30 °C y un pH de 4.5 y 6.5, aunque las levaduras acidifican su entorno de crecimiento (Maicas, 2020). En lo que respecta al oxígeno, no puede crecer en condiciones estrictamente anaeróbicas, debido a que el oxígeno es un factor de crecimiento para la biosíntesis de ácidos grasos de la membrana (Carvalho et al., 2015). Por lo tanto, para fermentaciones alcohólicas efectivas, se puede suministrar algo de oxígeno al inicio de la fermentación, o los ácidos grasos y los factores de crecimiento de esteroides pueden complementarse al medio.

La mayoría de las cepas de *S. Cerevisiae* pueden crecer si se les suministra glucosa, sales de amonio, iones inorgánicos y algunos factores de crecimiento. Los macronutrientes deben suministrarse en concentraciones milimolares, que comprenden fuentes de carbono (azúcares), amino nitrógeno libre (aminoácidos, péptidos pequeños y sales de amonio), oxígeno, azufre, fósforo, potasio y magnesio. Los micronutrientes solo son necesarios para la levadura en concentraciones micromolares, y comprenden elementos traza, tales como calcio, cobre, hierro, manganeso y zinc (Ferreyra et al., 2014; Walker & Stewart, 2016).

³ La actividad acuosa es la presión parcial de vapor de agua en una sustancia dividida por la presión de vapor de agua pura en estado estándar (presión de vapor parcial del agua pura a la misma temperatura).

2.3. Antiespumantes

Otros aspectos a considerar durante el diseño del proceso de fermentación serían la recuperación de las levaduras, la formación de dióxido de carbono y la espuma generada. La primera requiere soluciones tecnológicas que garanticen una recuperación cercana al 85 % (Sobočan & Glavič, 2000), como el uso de centrifugado (Cysewski & Wilke, 1978). El etanol que escapa del reactor en la corriente puede ser recuperado mediante una columna de absorción. La espuma generada requiere ser controlada mediante el empleo de aditivos que podrían afectar el proceso fermentativo. Dado que la formación de espuma es inherente al proceso, deben utilizarse antiespumantes, junto con adaptaciones mecánicas. En general, los antiespumantes actúan en dos vías: previniendo la formación de burbujas o disminuyendo su tiempo de ruptura, por lo cual, al no depender de una reacción química, su intervención puede ser mínima o nula, aunque pudiera afectar al crecimiento de las levaduras y su rendimiento (Karakashev & Grozdanova, 2012).

Para la elección de un antiespumante adecuado para este proceso en particular, se debe tener en cuenta tres aspectos: impacto en el rendimiento, costo y estabilidad térmica (generación de volátiles) (Pauzi et al., 2018). Aunque pueden considerarse otros aspectos como: alteraciones del color o presencia de trazas de antiespumante en el producto final, estas pueden asumirse como poco relevantes, al existir procesos de purificación posteriores.

Para el análisis de su eficacia y posibles interferencias en el proceso fermentativo se tomaron como referencia las primeras 24 horas de fermentación. Utilizando una prueba en blanco, se determinó que el punto de mayor producción de espuma en las condiciones experimentales era en torno a las 6 horas (ver Figura 2.7). Se utilizaron los siguientes antiespumantes:

- a. **Aceite de silicona:** es un producto resistente al calor y de baja toxicidad. No presentó interferencias apreciables en la fermentación. Requiere una dosificación constante en función del nivel de espuma.
- b. **Alginato de sodio:** es usado en alimentos dado su origen vegetal y propiedades aglutinantes, es térmicamente estable y no tóxico. Su solubilidad varía con la temperatura y al presentarse en forma de polvo, requiere de agitación mecánica para su incorporación. Al aplicarlo modifica el pH a 4.03.
- c. **Polietilenglicol:** polímero de origen alcohólico de masa molecular variable, soluble en agua. Su solubilidad varía con la temperatura.

2.3.1. Análisis de la eficacia de los antiespumantes

Para comparar su eficacia se procedió a realizar una fermentación a una temperatura de 35 °C, un pH de 4 y una concentración de levadura de 3 g/L., midiendo el volumen de espuma producida durante la primera hora de fermentación (Figura 2.7). Se escogió este periodo de tiempo, por ser la etapa donde mayor cantidad de espuma se genera durante el proceso.

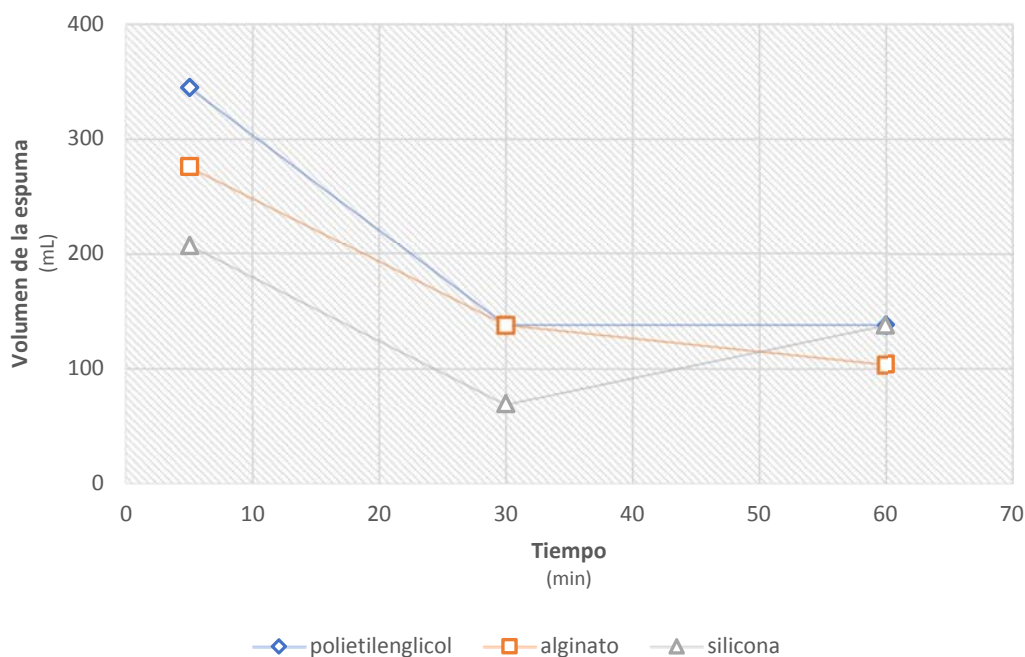


Figura 2.7. Efectividad de los antiespumantes durante la primera hora de acción.

Para los tres casos, el nivel de espuma mínimo se alcanzaba después de los 30 minutos de la aplicación. Como puede observarse en la Figura 2.7, al acercarse a los 60 minutos de fermentación, el volumen de espuma generado fue muy similar para los tres casos. Presentando una afectación mixta en la productividad de la reacción (concentración máxima de etanol para el tiempo de reacción) como se observa en la Tabla 2.9.

Tabla 2.9. Comparación de productividad tras 24 horas de experimentación utilizando antiespumantes.

<i>Antiespumante</i>	<i>Etanol</i> [g/L]	<i>Productividad</i> [g/L*h]
Blanco	24.70	1.029
Silicona	25.18	1.049
Alginato de sodio	21.10	0.879
Polietilenglicol	24.94	1.039

De los compuestos considerados, la silicona presentó mejores resultados, posiblemente por una descomposición de sus componentes formando alcoholes extra. Por su parte, el alginato redujo sensiblemente la producción de etanol, probablemente por sus propiedades aglutinantes. Como se mencionó anteriormente, el principal factor a considerar para la elección del antiespumante fue su efectividad a la hora de evitar la formación de espuma, siendo el polietilenglicol, el componente escogido al ser un compuesto alcohólico y no requerir una dosificación.

2.4. Fermentación

La reacción de fermentación es una reacción homogénea irreversible en fase líquida. La fermentación requiere de varias horas para completarse, por lo que puede modelizarse fácilmente y determinar su cinética a partir del etanol producido, el azúcar consumido o cambios en la biomasa (Dodić et al., 2012). Teóricamente, de cada kilogramo de glucosa consumido, se pueden producir 0,51 kg de etanol (el resumen de la reacción se presenta en la Figura 2.8). Sin embargo, como parte de la fuente de carbono se utiliza para la generación de biomasa, el rendimiento real de etanol es aproximadamente el 90 - 95 % del valor teórico (Sobočan & Glavič, 2000).

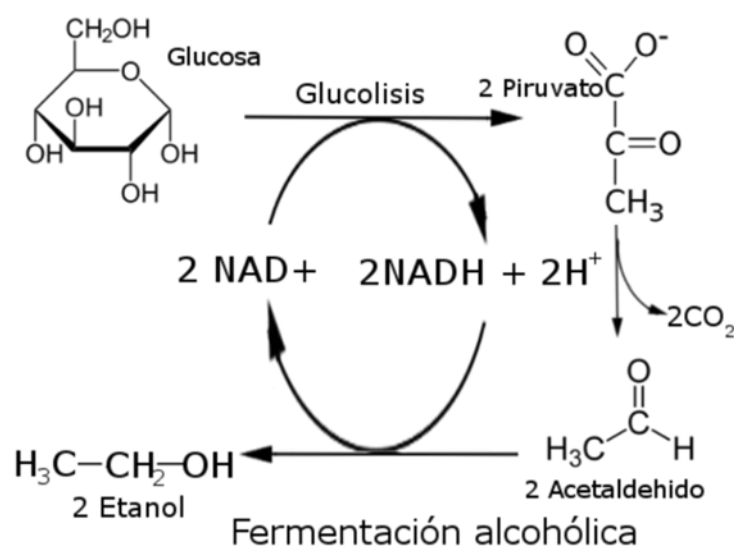


Figura 2.8. Esquema de la reacción de fermentación anaeróbica.

Actualmente, la mayoría de las tecnologías de fermentación industrial se basan en procesos por lotes (Li et al., 2014), como lo es la presente investigación. En principio, los procesos de fermentación continua podrían ser más económicos en comparación con los procesos discontinuos, por no presentar tiempos de parada. Sin embargo, esta tiene debilidades, como una menor concentración de productos finales, un procesamiento posterior más complicado, un diseño de diagrama de flujo de proceso difícil y un complejo mantenimiento de la esterilidad a largo plazo (Li et al., 2014).

2.4.1. Biorreactor

Los biorreactores son sistemas cerrados en los que se puede llevar a cabo un proceso biológico en condiciones ambientales controladas. Es un dispositivo en el que las células vivas o las enzimas utilizan un sustrato de bajo valor para generar un producto de mayor valor. Un sistema de biorreactor comprende un biorreactor, sensores, un sistema de control y software para monitorear y controlar sus operaciones (Benz, 2011; Kaur & Sharma, 2021). Inicialmente, se los llamaba “*fermentadores*”, pero se prefirió el término “biorreactor” durante la Primera Guerra Mundial, donde eran ampliamente usados para la producción de acetona (Schiappacasse, 2013). Su volumen puede variar en el rango de 2-100 litros para escala de laboratorio y hasta 100 m³ para escala industrial. Su configuración más común es el de tanque agitado simple con un eje rotatorio central con palas para asegurar una buena mezcla del medio de cultivo (Benz, 2011; Richelle, 2014). Para esta investigación se seleccionó un biorreactor homogéneo de tanque agitado *Biotron GX Single vessel* (Figura 2.9).

La cinética juega un papel importante en el modelado del biorreactor ideal; por lo tanto, en este capítulo se la detalla de manera simplificada. A menudo se adoptan modelos cinéticos simplificados para obtener soluciones analíticas para la evolución temporal de las concentraciones de reactivos y productos, mientras que se pueden considerar cinéticas más complejas si se permiten soluciones numéricas (Tzouanas et al., 2020). El modelo matemático del reactor discontinuo consta de las ecuaciones de conservación de masa y energía. Se puede escribir un balance de masa independiente para cada componente químico de la mezcla reaccionante, mientras que cuando la energía potencial almacenada en los enlaces químicos se transforma en calor sensible, se pueden producir efectos térmicos muy grandes (Donati & Paludetto, 1997; Howlett & Pudney, 2006).



Figura 2.9. Fotografía del fermentador instalado con sus tuberías y anexos.

2.4.1.1. Acondicionamiento y operación del biorreactor

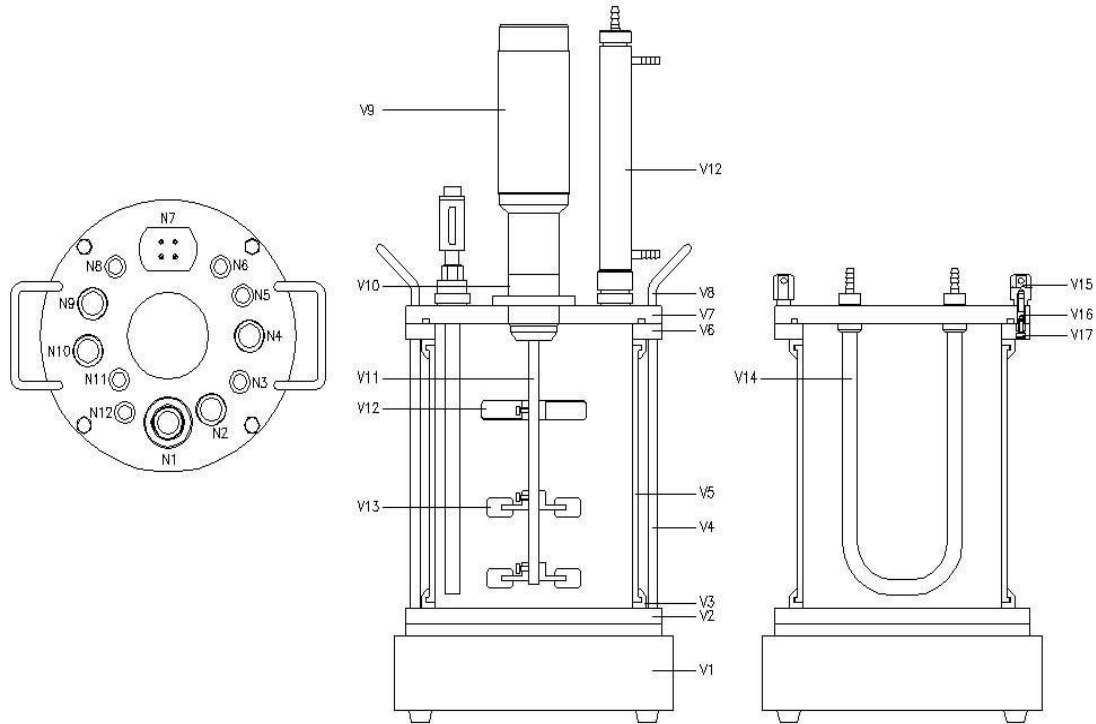
El biocatalizador determina el rendimiento y la selectividad de la reacción, pero la tecnología del proceso suele determinar la productividad (Cooney, 1983; Tathe et al., 2011). Para la batería de experimentos sobre la fermentación, se consideró mantener dos de sus variables constantes: el volumen de la carga y la velocidad de agitación:

- El volumen del reactor es de 2 litros, decidiéndose utilizar un volumen de 1.6 litros de carga, con el fin de asegurar un espacio suficiente para la generación de espuma.
- Para la velocidad de agitación se decidió emplear 250 rpm, velocidad que aseguraba que la espuma generada se mantuviera dentro de los límites. Además, esta velocidad se encontraba dentro de los valores recomendados para este tipo de fermentación (200-400 rpm) (Vlaev et al., 2016).

Si bien los parámetros operativos variaron entre las distintas experiencias, el procedimiento se estandarizó en las siguientes etapas:

- a. Preparación de la materia prima:** Para descongelar el mucílago almacenado, se lo dejaba en reposo a temperatura ambiente por 24 horas antes de realizar el experimento. Tras lo cual se retiraba del envase una alícuota de 2 litros, los cuales eran sometidos a calentamiento directo para alcanzar la temperatura establecida y dilución con agua desmineralizada para alcanzar la concentración requerida.
- b. Acondicionamiento del reactor:** Previo a cada experiencia, los elementos móviles del biorreactor debían ser lavados y esterilizados (Figura 2.10). Para ello se los lavaba con agua caliente, siendo luego esterilizados por vapor en un autoclave a 121 °C, por 20 minutos, para asegurar la asepsia. Mientras que los elementos no móviles, como las boquillas, eran esterilizadas utilizando una lámpara de alcohol.
- c. Acondicionamiento de la muestra:** Una vez cargada la muestra, se ajustaba su pH mediante la adición de soluciones de NaOH 1N o HCl 1N a través de bombas peristálticas.

- d. **Inoculación:** la solución de levadura era ingresada al reactor mediante una bomba peristáltica propia, hasta alcanzar la concentración deseada para el experimento. Esta solución era preparada utilizando una alícuota de 100 mL de la muestra de 1.6 litros, en la que se disolvía la cantidad de levadura necesaria para alcanzar la concentración deseada al interior del reactor.
- e. **Ambientación:** Para asegurar que exista un ambiente anaerobio se reemplazó la atmósfera interna por nitrógeno.
- f. **Muestreo:** Para realizar el muestreo durante el proceso de fermentación, se detenía la agitación para obtener una alícuota de un volumen de 5 mL que era extraída mediante un sifón hacia un tubo de ensayo estéril.



N1	Puerto de inóculo	V1	Placa de calentamiento
N2	Puerto de muestreo	V2	Placa inferior
N3	Puerto de rociadores	V3	Aislante
N4	Puerto del sensor de O ₂ disuelto	V4	Soporte
N5	Puerto de termocupla	V5	Recipiente de vidrio
N6	Puerto del Refrigerante-1	V6	Plato Medio
N7	Alimentación 4P	V7	Placa superior
N8	Puerto del Refrigerante-2	V8	Base
N9	Condensador	V9	Motor de corriente continua
N10	Puerto del sensor de pH	V10	Caja de rodamientos
N11	Línea de transferencia	V11	Eje
N12	Puerto del sensor de espuma	V12	Rompedor de espuma
		V13	Impulsor de turbina
		V14	Refrigerante tipo U
		V15	Tuerca hexagonal
		V16	Perno de placa superior
		V17	Perno de llave

Figura 2.10. Esquema de un Biotron GX.

2.4.1.2. Parámetros óptimos de operación

Los parámetros físico-químicos claves implicados en el análisis experimental dependen en gran medida del tipo de biorreactor, su modo de funcionamiento y los microorganismos elegidos para la operación. Por su parte, la instrumentación estándar debe enfocarse en la medición de temperatura, presión, pH, aireación, velocidad de agitación, espuma y concentración de oxígeno disuelto (Richelle, 2014).

En la Tabla 2.10 y la Figura 2.11, se detallan los resultados de la matriz experimental utilizada para determinar los parámetros óptimos. Los valores referenciales se obtuvieron a partir de datos experimentales previos de fermentaciones con *S. Cerevisiae* (como se expuso en el capítulo 1, Tabla 1.8) y datos de investigaciones similares sobre el mucílago (Anvoh et al., 2009; Romero Cortes et al., 2018; Vallejo et al., 2010), siendo estos los rangos: pH: 4-5, concentración de la levadura 1-3 g/L y temperatura: 25-35 °C.

A partir de la concentración máxima de etanol obtenido (el método de determinación de etanol se detalla en el Anexo N) y el tiempo de reacción (tiempo hasta llegar a la concentración máxima), se determinaron dos índices para determinar la combinación de parámetros que mejor rendimiento presentó:

- **Productividad:** se la obtiene dividiendo la concentración máxima de etanol para el tiempo de reacción.
- **Velocidad máxima de producción (r_{pm}):** para su cálculo se utilizó el *método de optimización mínimos cuadrados no lineales de Levenberg-Marquardt*, ejecutado a través de una modelación en MATLAB.

Para determinar el número de experimentos necesarios se empleó el modelo 2^k . Al ser 3 parámetros los considerados (temperatura, pH y concentración inicial de levadura), se requirieron 2^3 experimentos, es decir, 8 combinaciones distintas de parámetros. Las condiciones de las variables de operación se detallan en la Tabla 2.10.

Tabla 2.10. Matriz experimental con los valores propuestos para temperatura, pH y la concentración de la levadura frente a los resultados obtenidos.

<i>Experimento</i>	<i>Parámetros de operación</i>			<i>Etanol</i> [g/L]	<i>Tiempo de reacción</i> [h]	<i>Productividad</i> [g/L*h]	<i>r_{pm}</i> [g/L*h]
	<i>Temperatura</i> [°C]	<i>pH</i>	<i>Levadura</i> [g/L]				
1	25	4	1	22.84	80	0.29	0.53
2	35	4	1	23.40	50	0.47	0.61
3	25	5	1	18.72	47	0.40	0.93
4	35	5	1	24.11	50	0.49	1.12
5	25	4	3	24.52	80	0.31	0.65
6	35	4	3	25.42	36	0.71	1.13
7	25	5	3	18.94	96	0.20	0.52
8	35	5	3	21.17	44	0.48	0.75

Los resultados de la productividad demostraron que el experimento 6 presentó la mayor concentración de alcohol final, siendo esta de 25.2 g/L cuyas condiciones de operación fueron temperatura: 35 °C, pH: 3 y concentración de levadura: 3 g/L. El experimento 5 presenta valores elevados de concentración de alcohol, sin embargo, es ineficiente por requerir 80 horas de fermentación en comparación a las 36 horas del experimento 6 (ver Figura 2.11 y Figura 2.12). Una vez seleccionadas las condiciones óptimas de operación basadas en la combinación que permitió alcanzar la mayor productividad (concentración de levadura 3 g/L, pH 4 y 35 °C). Con estas condiciones se obtuvo una concentración de alcohol máxima de 25.4 g/L.

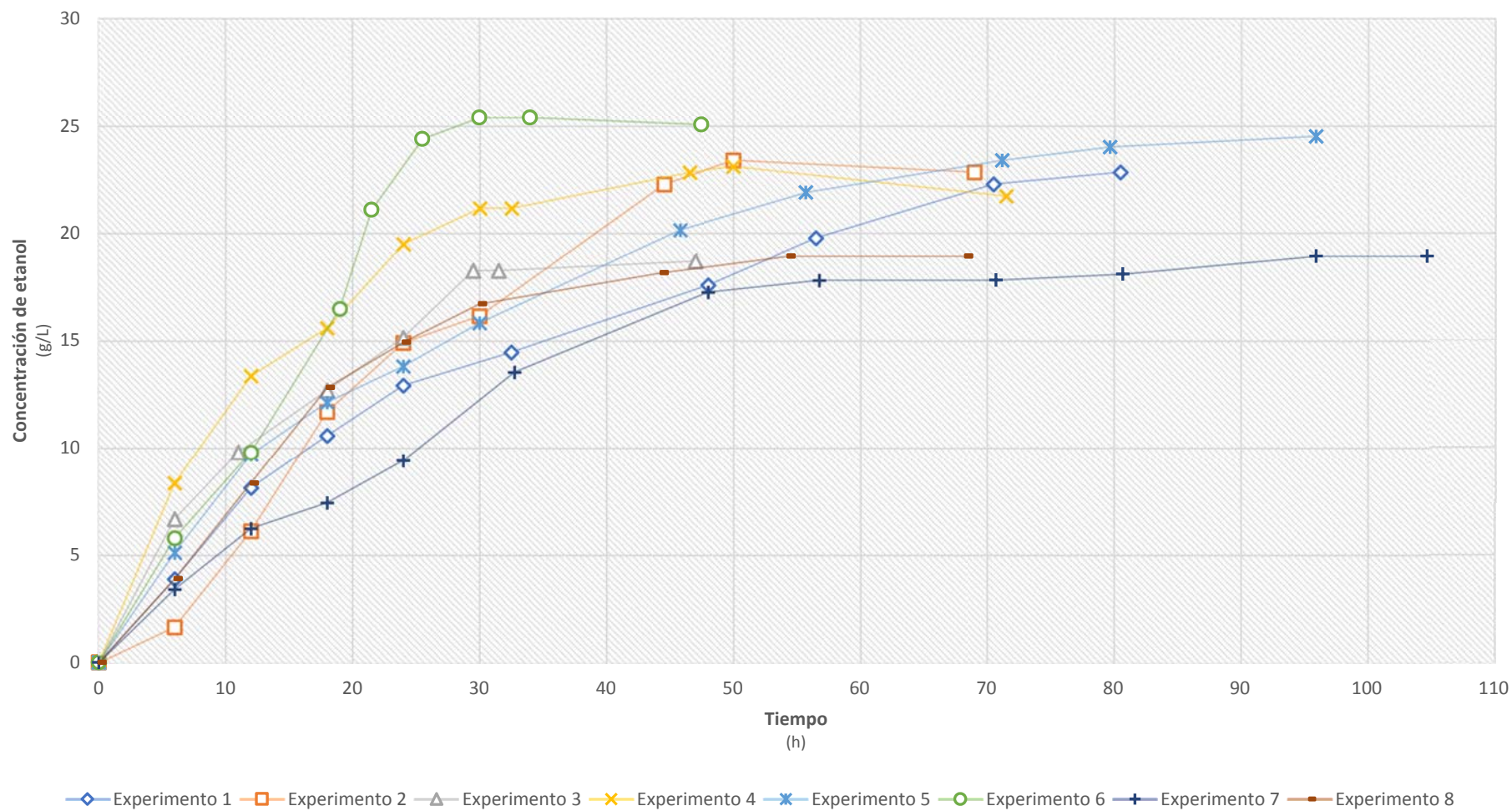


Figura 2.11. Comparación en los resultados obtenidos de etanol para cada experimento propuesto en la matriz experimental (Tabla 2.10).

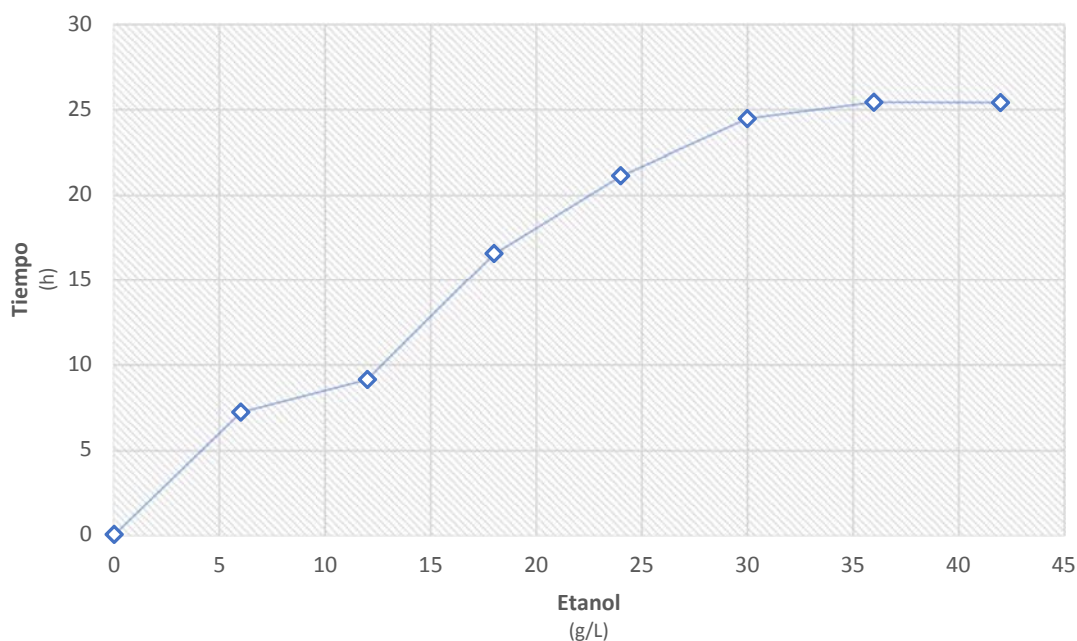


Figura 2.12. Curva de producción de etanol bajo las condiciones óptimas (temperatura: 35 °C, pH: 4 y concentración de levadura: 3 g/L).

Para el muestreo, las alícuotas obtenidas del biorreactor fueron centrifugadas durante 15 minutos a 4 000 rpm, a partir del sobrenadante se analizó la concentración de alcohol y azúcares totales, utilizándose la fracción sólida para analizar la biomasa. A continuación, se compararán dos métodos que se emplearon para la determinación de la biomasa y de esta manera obtener los datos necesarios para la construcción de los modelados matemáticos. En esta determinación se aplicaron dos métodos: peso seco con lavados y liofilización (para una descripción del proceso revisar Anexo O), mismos que presentaron una variación relativa en sus resultados, debido en parte a la eliminación de volátiles en el primer método (ver Tabla 2.11 y Figura 2.13). Teniendo en cuenta este comportamiento se concluyó que el método basado en liofilización resultó ser el más fiable para esta determinación, creando así la tabla de datos necesarios para la modelización (Tabla 2.12).

Tabla 2.11. Valores de la concentración de biomasa obtenidos por los métodos de liofilización y peso seco, producida bajo las condiciones óptimas (temperatura: 35 °C, pH: 4 y concentración de levadura: 3 g/L).

Horas	Concentración de Biomasa [g/L]	
	Liofilización	Peso seco
0	0.41	0.14
6	3.09	2.05
12	5.18	4.37
18	5.69	5.68
24	5.85	6.86
30	6.20	6.85
36	6.20	6.80
42	6.20	5.43
48	6.20	5.43

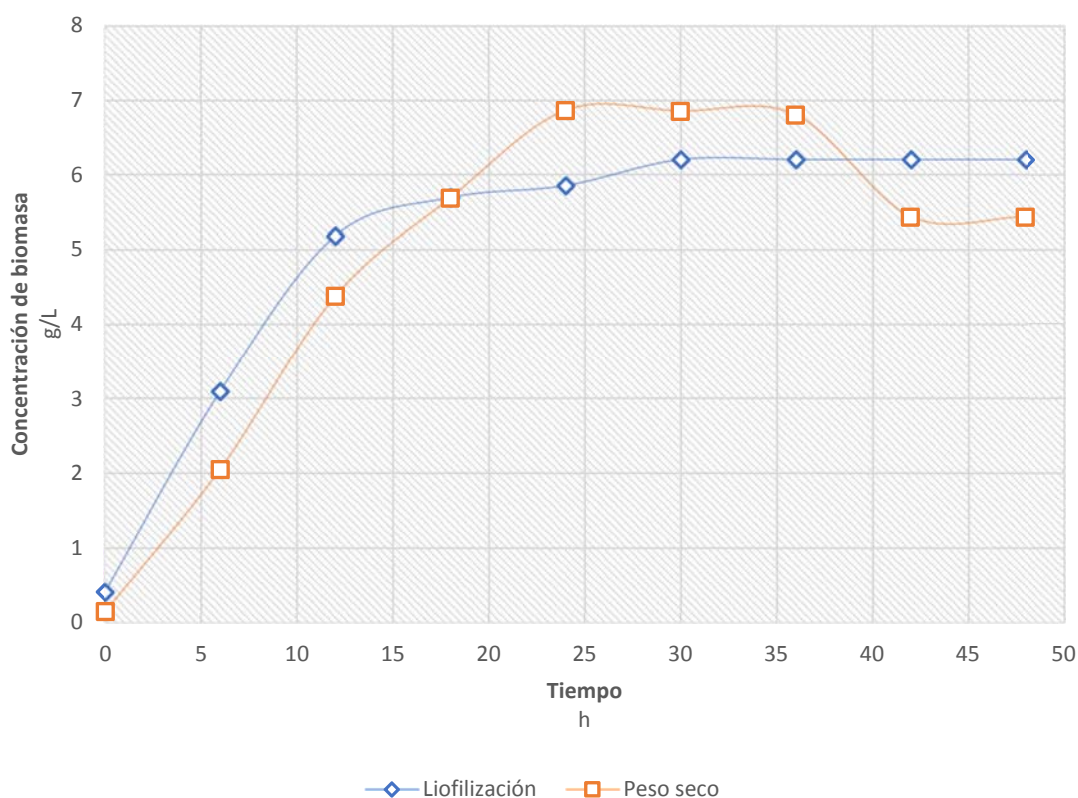


Figura 2.13. Comparación de la concentración de biomasa mediante el método de peso seco con lavados y liofilización, durante una fermentación bajo condiciones óptimas (temperatura: 35 °C, pH: 4 y concentración de levadura: 3 g/L).

Tabla 2.12. Concentraciones experimentales de etanol, azúcares totales y biomasa durante una fermentación bajo en las condiciones óptimas (temperatura: 35 °C, pH: 4 y concentración de levadura: 3 g/L).

Horas [h]	Etanol [g/L]	Azúcares Totales [g/L]	°Brix	Biomasa [g/L]
0	0.00 ± 0.00	231.48 ± 2.04	17	0.41 ± 0.07
6	7.19 ± 0.67	185.58 ± 10.26	15	3.09 ± 0.11
12	9.11 ± 2.04	110.18 ± 9.42	12	5.18 ± 0.17
18	16.51 ± 0.13	81.71 ± 3.86	10	5.39 ± 0.28
24	21.10 ± 0.68	33.01 ± 1.89	7.5	5.85 ± 0.76
30	24.45 ± 0.68	28.02 ± 2.46	6.5	6.20 ± 0.13
36	25.41 ± 0.67	31.99 ± 0.87	6	6.20 ± 0.25
42	25.39 ± 0.19	30.68 ± 1.42	6	6.20 ± 0.09

Finalmente, se completó este análisis con la medición de la reproducción de las levaduras. Mediante el conteo directo de levaduras (ver Anexo P) se contabilizó el valor de las unidades propagadoras de colonias por mL de muestra (UPC) (Figura 2.14).

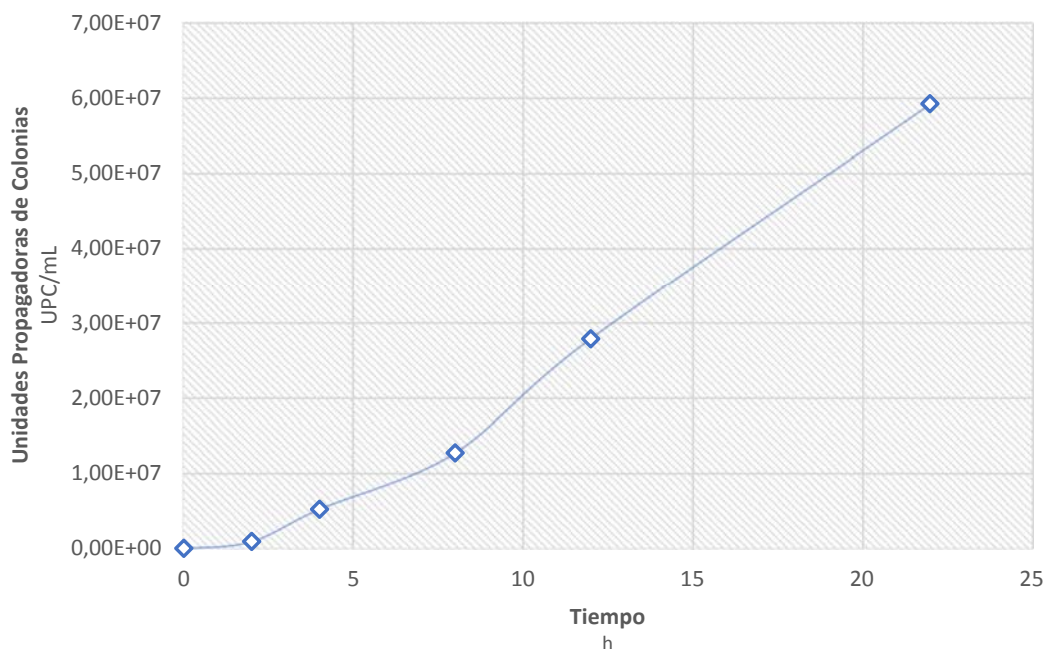


Figura 2.14. Curva de crecimiento de levaduras en condiciones óptimas (temperatura: 35 °C, pH: 3 y una concentración de levadura: 3 g/L).

2.4.2. Modelización

La fermentación es una reacción homogénea, irreversible, compleja, es decir, su mecanismo comprende más de un paso elemental. Esta condición provoca que su cinética no concuerde necesariamente con un modelo determinado (Romero Cortes et al., 2018). Al estar basada en el crecimiento microbiano, su modelado debe considerar las concentraciones de células iniciales y restringir sus variables a las condiciones óptimas para estas (Kovačević, 2015; Sultana et al., 2017). Las mejoras en el modelado e interpretación son clave para el control y la optimización de los procesos de producción. Estos representan verdaderos desafíos científicos debido a la variabilidad inherente de los complejos sistemas biológicos que están involucrados en procesos como la fermentación (Richelle, 2014), además de que los modelos existentes presentan varias limitaciones:

- Los modelos desarrollados para describir la dinámica del cultivo se limitan principalmente a las fuentes de carbono, independientemente de las otras reacciones metabólicas básicas que influyen en gran medida en lo que sucede dentro de las células.
- Los modelos que tienen en cuenta un metabolismo más específico, como el del nitrógeno, suelen ser demasiado complejos para utilizarlos con fines de optimización de procesos.
- Los modelos desarrollados a nivel académico a menudo no tienen en cuenta las limitaciones inherentes a una producción industrial, donde las necesidades y los objetivos son diferentes.
- Los criterios de optimización se limitan a menudo a la productividad y/o el rendimiento sin tener en cuenta las limitaciones vinculadas al control de calidad de los productos finales.

Estas limitaciones se deben, en parte, a muchas preguntas aun sin respuesta sobre cómo llevar a cabo el proceso de producción para asegurar algunas propiedades cualitativas del proceso de producción de la levadura (Richelle, 2014):

- ¿Cómo definir la calidad de la levadura como producto terminado?
- ¿Cuáles son los factores intracelulares que influyen en la calidad de la levadura?
- ¿Se puede actuar sobre los factores intracelulares que influyen en la calidad de la levadura utilizando solo los perfiles de tiempo de alimentación de las fuentes de carbono y nitrógeno?

La relación entre la tasa de crecimiento específica (μ) de una población de microorganismos y la concentración de sustrato (S) está representada por un conjunto de leyes de tasas derivadas empíricamente denominadas modelos de crecimiento (Ge & Bai, 2006). Estos modelos no son más que expresiones matemáticas generadas para describir el comportamiento de un sistema dado (Okpokwasili & Nweke, 2005). Sirven para predecir la tasa de crecimiento, la tasa de utilización del sustrato, así como la tasa de formación de productos. Hay varios factores que afectan la cinética de crecimiento, incluida la limitación del sustrato, la inhibición del sustrato, la inhibición del producto, así como la inhibición de los componentes tóxicos (Thangprompan et al., 2013). A pesar de su utilidad, los modelos presentan varias limitaciones debido a que estos representan un orden superior y algunos de ellos se describen mediante ecuaciones diferenciales parciales. A esto debe agregarse que hay demasiados parámetros que no se pueden determinar individualmente (Romero Cortes et al., 2018).

Posteriormente, se analizó un modelo para la producción de alcohol y a continuación tres modelos matemáticos especializados en el crecimiento poblacional. Los resultados experimentales obtenidos se ajustaron a diferentes modelos matemáticos utilizando un *método de mínimos cuadrados no lineales de Levenberg-Marquardt* programado en MATLAB®. Para los casos que se requería resolver los modelos diferenciales se utilizó un método de *Runge-Kutta* de tercer orden (ODE23).

2.4.2.1. Modelo de Gompertz modificado

A partir de los resultados, podría usarse una ecuación logística o de Gompertz modificada para describir el crecimiento de la levadura, siendo el modelo de Gompertz modificado (ec. 2.3) el más adecuado para modelar la producción de etanol (Okpokwasili & Nweke, 2005; Phukoetphim et al., 2017). Para la predicción de la formación de bioetanol, este modelo presenta la concentración máxima del producto, la tasa de producción máxima y la fase de retardo (período lag).

$$P = P_{max} * \exp \left\{ -\exp \left[\left(\frac{r_{pm} * \exp \exp (1)}{P_{max}} \right) (t_l - t) + 1 \right] \right\}$$

ec. 2.3. Ecuación de Gompertz modificado para el crecimiento de biomasa.

- **P**: concentración de etanol [g/L]
- **P_{max}**: concentración máxima de etanol [g/L]
- **r_{pm}**: velocidad máxima de producción de etanol [g/L·h]
- **t**: tiempo de fermentación [h]
- **t_l**: tiempo de retardo logarítmico [h]

Empleando los datos obtenidos en los distintos experimentos propuestos (Tabla 2.10) y aplicados en la ec. 2.3, se obtuvieron los diferentes comportamientos teóricos del proceso, representados en la Tabla 2.13, que obtuvieron un coeficiente de correlación de 0.9762. Como puede observarse en la Figura 2.16, los resultados son comparables a los obtenidos en su contraparte experimental, donde las concentraciones más altas de etanol final, se producían en las condiciones propuestas en el experimento 6. Confirmando de esta forma la elección de las condiciones óptimas determinadas en la etapa experimental (temperatura: 35 °C, pH: 4 y una concentración de levadura: 3 g/L).

Tabla 2.13. Concentraciones de etanol experimentales a condiciones de fermentación óptimas (temperatura: 35 °C, pH: 3 y concentración de levadura: 3 g/L) y frente a las calculadas mediante la ecuación de Gompertz modificada.

<i>Tiempo</i> [h]	<i>Etanol experimental</i> [g/L]	<i>Etanol teórico</i> [g/L]
0	0	0.77
6	7.19	4.75
12	9.11	11.31
18	16.52	17.11
24	21.10	20.86
30	24.46	22.93
36	25.42	23.99

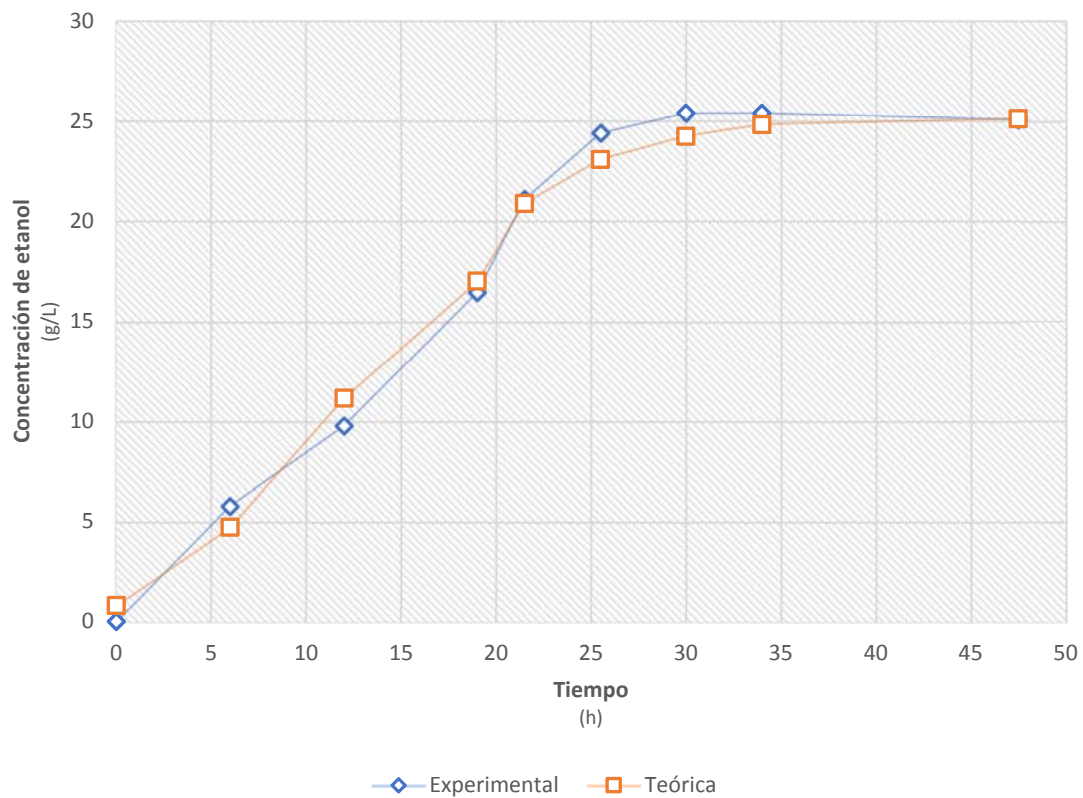


Figura 2.15. Concentraciones de etanol experimentales a condiciones de fermentación óptimas (temperatura: 35 °C, pH: 3 y concentración de levadura: 3 g/L) y frente a las calculadas mediante la ecuación de Gompertz modificada.

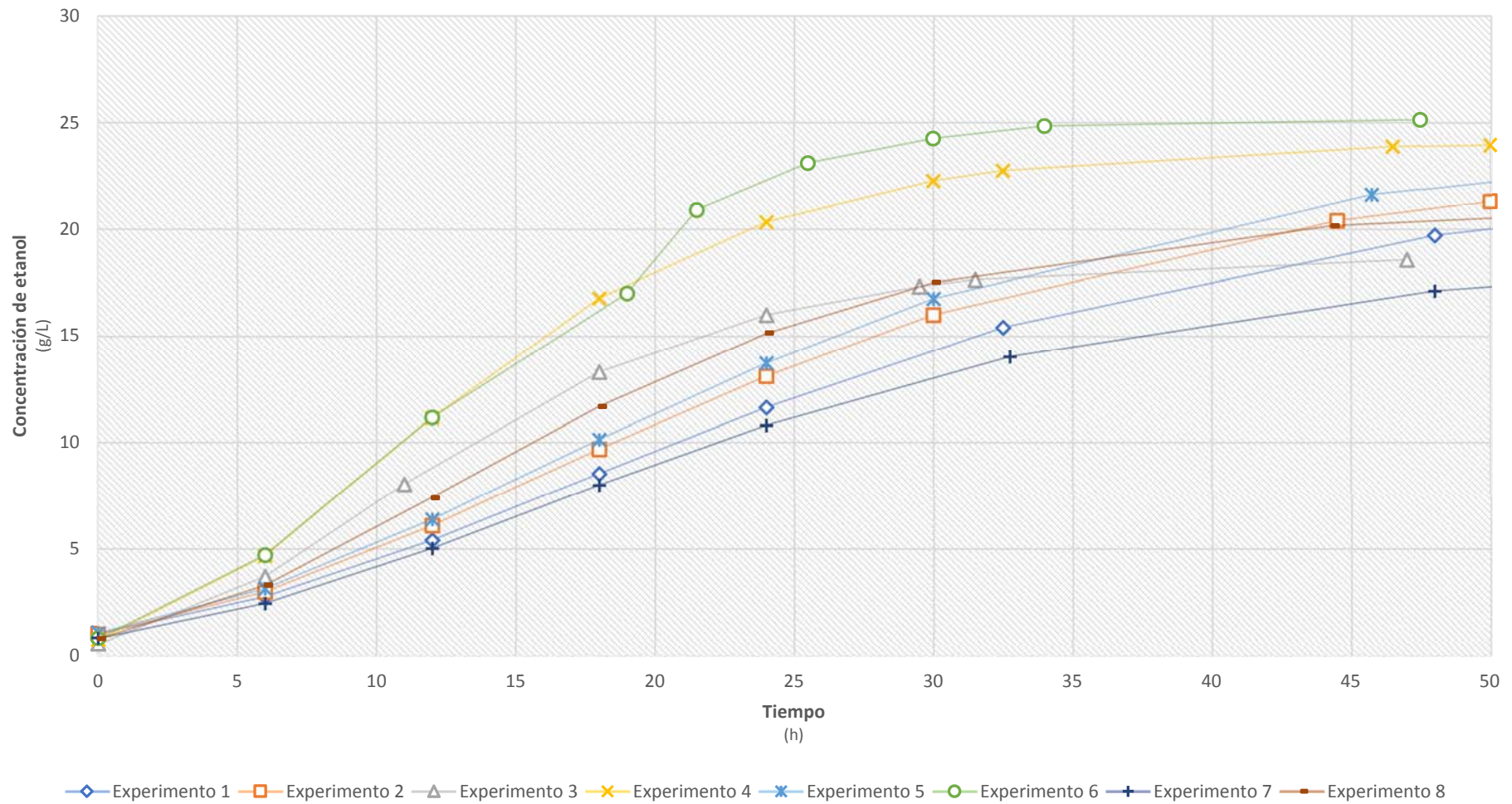


Figura 2.16. Comparación entre las curvas calculadas mediante el modelo para los datos experimentales propuestos en la matriz experimental.

2.4.2.2. Modelo de Monod

La ecuación empírica de Monod es la expresión de velocidad más común para describir el crecimiento de microorganismos (Liu, 2017). Este modelo propone usar una ecuación para relacionar las tasas de crecimiento de la levadura en un ambiente acuoso con la concentración de un nutriente limitante (ec. 2.4). Es aplicable cuando hay una presencia mínima de inhibidores, es decir, en los hidrolizados utilizados como medio de fermentación y como subproductos metabólicos producidos por el fermentador durante la fermentación (Dlangamandla et al., 2019). Además, solo es aplicable para el crecimiento equilibrado, es decir, cuando se ha establecido un estado pseudo-estacionario, por lo tanto, no es aplicable en la fase de latencia (Liu, 2017).

$$\mu = \frac{\ln \ln X_L - \ln \ln X_0}{t_L - t_0}$$

ec. 2.4. Modelo de crecimiento celular de Monod.

- μ : tasa de crecimiento de levaduras [h^{-1}]
- X_0 : concentración celular inicial de la fase logarítmica [g/L]
- X_L : concentración celular final de la fase logarítmica [g/L]
- t_0 : tiempo de incubación al inicio de la fase logarítmica [h]
- t_L : tiempo de incubación final de la fase logarítmica [h]

El valor de la tasa de crecimiento específico (μ) de la fermentación discontinua de etanol a partir del mucílago de cacao fue de 0.2113 h^{-1} , los valores de la fase logarítmica X_L , X_0 , t_L y t_0 fueron 5.18 g/L; 0.41 g/L; 12 h y 0 h; respectivamente. En la Figura 2.13 se puede visualizar claramente la fase de crecimiento exponencial de la concentración de biomasa en las condiciones óptimas de operación, cuyos valores se representan en la Tabla 2.11.

2.4.2.3. Modelo logístico

En el crecimiento de levaduras, el modelo logístico describe los cambios en la cantidad de organismos que tienen lugar desde la concentración inicial de biomasa hasta la concentración máxima del mismo; sin embargo, este modelo no tiene en consideración la inhibición del sustrato. Se lo ha utilizado para estudiar la relación de causa y efecto entre la “capacidad de carga” (es decir, el tamaño de la población que los recursos disponibles pueden soportar) y el tamaño de la población (Rodrigo & Zulkarnaen, 2022). Describe la relación de la biomasa (X) con la concentración inicial de células (X_i), la concentración máxima de células (X_{max}) y la tasa de crecimiento específico máximo (μ_{max}) en momentos específicos (t) (Phukoetphim et al., 2017).

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} \left(1 - \frac{X}{X_{max}}\right) X$$

$$X = \frac{X_i \cdot \exp(\mu_{max} \cdot t)}{1 - \left(\left(\frac{X_i}{X_{max}}\right)(1 - \exp(\mu_{max} \cdot t))\right)}$$

ec. 2.5. Ecuación logística integrada.

- μ : tasa de crecimiento específica de las levaduras [h^{-1}]
- μ_{max} : tasa de crecimiento específica máxima de las levaduras [h^{-1}]
- X : relación de la biomasa
- X_i : concentración inicial de células [g/L]
- X_{max} : la concentración máxima de células en momentos específicos [g/L]
- t : tiempo [h]

En la Tabla 2.14 se muestran los resultados de los parámetros cinéticos obtenidos con este modelo y la Figura 2.17 representa la relación entre la concentración de biomasa y el tiempo de fermentación. Los parámetros cinéticos se deben obtener mediante métodos de regresión lineal y no lineal (Farias et al., 2014), utilizándose el *método de mínimos cuadrados no lineales de Levenberg-Marquardt* programado en MATLAB®.

Tabla 2.14. Parámetros cinéticos obtenidos del modelo logístico.

Parámetros	Experimental	Calculado	Unidades
μ_{\max}	-	0.40 ± 0.03	$[\text{h}^{-1}]$
X_i	0.41 ± 0.07	0.41 ± 0.07	$[\text{g/L}]$
X_{\max}	6.20 ± 0.25	6.20 ± 0.14	$[\text{g/L}]$

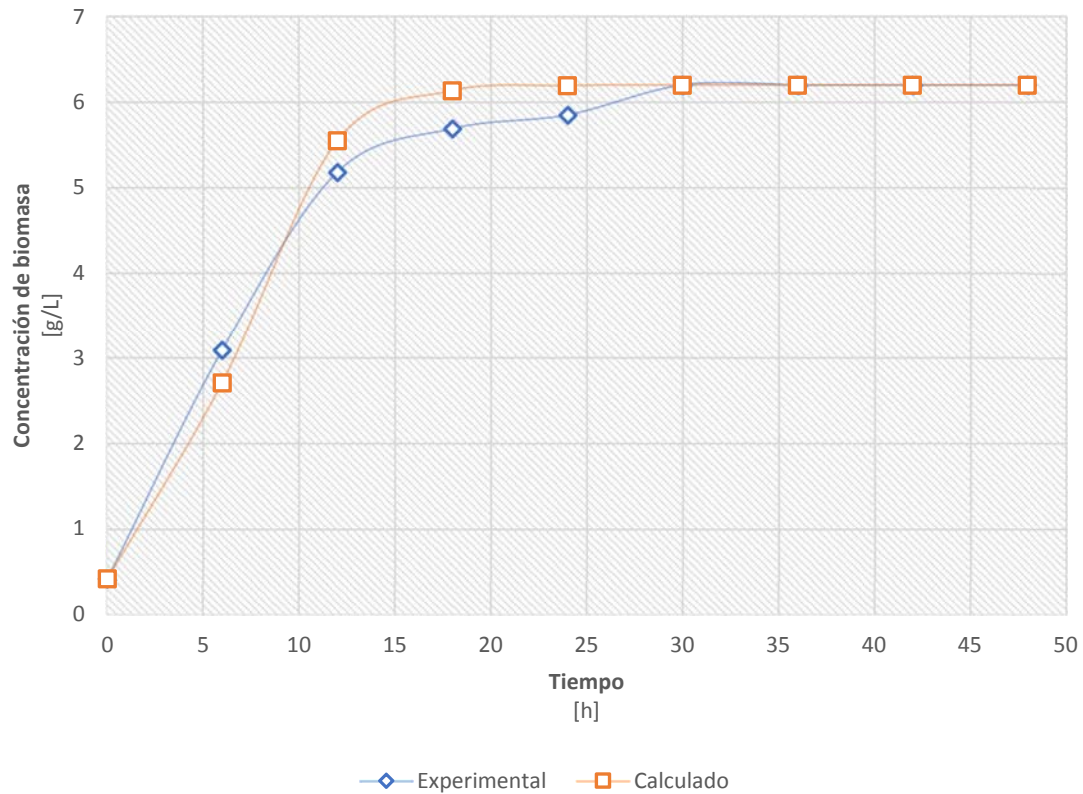


Figura 2.17. Curva de producción de biomasa y ajuste a la ecuación logística integrada de los datos experimentales obtenidos a condiciones óptimas (temperatura: 35 °C, pH: 4 y concentración de levadura: 3 g/L).

El modelo logístico tuvo un $R^2 = 0.9696$, aunque no incluyó el consumo de sustrato y los términos de inhibición del producto. El valor calculado de la concentración máxima de biomasa (6.20 g/L) es consistente con el dato experimental (6.20 g/L).

2.4.2.4. Modelo de Andrews y Levenspiel

Es uno de los modelos más utilizados debido a su simplicidad y amplia aceptación para describir la cinética de inhibición del crecimiento de microorganismos (Tazdaït et al., 2013). Durante la fermentación, los principales factores inhibitorios son las altas concentraciones de azúcar y etanol. Ambos agentes afectan al crecimiento de la levadura de una manera inhibitoria no competitiva. A diferencia de los modelos anteriores, este incluye la inhibición del sustrato y del producto (ec. 2.6).

$$\mu = \left(\frac{\mu_{max} \cdot S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_{IS}}} \right) \cdot \left(1 - \frac{P_E}{P_{Xmax}} \right)^\alpha$$

ec. 2.6. Ecuación de Andrews y Levenspiel para la tasa de crecimiento microbiano.

- μ : tasa de crecimiento específico [h^{-1}]
- μ_{max} : tasa de crecimiento específico máxima [h^{-1}]
- S : concentración de azúcares [g/L]
- K_S : constante de *Monod* [g/L]
- K_{IS} : constante de inhibición del sustrato para el crecimiento [g/L]
- P_E : concentración de etanol [g/L]
- P_{Xmax} : concentración máxima de etanol [g/L]
- X : concentración de levadura [g/L]
- α : constante de inhibición de etanol [g/L]

El etanol es un metabolito primario del crecimiento de la levadura en condiciones anaeróbicas y su formación está asociada con el crecimiento celular, parámetro que también puede ser considerado en la ecuación de *Andrews y Levenspiel* (ec. 2.7).

$$q_E = \left(\frac{q_{max} \cdot S}{K_{SE} + S + \frac{S^2}{K_{IE}}} \right) \cdot \left(1 - \frac{P_E}{P_{Emax}} \right)^\beta$$

ec. 2.7. Ecuación de Andrews y Levenspiel para la producción de etanol.

- q_{max} : tasa máxima de producción específica de etanol [g/(g·h)]
- q_E : tasa de producción específica de etanol [g/(g·h)]
- S : concentración de azúcares [g/L]
- K_{SE} : constante de saturación de etanol [g/L]
- K_{IE} : constante de inhibición de los azúcares para la formación de etanol [g/L]
- P_E : concentración de etanol [g/L]
- P_{Emax} : concentración máxima de etanol para la fermentación alcohólica [g/L]
- X : concentración de levadura [g/L]
- β : constante de inhibición de etanol [g/L]

Para este modelo se utilizaron las concentraciones de biomasa determinadas por liofilización (Figura 2.11), obteniéndose los parámetros presentados en la Tabla 2.15.

$$\frac{dX}{dt} = X \left(\frac{\mu_{max} S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_{IS}}} \right) \left(1 - \frac{P_E}{P_{X,max}} \right)^\alpha$$

ec. 2.8. Tasa de crecimiento de biomasa.

$$\frac{dP_E}{dt} = X \left(\frac{q_{max} S}{K_{SP} + S + \frac{S^2}{K_{IP}}} \right) \left(1 - \frac{P_E}{P_{P,max}} \right)^\beta$$

ec. 2.9. Tasa de formación de producto.

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{X/S}} \left(\frac{dX}{dt} \right) + \frac{1}{Y_{P/S}} \left(\frac{dP_E}{dt} \right) + mX$$

ec. 2.10. Tasa de consumo de sustrato.

Tabla 2.15. Parámetros cinéticos obtenidos del modelo de Andrews y Levenspiel.

Parámetro	Medida	Unidad
μ_{max}	0.34 ± 0.05	$[h^{-1}]$
q_{max}	2.48 ± 0.33	$[h^{-1}]$
K_S	1.32 ± 0.37	$[g/L]$
K_{SP}	39.82 ± 0.22	$[g/L]$
K_{IS}	938.99 ± 48.63	$[g/L]$
K_{IP}	99.72 ± 2.69	$[g/L]$
$Y_{X/S}$	0.15 ± 0.03	$[g/g]$
$Y_{P/S}$	0.10 ± 0.004	$[g/g]$
m	$5.71E-06 \pm 5.35E-06$	$[h^{-1}]$
$P_{X,max}$	23.14 ± 1.07	$[g/L]$
α	1.49 ± 0.004	$[g/L]$
β	1.39 ± 0.09	$[g/L]$

Se utilizó la liofilización y el método de peso seco para determinar la biomasa en las muestras, analizándose cuál de ellos se ajustaba mejor a la predicción resultante de la aplicación de los datos a las ecuaciones de este modelo (ec. 2.6 y ec. 2.7), tanto de la producción de biomasa (Figura 2.18), la producción de etanol (Figura 2.19) y el consumo de sustrato (Figura 2.20).

De acuerdo con los coeficientes de determinación (R^2) (Tabla 2.16) se puede observar que el método de liofilización presentó un mejor ajuste.

Tabla 2.16. Coeficientes de determinación del Modelo de Andrews y Levenspiel.

Curvas	R^2
<i>Concentración de etanol</i>	<i>0.95</i>
<i>Concentración de sustrato</i>	<i>0.98</i>
<i>Concentración de biomasa</i>	<i>0.90</i>

Los valores obtenidos tanto en la Tabla 2.15 y la Tabla 2.16, son consistentes con otras investigaciones similares (Ariyajoenwong et al., 2016).

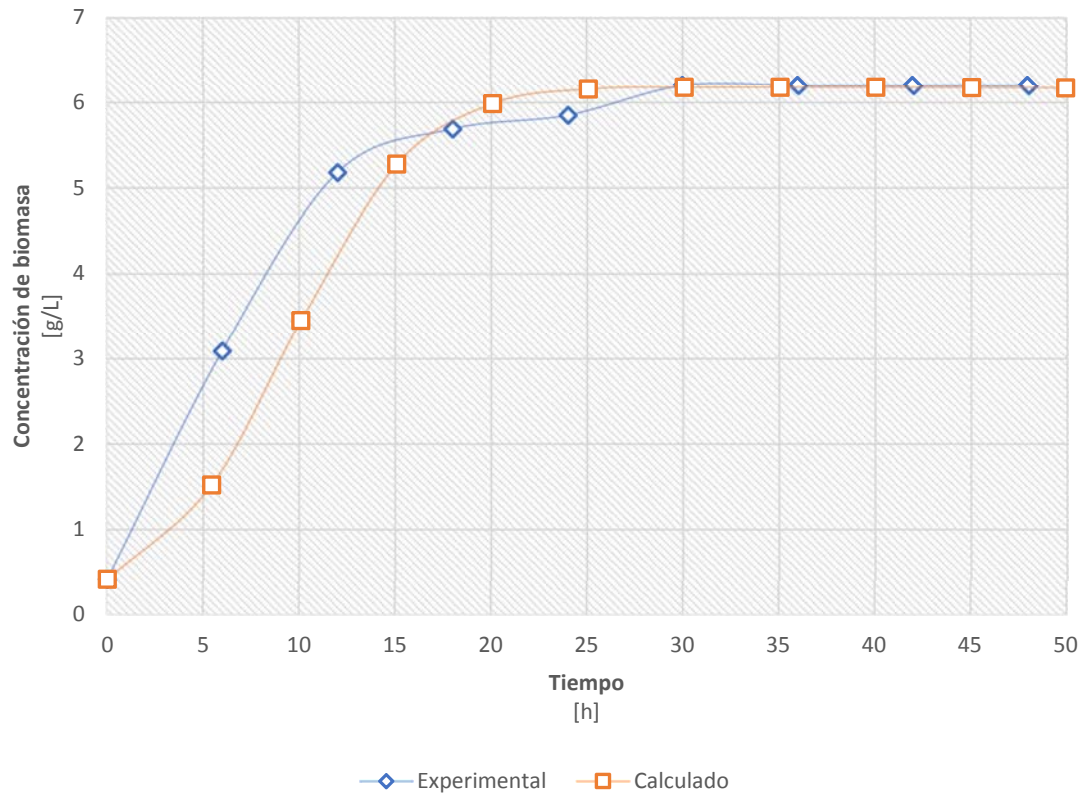


Figura 2.18. Producción de biomasa según el Modelo de Andrews y Levenspiel.

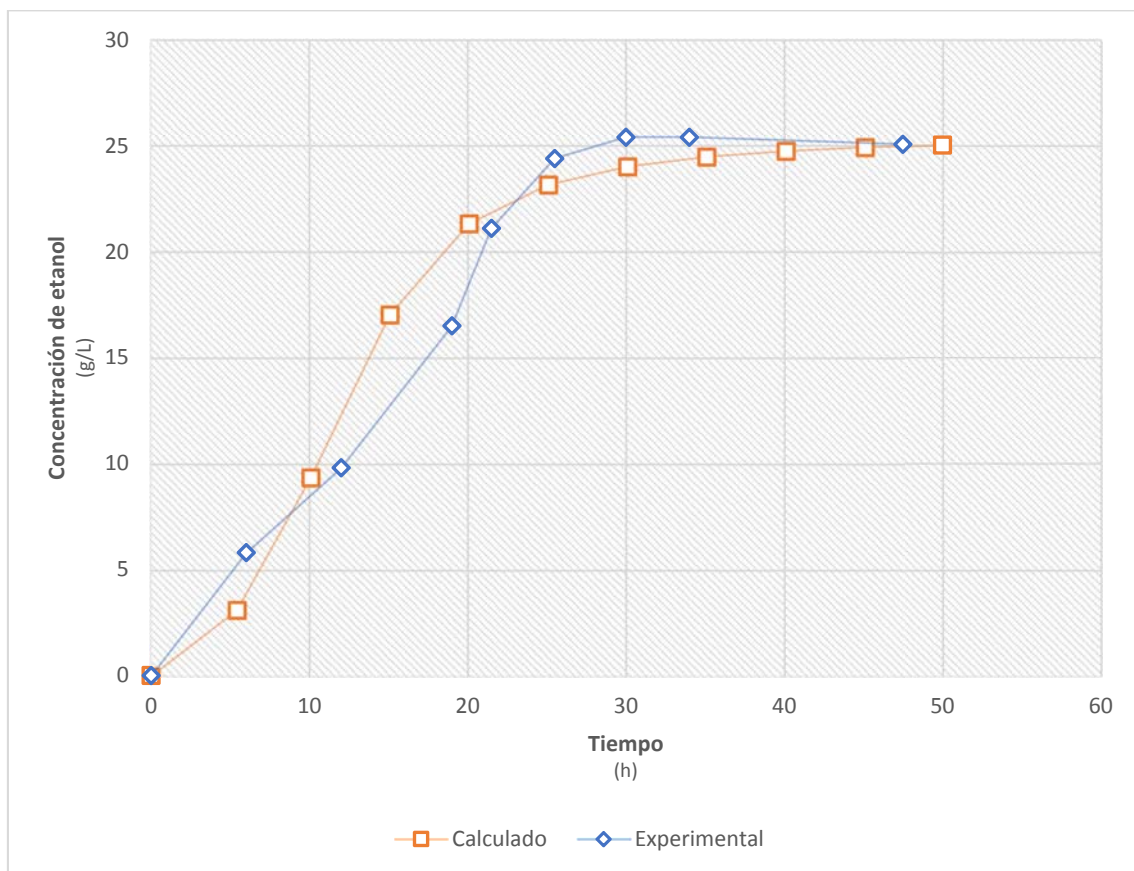


Figura 2.19. Producción de etanol según el Modelo de Andrews y Levenspiel.

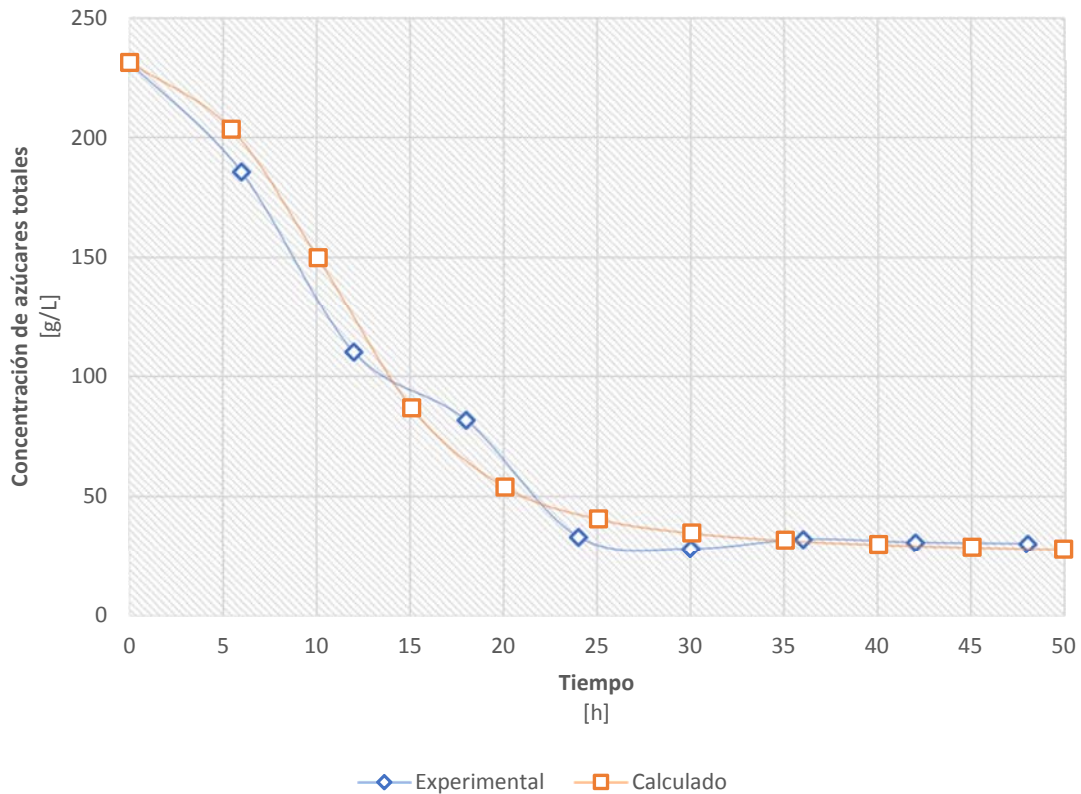


Figura 2.20. Consumo de azúcares aplicando el modelo de Andrews y Levenspiel.

Todos los modelos evaluados tuvieron un ajuste razonable ($R^2 > 0.90$), pudiendo observarse en la Figura 2.21 los valores de concentración de biomasa, mientras que los valores de la producción de alcohol se muestran en la Figura 2.22. Así, los valores del modelo coinciden con los obtenidos experimentalmente, por lo que es razonable considerar que estos modelos son aptos para ser los de referencia. Sin embargo, se debe puntualizar que el método de Andrews y Levenspiel considera más aspectos como los términos de inhibición del sustrato y del producto, por lo que es más sensible a cambios en las condiciones de operación. Un análisis profundo sobre la modelización se expuso en un artículo anexo a esta investigación, que puede revisarse en el Anexo Q.

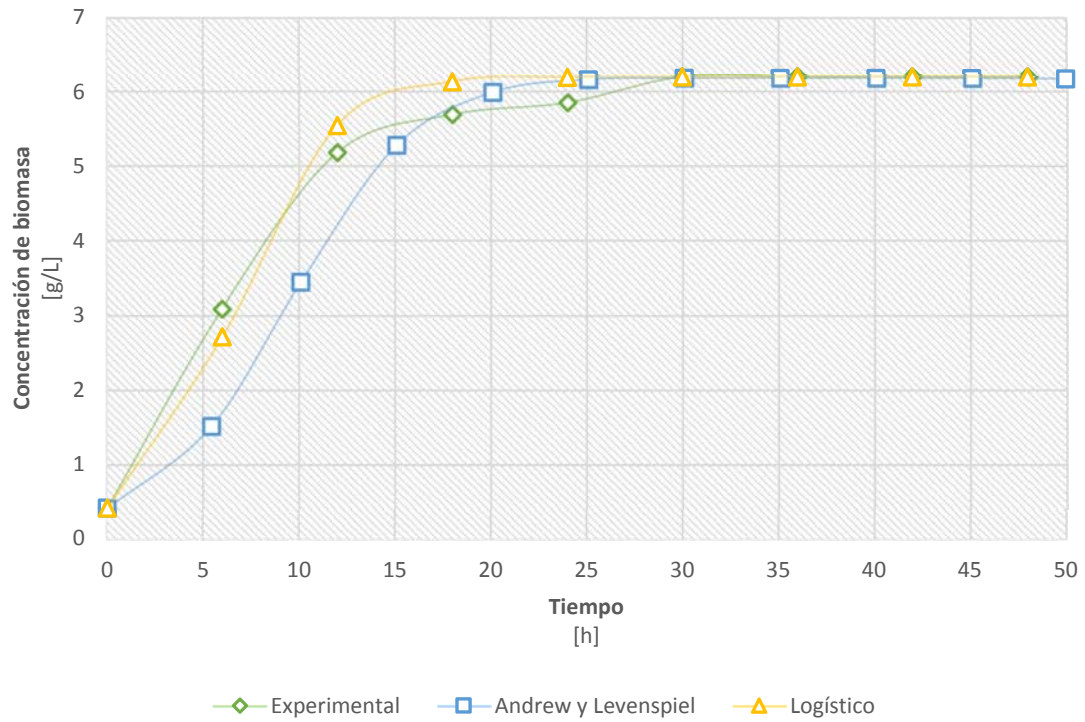


Figura 2.21. Comparación del crecimiento de biomasa predicho por el modelo de Andrews y Levenspiel, el modelo Logístico y los resultados experimentales.

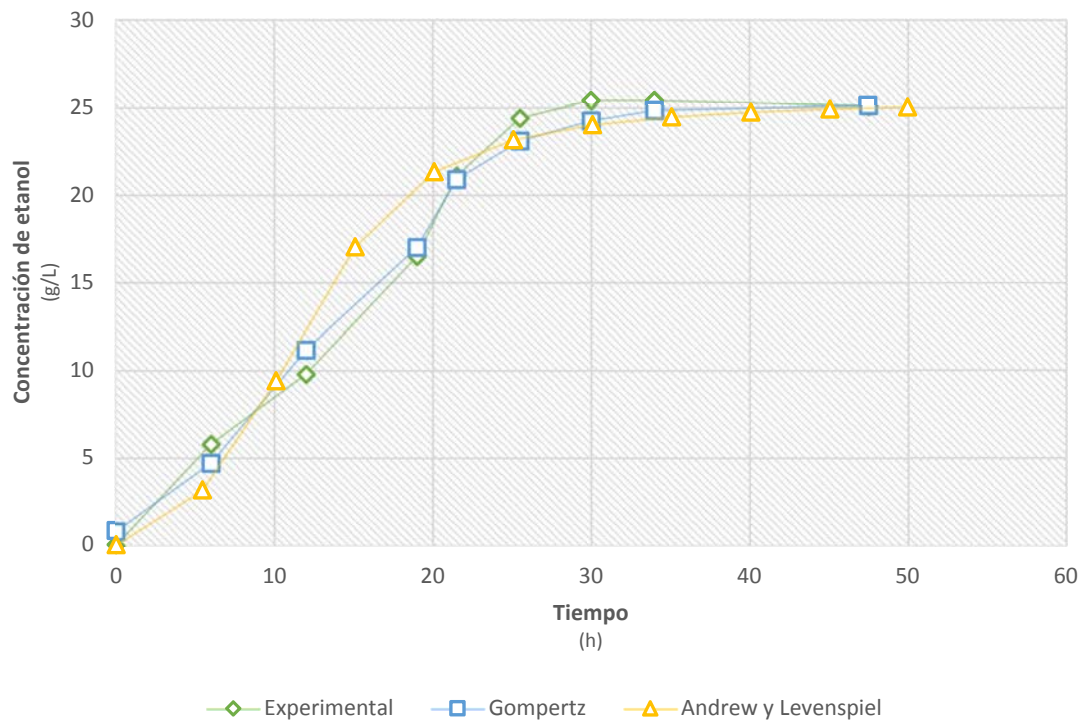


Figura 2.22. Comparación de la producción de etanol predicho por el modelo de Andrews y Levenspiel, el modelo de Gompertz modificado y los resultados experimentales.

2.5. Resumen de la sección

Para lograr una adecuada modelización de la fermentación, se establecieron tres etapas de trabajo: el muestreo, establecimiento de las condiciones óptimas y comparación de modelos aplicables.

Establecer un plan de muestreo adecuado demostró ser una tarea compleja, dada la naturaleza de la materia prima y el área geográfica dónde crece el cacao. En particular, la recolección y conservación del mucílago, requirió un esfuerzo considerable, dada su sensibilidad a la contaminación por microorganismos anaerobios, por lo cual requería de una cuidadosa pasteurización y almacenamiento a temperaturas de congelación.

Para obtener los valores óptimos de los parámetros de operación, se recurrió a la bibliografía disponible, comparándose entre las posibilidades que dada la naturaleza de la operación se encontraban entre rangos muy estrechos. En particular el pH y la temperatura.

Finalmente, se compararon los valores obtenidos mediante la modelización, siendo todos los modelos opciones adecuadas. Sin embargo, se seleccionó el modelo de *Andrews y Levenspiel*, ya que incluye en su cálculo los principales elementos inhibitorios durante la fermentación como: las concentraciones de azúcar y de etanol. Ambos agentes afectan al crecimiento de la levadura de una manera inhibitoria no competitiva, analizando de una manera más efectiva el comportamiento de la reacción.

Capítulo III

Purificación



3. Purificación del Etanol

Durante la etapa de fermentación se obtiene un producto compuesto de la mezcla de etanol, residuos metabólicos de las levaduras, azúcares no fermentados, agua, gases incondensables y sólidos suspendidos. Al requerirse etanol con un elevado grado de pureza, es necesario establecer diversas operaciones que aseguren una purificación adecuada y eficiente. Si bien, pueden plantearse distintas opciones tecnológicas para este fin (como la ultrafiltración, por ejemplo) se eligió la destilación como operación principal, ya que es una de las más utilizadas a nivel industrial y existe gran cantidad de información e investigaciones sobre ella.

La destilación es la etapa del proceso que mayor cantidad de energía requiere y más medidas de seguridad y automatización necesita para una implementación adecuada (Oyelami & Adeboye, 2019). En la industria, la purificación se realiza principalmente mediante destilación azeotrópica. Aunque es una técnica de separación eficiente, tiene varias desventajas, principalmente su capacidad de separación de compuestos volátiles y su costo (Mairhofer & Gross, 2017).

Dadas las características de la mezcla alcohol-agua, no es posible una purificación a través de una sola operación, requiriendo varias etapas para alcanzar la concentración y características requeridas. En el presente estudio se consideraron tres etapas: 1) destilación con reflujo (rectificación), 2) destilación extractiva con glicoles y 3) adsorción (tamiz molecular). A continuación, se analizarán estas etapas sin considerar especificaciones técnicas relacionadas con balances energéticos o corrientes de recuperación, así como los necesarios intercambiadores de calor que deben intervenir en diferentes etapas del proceso, por estar más allá de los objetivos de la presente investigación.

3.1. Destilación

La destilación es la técnica de purificación industrial más ampliamente utilizada para la obtención del etanol. Su principio básico consiste en que, al calentar una mezcla, los componentes de bajo punto de ebullición se concentran en la fase de vapor, los cuales pueden ser condensados en una fracción diferente, creando de esta forma dos mezclas con diferentes composiciones (Criscuoli, 2013; Onuki et al., 2008). En la producción de etanol, una torre de destilación está diseñada para separar el agua y el etanol de manera efectiva (Figura 3.1). El agua se obtiene en el fondo de la torre y el etanol en la parte superior. Es de esperar que las impurezas con puntos de ebullición, similares al etanol, sean arrastrados en el producto final.

Esta operación unitaria está fundamentada en las leyes de Raoult y de Dalton, que indican que en una mezcla líquido – vapor en equilibrio, la fracción molar de cada componente en el estado de vapor está relacionada de forma directa con las presiones de vapor de los componentes puros y con las fracciones molares de los mismos en estado líquido. Aunque, ciertos principios fundamentales son comunes a todos los sistemas de destilación, dado que son sistemas continuos de contacto de vapor – líquido, tiene una configuración a contracorriente y constan de múltiples etapas que operan dentro de las leyes físicas que establecen que diferentes materiales hierven a diferentes temperaturas (Heller & Einfalt, 2022).

El etanol a presión atmosférica posee un punto de ebullición de 78.3 °C, mientras que el del agua es 100 °C (a nivel del mar) por lo que la diferencia es 21 °C adecuada para aplicar una destilación simple. Sin embargo, con este método no es posible separar el etanol de otros alcoholes que pueden generarse durante la fermentación, como el metanol, propanol u otros, que necesariamente deberán ser eliminados mediante procesos más complejos de destilación como la destilación fraccionada o incluso procesos de extracción de alcoholes.

Para obtener productos prácticamente puros, tanto de la parte superior como la parte inferior de la columna de destilación, la alimentación se introduce en un plato de la parte central de la columna. Si la alimentación es líquida, desciende por la columna hacia el hervidor y se transfiere el componente A hacia la corriente de vapor que asciende desde el hervidor. Por este medio se obtiene un producto residual, donde el componente B es casi puro (en este caso el etanol) (McCabe et al., 2007).

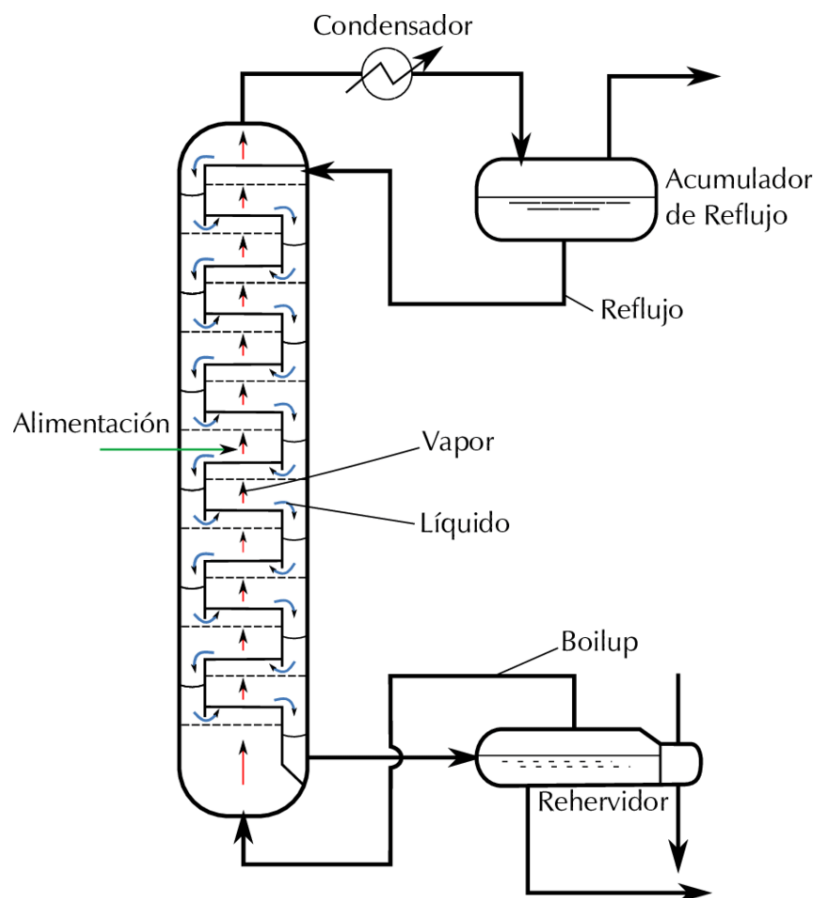


Figura 3.1. Columna de fraccionamiento continuo con secciones de rectificación y agotamiento. Adaptado de León (2018).

3.1.1. Destilación simple

En esta tesis doctoral, la destilación simple fue utilizada como primer medio de separación del alcohol, eliminación de volátiles y del mosto proveniente de la etapa de fermentación. Para llevar esto a cabo, se empleó un kit de destilación de vidrio estándar, con muestras de 500 mL (Figura 3.2).

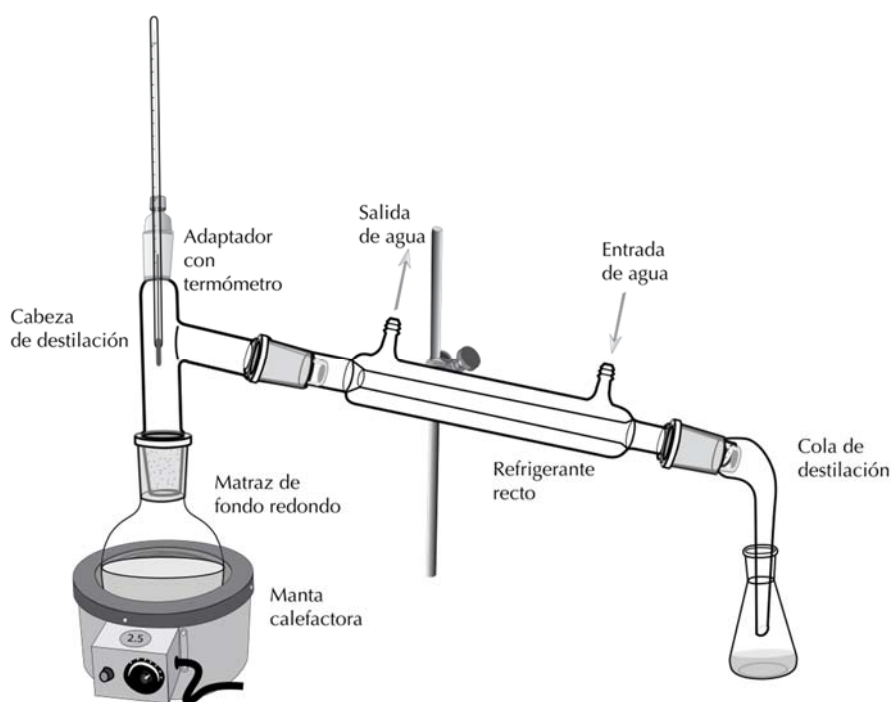


Figura 3.2. Esquema del kit de destilación. Adaptado de León (2018).

En las condiciones de presión atmosférica y la configuración del equipo, la concentración máxima alcanzable fue alrededor de 63 °GL. Una muestra de este destilado fue enviado a un laboratorio externo para su análisis. Para la caracterización del destilado se recurrió a la cromatografía de gases, ya que esta técnica es la más habitual para el análisis de etanol debido a su facilidad de automatización, sensibilidad, precisión y especificidad relativa (Tiscione et al., 2011), obteniéndose los resultados presentados en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Caracterización del alcohol mediante cromatografía de gases.

Compuesto	Concentración	Unidades
Etanol	62.48	°GL
Acetaldehído	6.47	mg/100 cm ³ etanol
Metanol	6.94	mg/100 cm ³ etanol
Alcoholes superiores*	995.57	mg/100 cm ³ etanol
Etilacetato	86.97	mg/100 cm ³ etanol
Furfural	7.20	mg/100 cm ³ etanol

**Alcoholes superiores: Iso-propanol, N-propanol, Iso-butanol, Iso-amílico, N-amílico*

Los alcoholes superiores son el producto del metabolismo secundario de las levaduras, se generan en altas concentraciones respecto de otros compuestos volátiles. Estos alcoholes poseen más de dos carbonos y su peso molecular y punto de ebullición son mayores que los del etanol. En fermentaciones se pueden encontrar hasta 40 alcoholes superiores, siendo los más relevantes el propanol, el isobutanol, el feniletanol, el alcohol amílico y el alcohol isoamílico (Loviso & Libkind, 2019). Dados el alto contenido de alcoholes superiores, este destilado no es apropiado para consumo humano. Sin embargo, esto no influye con la utilidad que se pretende dar al mismo, como aditivo para biocombustibles posterior a la rectificación, ya que estos serán eliminados en las etapas posteriores de purificación.

3.1.2. Destilación con reflujo

Para la segunda destilación se utilizó una columna de platos con reflujo en la cabeza, mediante un temporizador y una alimentación por lotes, construida enteramente de vidrio, sin aislamiento térmico o calderetas (Figura 3.3 y Tabla 3.2).

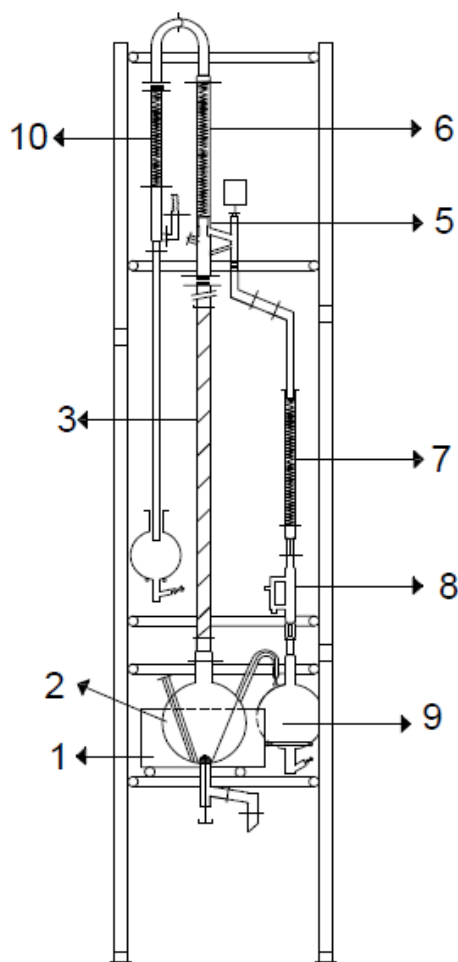


Figura 3.3. Unidad de rectificación. Adaptado de Corning (1976).

Tabla 3.2. Partes de la columna de rectificación mostrada en la Figura 3.3.

N°	Elemento	Medida	Material	Características
1	Calentador de balón			Calentamiento eléctrico 220-380 v. tri. 60 Hz
2	Hervidor	20 litros	Vidrio	Capacidad útil de 12 L, col DN80 Tubo de alimentación DN 40 con grifo de trasiego, tubo de válvula de vacío DN40
3	Columna de fraccionamiento con relleno rasching	DN 50	Vidrio	Empaques rasching de vidrio 7x7 mm con placas PTFE de retención.
4	De fraccionamiento con relleno de alta eficacia “multiknit”	DN 50	Vidrio/inox	Empaques multiknit de inox lg 150x10 mm
5	Cabeza de reflujo	DN 50	Vidrio	Comando eléctrico, magnético y timer.
6	Condensador superficie = 0.3 m ²	DN 50	Vidrio	Intercambiador con serpentinos. Caudal a 20 °C de 0.15 m ³ /h
7	Enfriador superficie = 0.2 m ²	DN 50	Vidrio	Intercambiador con serpentinos. Caudal a 20 °C de 0.3 m ³ /h
8	Separador graduado	DN 25	Vidrio	Capacidad 100 mL graduado
9	Recipiente	10 litros	Vidrio	Balón DN40 grifo de trasiego DN40
10	Circuito de vacío			Condensador trampa DN40 s=0.2 m ² Balón 5 L tipo
11	Columna de fraccionamiento con 10 platos de borboteo	Ø 50	PTFE	Cada plato equipado de una toma de muestra hipodérmica en fase líquido y vapor. Entre cada plato un tirante con boca para toma de temperatura.

La torre de destilación fue calentada mediante una resistencia eléctrica, que mantenía una temperatura de 95 °C. El reflujo se controlaba mediante una válvula temporizada que controlaba la salida del condensador, permitiendo este avanzara al enfriador o sea redirigido a la cabeza de la torre. Se alimentó con una carga inicial de 19 litros, proveniente de la etapa de destilación simple. Para medir el índice de refracción del etanol en cada plato, se obtuvieron las muestras directamente en cada plato, utilizando una jeringuilla a través de una boquilla de muestras, las medidas obtenidas se representan en la Figura 3.4. Mientras que, la temperatura era controlada a través de un termopar instalado en el balón de alimentación de la torre.

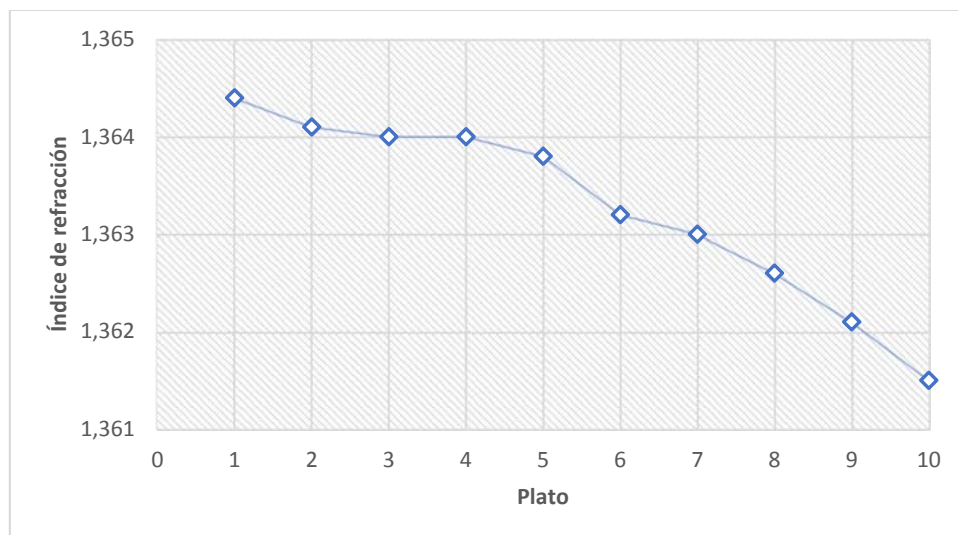


Figura 3.4. Índices de refracción de cada plato tras 40 minutos de operación.

Durante el proceso de destilación por lotes, la concentración de etanol en el destilado disminuye con el tiempo al consumirse el alcohol presente en la carga de alimentación, por lo que, es necesario detener el proceso cuando dicha concentración alcanza niveles muy bajos para el propósito requerido. En este caso, se decidió que dicha concentración no fuera menor al 92 % a fin de disminuir los requerimientos energéticos y de suministros de las etapas de purificación posteriores, lográndose así 3.4 litros de destilado de 92 °GL, con un rendimiento del 17.89 %.

3.1.3. Destilación extractiva con glicoles

La destilación con reflujo se ve limitada por la existencia del azeótropo etanol-agua, mismo que puede ser superado ya sea utilizando una destilación heterogénea azeotrópica con solventes no polares (benceno, pentano, isooctano o ciclohexano), requiriendo ser complementada mediante adsorción, para la eliminación del agua restante (Yamamoto et al., 2012). La destilación extractiva es una tecnología energéticamente eficiente que permite la separación de esta compleja mezcla azeotrópica. Implica la adición de un solvente de alto punto de ebullición como agente de separación en la parte superior de la columna de destilación extractiva. Este solvente tiene una gran afinidad (principalmente por puentes de hidrógeno) con el componente a “extraer” obtenido en el fondo de la columna junto con el solvente. El solvente tiene menos afinidad con el componente que se obtiene en la parte superior de la columna.

Se ha demostrado (Gil et al., 2014), que los glicoles son los disolventes más eficaces en la destilación extractiva, principalmente etilenglicol y glicerina, eliminando efectivamente el azeótropo etanol – agua, como puede apreciarse en la Figura 3.5. En dicha figura, es posible apreciar que no existe la formación de interfases o azeótropos, permitiendo de esta manera alcanzar valores cercanos al 100 % en una destilación. Los glicoles presentan algunas desventajas. Por ejemplo, aunque su punto de ebullición es alto, eventualmente contaminan el producto de cabeza y se necesitan grandes cantidades de solvente o altas proporciones de reflujo para obtener la pureza deseada del producto. Esta volatilidad los hace difíciles de contener en el proceso (Guella et al., 2018).

En términos generales, el disolvente se alimenta en la zona superior de la columna por encima de la corriente de alimentación, y retiene una concentración significativa en toda la fase líquida. Luego se retira como producto de fondo y se envía a una columna de regeneración operada por vacío (Gerbaud et al., 2019).

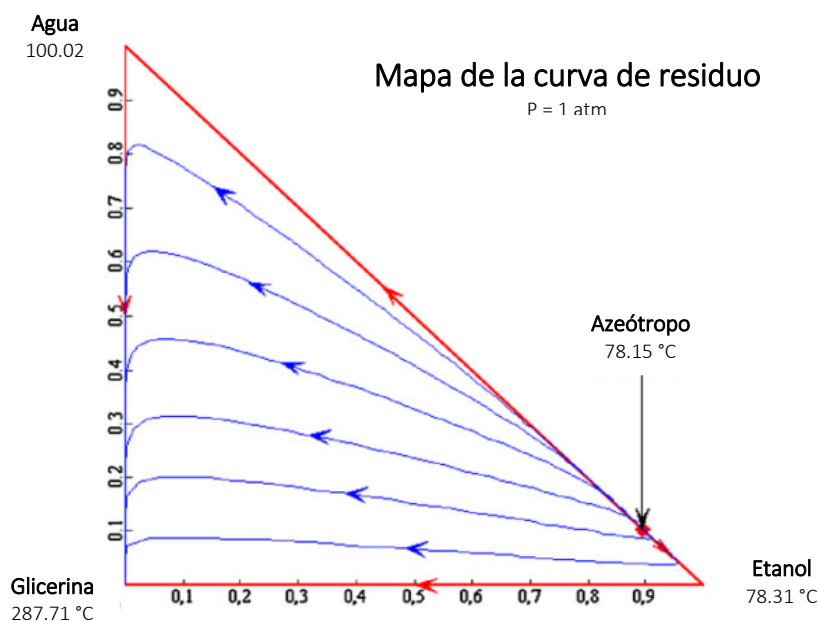


Figura 3.5. Mapa de la curva de residuos para la mezcla de etanol-agua etilenglicol-glicerol, $P = 1 \text{ atm}$, las líneas azules corresponden a las líneas de isovolatilidad.⁴ Adaptado de Lauzurique et al. (2016).

Debido a la elevada cantidad de materia prima requerida para su arranque, de no menos de 10 litros de alimentación, se decidió utilizar un kit de destilación simple (Figura 3.2), ya que, en la etapa anterior, no se logró obtener más de 4 litros de etanol con un 92 % de pureza. Con dicho etanol, se estableció una batería de experimentos usando 3 solventes para la destilación extractiva: etilenglicol, propilenglicol y glicerina; en relaciones volumétricas 1:1, 2:1 y 3:1, siguiendo el esquema propuesto por otro estudio similar (Lauzurique et al., 2016), obteniéndose los resultados detallados en la Figura 3.6. El tiempo total empleado para la destilación fue de tres horas.

⁴ **Líneas de isovolatilidad:** lugar geométrico de las mezclas para las cuales la volatilidad relativa de los componentes es igual a 1.

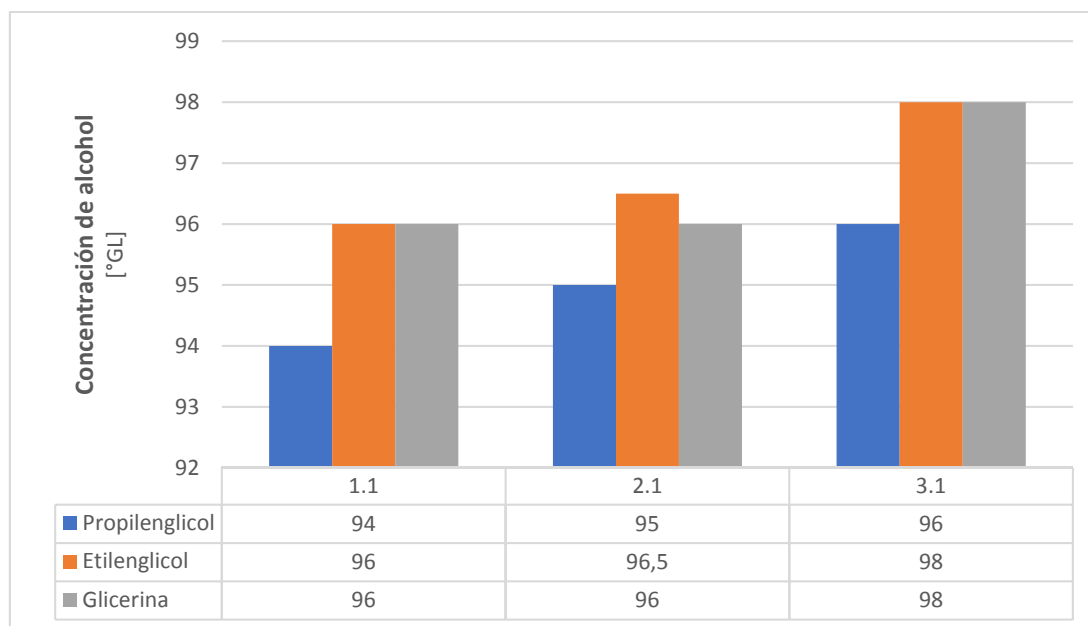


Figura 3.6. Comparación entre las relaciones solvente-alcohol y las concentraciones finales en la destilación extractiva.

La elección del agente deshidratante debe realizarse cumpliendo los siguientes parámetros: a) minimización de los costes de producción, b) baja presión de vapor, c) mayor afinidad por el agua para arrastrar la menor cantidad de alcohol y la mayor cantidad de agua posible y d) debe proporcionar la separación deseada utilizando la mínima cantidad de disolvente (Ferreira da Silva et al., 2017). El etilenglicol es el disolvente más empleado para la deshidratación de etanol por el método de destilación extractiva, sin embargo, es un compuesto ligeramente tóxico (Benyahia et al., 2014). Por ello, se consideró a la glicerina como el solvente apropiado por ser térmicamente más estable, así como por su bajo coste y fácil manipulación. El uso de glicerol como agente de arrastre para la deshidratación del etanol es un tema de interés porque tiene como objetivo reducir la demanda de energía para la producción de bioetanol mediante el uso de un coproducto de biodiésel (Zhang et al., 2015). Se ha propuesto usar este agente en combinación con alcohol isopropílico para aumentar su eficiencia (Hartanto et al., 2019).

3.2. Adsorción mediante tamices moleculares

Como se indicó en apartados anteriores, el etanol destinado al uso como combustible (etanol carburante), requiere una concentración menor al 1 % de agua (Tabla 1.2). Esta concentración no puede alcanzarse mediante métodos térmicos, sino que requiere métodos específicos destinados, no solo a romper el azeótropo como en el caso de la destilación extractiva, sino que deben eliminar las últimas trazas de humedad en el etanol resultante. Para este fin se eligió la adsorción como método de purificación final del etanol, por ser una de las técnicas más eficientes al momento de eliminar trazas (Aarden, 2001; Chen, 2015).

Esta es una técnica de separación que utiliza un material con gran superficie específica, conocido como *tamiz molecular*, el cual es identificado por su material y tamaño de poro. Debido a los avances en el desarrollo de los adsorbentes, la adsorción ya se ha convertido en una herramienta de separación clave que se usa de forma generalizada en la industria (Yang, 2004). Destacando la zeolita, cuando se trata de adsorción de la mezcla agua-etanol (Pahari et al., 2022). Se ha demostrado que la zeolita 3A es uno de los mejores materiales para aplicar en el proceso de adsorción de agua, porque el tamaño de su tamiz (3 nm) es solo un poco más grande que la molécula de agua promedio (0.28 nm) y más pequeño que el tamaño de la molécula de etanol (0.4 nm) (Laksmono et al., 2018; Yamamoto et al., 2012).

El relleno seleccionado en el presente estudio fue zeolita 3A de la casa comercial Merck, cuyas propiedades y las del lecho se detallan en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Propiedades del relleno utilizado en la adsorción.

<i>Propiedad</i>	<i>Medida</i>
Densidad aparente	750 kg/m ³
Superficie de contacto	800 m ² /g
Forma	Perlas de 2 mm
Volumen del espacio hueco	0.0003 m ³ /kg
Porosidad/volumen del lecho	0.23
Flujo de alimentación	2 mL/min
Altura del lecho [h]	0.65 m
Diámetro del lecho	0.01 m

Inicialmente, la parte inferior del adsorbente remueve el soluto, así que el producto está prácticamente libre de adsorbato, disminuyendo su capacidad de remoción con el paso del líquido, al saturarse los poros del relleno con adsorbato. Esto significa que la concentración de la corriente de salida varía con el tiempo, por lo que se requiere establecer una concentración máxima de adsorbato permitido en el proceso, a esta concentración se la conoce como punto de ruptura y al tiempo para alcanzarla, tiempo de ruptura (Figura 3.7) (Ortega, 2013).

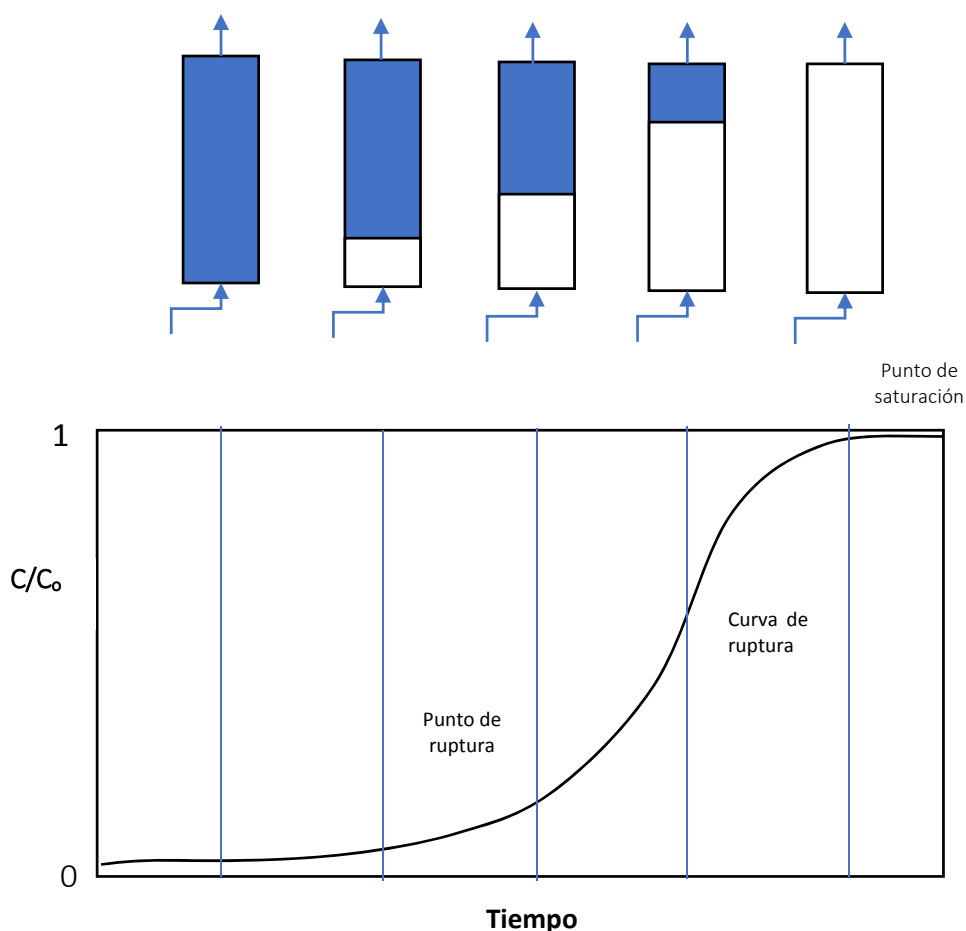


Figura 3.7. Ejemplo de curva de ruptura. Adaptado de (Ortega, 2013).

En el presente trabajo de investigación, se preparó una columna con un diámetro de 11.5 mm y 650 mm de altura de relleno, con un flujo volumétrico de 2 mL/min, configuración mostrada en la Figura 3.8. La alimentación provino del producto obtenido en la etapa de destilación extractiva con glicerina, que poseía una concentración inicial de aproximadamente 96 °GL, manteniendo una altura constante de líquido de 5 cm sobre el lecho. En esta etapa en particular, se requiere obtener un producto con una concentración mínima definida de 99.6 °GL, misma que está definida en los requerimientos descritos en la Tabla 1.2. Dicha concentración se alcanzó tras 50 minutos de operación (Figura 3.9).

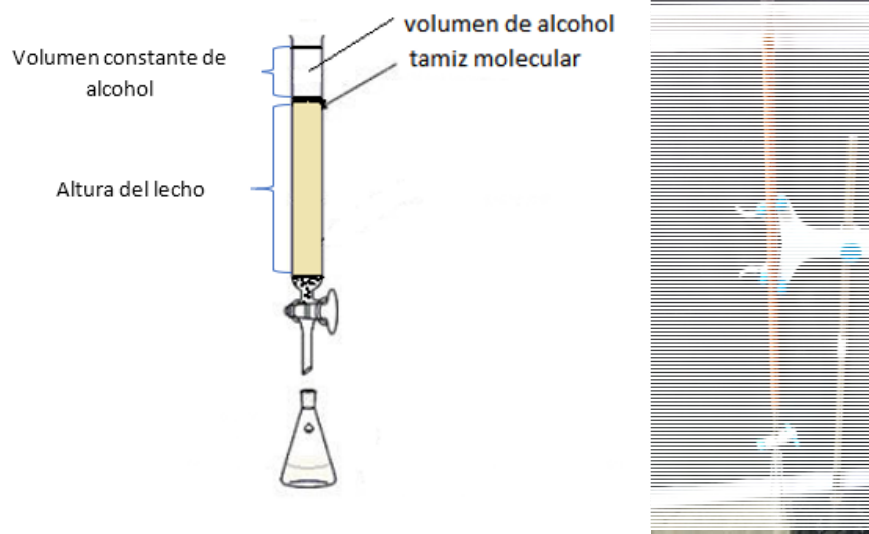


Figura 3.8. Esquema del equipo utilizado para la adsorción por tamiz molecular.

La concentración del etanol obtenido como producto de esta operación, fue evaluado mediante dos técnicas: a) refractometría *in situ* (el método se detalla en el Anexo Q) obteniéndose una concentración de 99.9 % en volumen y b) cromatografía de gases (laboratorio externo) obteniéndose una concentración de 99.66 °GL (Anexo S).

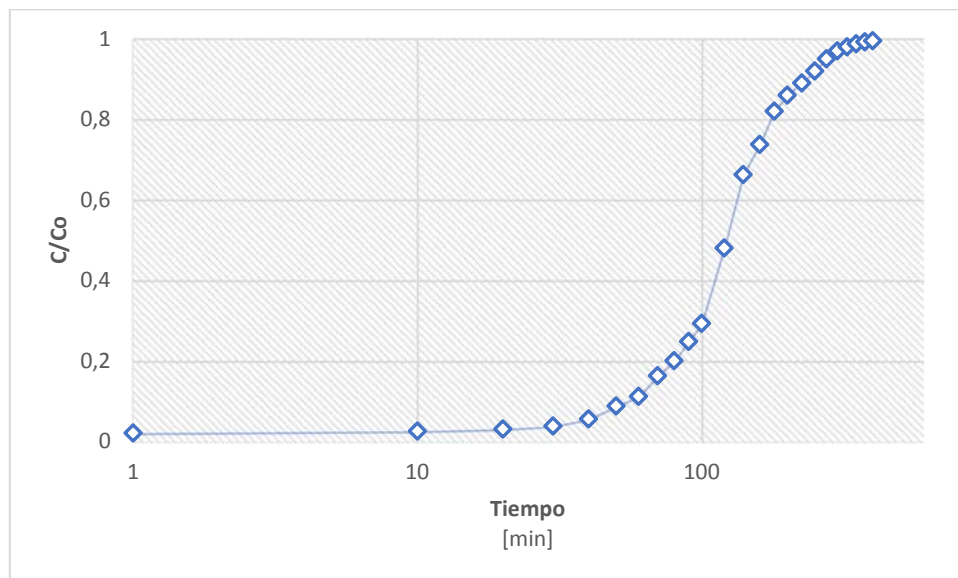


Figura 3.9. Segmento de la curva de ruptura aplicable.

3.2.1. Modelos matemáticos de la adsorción

La cantidad de material adsorbido por un sustrato a menudo se expresa como una función de la concentración de equilibrio después de la adsorción a temperatura constante (Ehiomogue et al., 2021). El proceso de representación de esta función se conoce como Isotermas de adsorción. Los modelos de isotermas de adsorción son curvas que describen la variación del material absorbido con la presión (Ehiomogue et al., 2021). Asimismo, estos modelos describen la relación entre las cantidades de soluto que se adsorben en el material y la concentración de adsorbato disuelto en el líquido en equilibrio (Obaid, 2020). Las isotermas de adsorción están determinadas por el adsorbente, las especies adsorbidas y las propiedades físicas como la fuerza iónica, la temperatura y el pH (Yan et al., 2017).

Para este estudio se consideraron los modelos propuestos por Lara et al. (2016):

- Modelo de Yoon-Nelson (ec. 3.1 y Tabla 3.5)
- Modelo BDST (ec. 3.2 y Tabla 3.6)
- Modelo de Thomas (ec. 3.3 y Tabla 3.7)
- Modelo de Dosis Respuesta (ec. 3.4 y Tabla 3.8)
- Modelo de Wolborska (ec. 3.5 y Tabla 3.9)
- Modelo de Adams-Bohart (ec. 3.6 y Tabla 3.10)

Tres aspectos se consideran en la etapa de diseño de la adsorción: la adsorción física, la adsorción química y el intercambio iónico (Wang et al., 2016). Siendo el presente caso de estudio, basado en la adsorción física de las moléculas de agua con la zeolita. En esta investigación se presentan dos limitaciones: a) que la concentración inicial está fijada por la destilación previa, cuya concentración se acerca a los 96 °GL, y b) que la corriente de producto final no puede disminuir de 99.6 °GL. Para el análisis y modelización se utilizaron los datos de concentración de etanol obtenidos mediante refractometría (Anexo R) frente al tiempo medido en minutos (Tabla 3.4), utilizando la herramienta Microsoft Excel 2019 como software para el cálculo y graficado.

Tabla 3.4. Concentraciones de agua y etanol promedio en el proceso de
adsorción.

<i>Tiempo</i> [min]	<i>Etanol</i> [% en volumen]	<i>Agua</i> [% en volumen]
1	99.92	0.08
10	99.90	0.10
20	99.88	0.12
30	99.85	0.15
40	99.78	0.22
50	99.65	0.35
60	99.55	0.44
70	99.35	0.65
80	99.20	0.80
90	99.01	0.99
100	98.83	1.17
120	98.08	1.92
140	97.35	2.65
160	97.05	2.95
180	96.72	3.28
200	96.56	3.44
225	96.44	3.56
250	96.32	3.68
275	96.20	3.80
300	96.12	3.88
325	96.08	3.92
350	96.05	3.95
375	96.03	3.97
400	96.02	3.98

3.2.1.1. Modelo de Yoon-Nelson

Este modelo está basado en la suposición de que la tasa de disminución en la probabilidad de adsorción para cada molécula de adsorbato, es proporcional a la probabilidad de adsorción del adsorbato. No requiere datos sobre la característica del adsorbato, el tipo de adsorbente y las propiedades físicas del lecho de adsorción. Este modelo considera que la tasa de disminución en la probabilidad de adsorción de la molécula de adsorbato es proporcional a la probabilidad de adsorción de adsorbato y de penetración en el adsorbente (Lara et al., 2016).

Para obtener los parámetros de operación se debe graficar la forma lineal del modelo de Yoon-Nelson, expresada en la ec. 3.1. Teniendo como base la gráfica de $\ln\left(\frac{C_o}{C} - 1\right)$ frente al tiempo (Figura 3.10). De la pendiente y la ordenada en el origen se puede obtener K_{YN} y τ (Tabla 3.5), mientras que el τ experimental, se determina a partir de extrapolación de los datos experimentales (Omitola et al., 2022).

$$\ln\left(\frac{C_o}{C} - 1\right) = -K_{YN}(t - \tau)$$

ec. 3.1. Expresión linealizada del modelo de Yoon-Nelson.

- **C:** concentración del agua a tiempo (t) [g/L]
- **C_o:** concentración inicial del agua [g/L]
- **t:** tiempo de toma de la muestra [min]
- **K_{YN}:** constante de proporcionalidad de Yoon-Nelson [min⁻¹]
- **τ:** tiempo requerido para retener el 50 % del adsorbato inicial [min]

Tabla 3.5. Parámetros del modelo de Yoon-Nelson.

C_o [g/L]	K_{YN} [min ⁻¹]	τ teórico [min]	τ experimental [min]	R²
4	0.23	62	68	0.9771

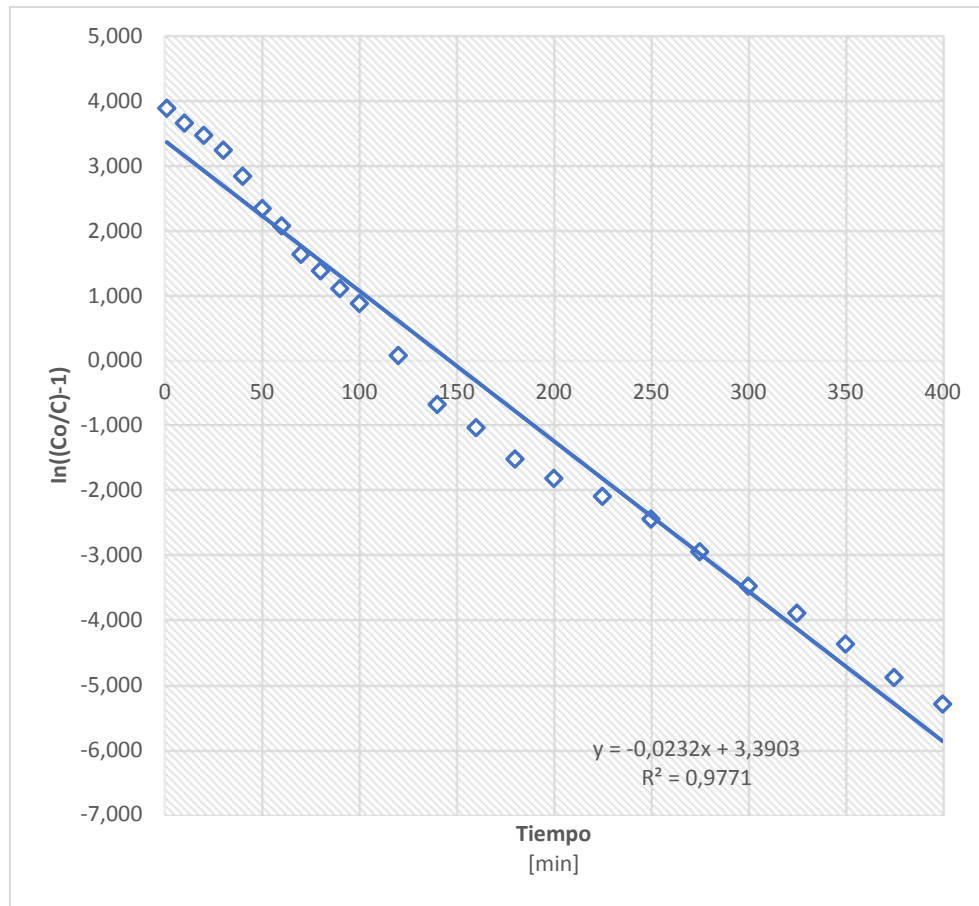


Figura 3.10. Linealización de los datos experimentales en forma logarítmica

$\ln\left(\frac{C_0}{C} - 1\right)$ representados en la Tabla 3.4 frente al tiempo.

Este modelo presenta varios aspectos positivos, ya que tiene un ajuste razonable a los resultados experimentales, con un índice de correlación de 0.9771. Además, es únicamente una función del tiempo, sin requerir datos adicionales respecto al relleno utilizado (Slavić et al., 2009).

3.2.1.2. Modelo del Tiempo de Servicio de la Altura de un Lecho (BDST)

BDST es un modelo sencillo para predecir la relación entre la profundidad del lecho [Z], y el tiempo de servicio [t], en términos de concentraciones de proceso y parámetros de adsorción. El modelo BDST se basa en la suposición de que la tasa de adsorción está controlada por la respuesta de la superficie entre el adsorbato y la capacidad no utilizada del adsorbente (Muslim Altufaily et al., 2019). Este modelo se basa en medir físicamente la capacidad del lecho a diferentes valores de avance, ignora la resistencia a la transferencia de masa intrapartícula y la resistencia externa de película, dado que el adsorbato se adsorbe directamente en la superficie del adsorbente (Lara et al., 2016). Teniendo como base la gráfica de $\ln \left(\frac{C_o}{C} - 1 \right)$ frente al tiempo (Figura 3.10), de la pendiente y la ordenada en el origen, se puede obtener N_o y K (Tabla 3.6).

$$\ln \left(\frac{C_o}{C} - 1 \right) = \ln \left(e^{(KN_o \frac{Z}{U})} - 1 \right) - KC_o t$$

ec. 3.2. Expresión linealizada del modelo de tiempo de servicio.

- **C:** concentración del agua a tiempo (t) [g/L]
- **C_o:** concentración inicial del agua [g/L]
- **t:** tiempo [min]
- **N_o:** capacidad dinámica del lecho, [mg dm⁻³]
- **U:** velocidad de flujo lineal [cm min⁻¹]
- **K:** constante de velocidad de adsorción [dm³ min⁻¹ mg⁻¹]
- **Z:** Altura del lecho [cm]

Tabla 3.6. Parámetros del modelo de BSDT.

C_o [g/L]	U [cm min ⁻¹]	K [dm ³ min ⁻¹ mg ⁻¹]	Z [cm]	N_o [mg dm ⁻³]	R^2
4	45.2	0.006	65	393	0.9771

Este modelo presenta una mayor complejidad de cara a las variables que intervienen, destacándose las propiedades específicas del lecho como su altura o la velocidad de adsorción. Permite entonces modelar el comportamiento del lecho si este varía en su altura, sin la necesidad de nuevas experiencias o mediciones.

3.2.1.3. Modelo de Thomas

La ecuación de Thomas es un modelo popular que se ha utilizado ampliamente para predecir las curvas de avance (BTC) al describir la adsorción dinámica de diferentes contaminantes en un sistema de columna de lecho fijo (Amiri et al., 2019). Este modelo es apropiado para predecir el proceso de adsorción cuando las resistencias de difusión interna y externa pueden ser ignorados (Chowdhury & Saha, 2013). El modelo de Thomas es de tipo dinámico y sigue la cinética de adsorción de Langmuir. Considera que la dispersión axial es despreciable en el lecho, ya que la fuerza impulsora obedece a una ecuación de segundo orden con reacción reversible dada por la ec. 3.3 (Lara et al., 2016).

Teniendo como base la gráfica de $\ln\left(\frac{C_o}{C} - 1\right)$ frente al volumen de efluente acumulado (Figura 3.11), de la pendiente y la ordenada en el origen, se puede obtener K_{Th} , y q_o , (Tabla 3.7).

$$\ln\left(\frac{C_o}{C} - 1\right) = -\frac{K_{Th}}{Q}(C_o V_{ef} - q_o m_b)$$

ec. 3.3. Expresión del modelo de Thomas.

- **C**: concentración del agua a tiempo (t) [g/L]
- **C_o**: concentración inicial del agua [g/L]
- **K_{Th}**: constante de velocidad del modelo de Thomas, [g min⁻¹ mg⁻¹]
- **q_o**: capacidad de adsorción en el modelo de Thomas, [g/g]
- **m_b**: masa del adsorbente [g]
- **V_{ef}**: volumen acumulado del efluente [mL]
- **Q**: caudal de alimentación [mL/min]

Tabla 3.7. Parámetros del modelo de Thomas.

Q [mL/min]	C_o [g/L]	m_b [g]	K_{Th} [g min ⁻¹ mg ⁻¹]	q_o [g/g]	R^2
2	4	30.9	5.8	0.038	0.9771

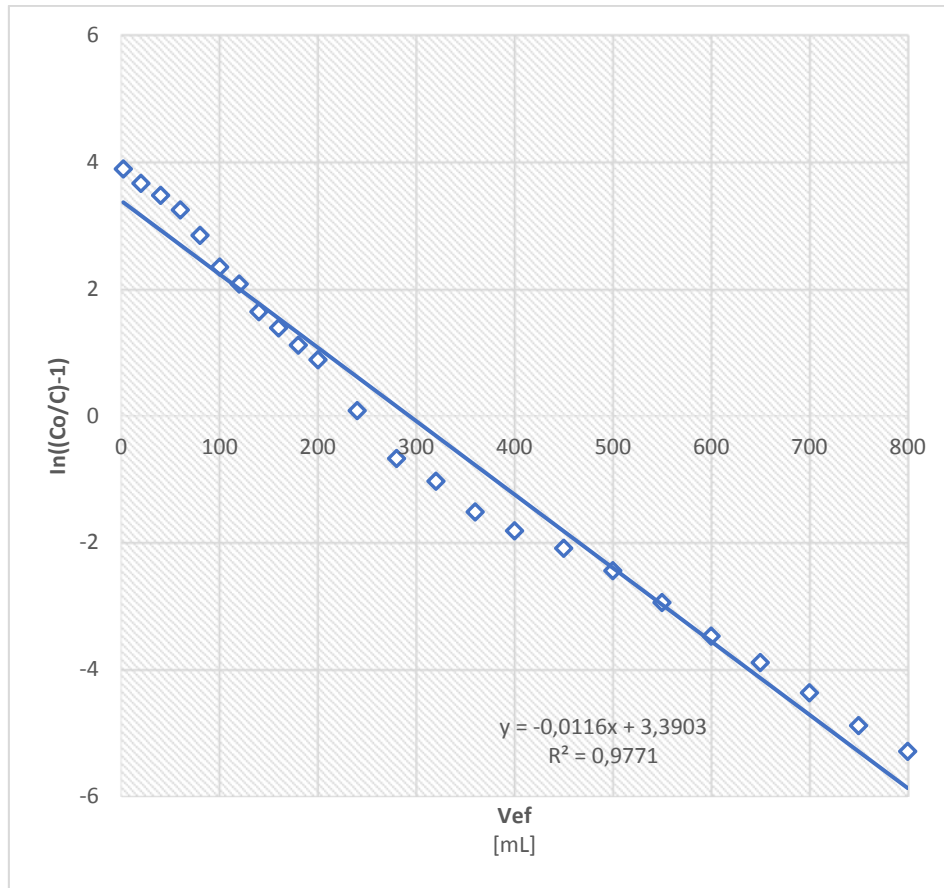


Figura 3.11. Linealización de los datos experimentales en forma logarítmica

$\ln\left(\frac{C_o}{C} - 1\right)$ representados en la Tabla 3.4 frente al volumen de efluente acumulado (V_{ef}).

Este modelo, al igual que en el anterior, presenta un ajuste razonable a los resultados experimentales, con un índice de correlación de 0.9771, pero este modelo no solo es función del volumen acumulado de efluente, sino de la masa de adsorbente, por lo que permite modificar el tamaño del lecho sin que sea necesario una nueva recolección de datos experimentales.

3.2.1.4. Modelo de Dosis Respuesta

Este modelo ha sido comúnmente usado en farmacología para describir diferentes tipos de procesos, en especial describir bioadsorción en columnas. Inicialmente, este modelo fue propuesto para determinar la absorción de los medicamentos en el interior del organismo. Con ligeras modificaciones, se ajustó el modelo para su aplicación en estudios de adsorción de metales (Lara et al., 2016).

De manera similar a otros modelos, α y q_o (Tabla 3.8) pueden ser determinados de la gráfica $\ln \ln \left(\frac{C}{C_o - C} \right)$ frente al volumen acumulado del efluente (Figura 3.12).

$$\ln \left(\frac{C}{C_o - C} \right) = \alpha \left(\ln V_{ef} - \ln \left(\frac{q_o * m_b}{C_o} \right) \right)$$

ec. 3.4. Expresión del modelo de Dosis Respuesta.

- **C**: concentración del agua a tiempo (t) [g/L]
- **C_o**: concentración inicial del agua [g/L]
- **q_o**: capacidad de adsorción [g/g]
- **m_b**: masa del adsorbente [g]
- **V_{ef}**: volumen acumulado del efluente [mL]
- **α**: constante del modelo de dosis-respuesta [mL/min]

Tabla 3.8. Parámetros del modelo de Dosis Respuesta.

C_o [g/L]	Q [mL/min]	m_b [g]	α [mL/min]	q_o [g/g]	R²
4	2	30.9	3.362	0.075	0.74

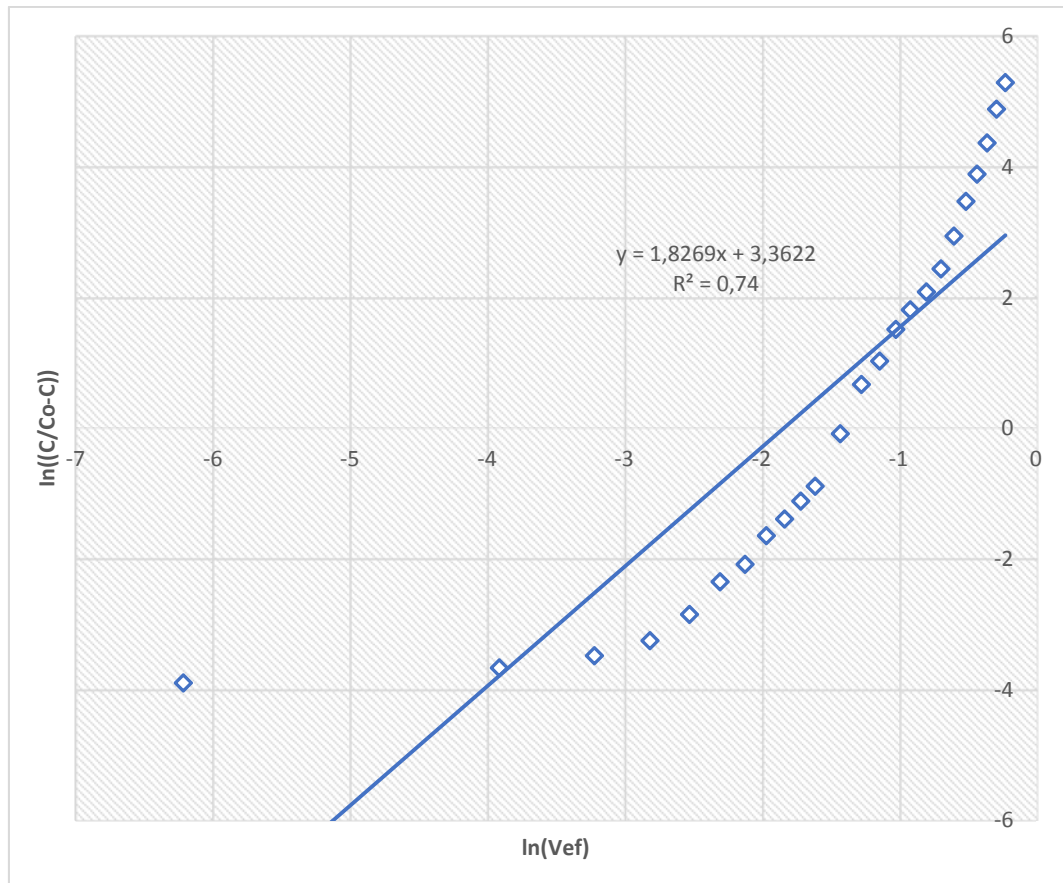


Figura 3.12. Linealización de los datos experimentales en forma logarítmica $\ln\left(\frac{C}{C_0-C}\right)$ representados en la Tabla 3.4 frente al volumen de efluente acumulado.

Este modelo presenta ciertas ventajas frente a otros, ya que describe la curva de ruptura completa con gran exactitud, la desventaja que presenta es que el parámetro a no se relaciona correctamente con las condiciones experimentales, lo que imposibilita un cambio de escala. Como puede observarse en su coeficiente correlación de 0.74.

3.2.1.5. Modelo de Wolborska

Este es un modelo matemático que especifica que la parte inicial de la curva de ruptura está dominada por la difusión de película externa con un coeficiente cinético constante, además establece que el perfil de concentración a lo largo de la columna se mueve a una velocidad constante (Lara et al., 2016). Por lo tanto, describe la distribución de la concentración del adsorbato en el lecho fijo en el rango de baja concentración (C. G. Lee et al., 2015).

Los valores de β_L y N_o (Tabla 3.9) se obtiene de la pendiente e intercepto de la gráfica $\ln \ln \left(\frac{C}{C_o} \right)$ frente al tiempo (Figura 3.13), establecidas en la experimentación.

$$\ln \frac{C}{C_o} = \frac{\beta_a C_o}{N_o} t - \frac{\beta_a Z}{U}$$

ec. 3.5. Modelo de Wolborska.

- **C:** concentración del agua a tiempo (t) [g/L]
- **C_o:** concentración inicial del agua [g/L]
- **t:** tiempo de toma de la muestra, [min]
- **U:** velocidad de flujo lineal [cm min⁻¹]
- **N_o:** capacidad dinámica del lecho [mg dm⁻³]
- **β_a:** coeficiente cinético de transferencia de masa externo [min⁻¹]
- **Z:** Altura del lecho [cm]

Tabla 3.9. Parámetros del modelo de Wolborska.

C_o [mg/L]	U [cm min ⁻¹]	β_a [min ⁻¹]	Z [cm]	N_o [mg dm ⁻³]	R²
4	1.924	0.082	65	34.9	0.74

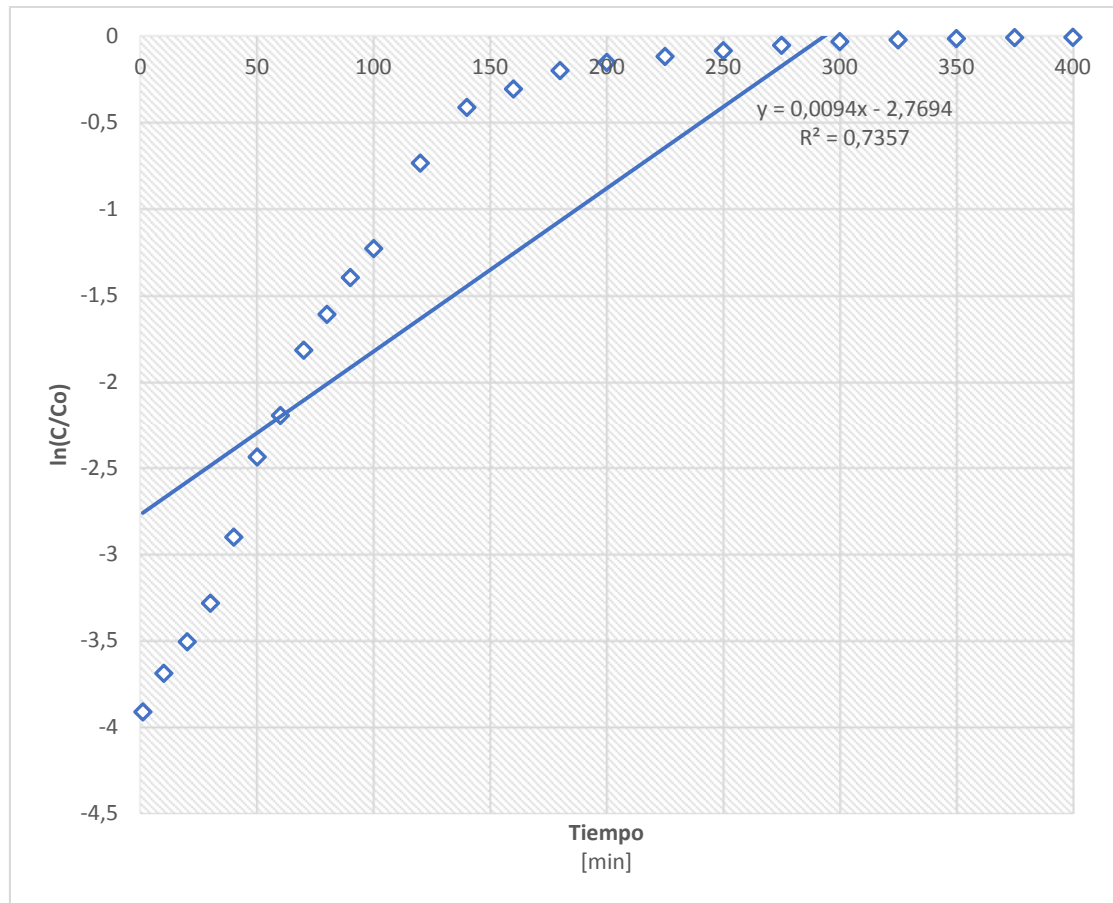


Figura 3.13. Linealización de los datos experimentales en forma logarítmica

$\ln \ln \left(\frac{C}{C_0} \right)$ representados en la Tabla 3.4 frente al tiempo.

Este modelo presentó un bajo índice de correlación, al ser este menor de 0.8 no se lo pudo considerar útil para este trabajo. Aunque el modelo permite conocer algunos parámetros interesantes del lecho como su capacidad de adsorción, los pobres resultados del ajuste lo invalidan completamente.

3.2.1.6. Modelo de Adams-Bohart

El modelo de Adams-Bohart es usado solo para la descripción inicial de la curva de ruptura por encima del punto de ruptura o de los puntos de saturación; solo describe entre 10-50 % del comportamiento. Asume que la velocidad de adsorción es proporcional a la capacidad de adsorción y a la concentración de la especie adsorbida (Lara et al., 2016). Este modelo es útil para describir la curva de ruptura inicial de datos experimentales. Su efectividad de ajuste se evalúa mediante la capacidad máxima de adsorción (N_o) y la constante cinética (K_{AB}) (Faizal & Kutty, 2014).

Los valores de K_{AB} y N_o (Tabla 3.10) se obtiene de la pendiente y la ordenada al origen de la gráfica $\ln \ln \left(\frac{C}{C_o} \right)$ frente al tiempo (Figura 3.13), establecidas en la experimentación.

$$\ln \left(\frac{C}{C_o} \right) = k_{AB} \left(C_o t - \frac{N_o Z}{U_o} \right)$$

ec. 3.6. Modelo de Adams-Bohart.

- **C:** concentración del agua a tiempo (t) [g/L]
- **C_o :** concentración inicial del agua [g/L]
- **t:** tiempo de toma de la muestra [min]
- **N_o :** capacidad dinámica del lecho [mg dm⁻³]
- **U_o :** velocidad de flujo lineal [cm min⁻¹]
- **K_{AB} :** constante cinética [mg⁻¹ min⁻¹]
- **Z:** Altura del lecho [cm]

Tabla 3.10. Parámetros del modelo de Adamas-Bohart.

C_o [g/L]	U_o [cm min ⁻¹]	K_{AB} [mg ⁻¹ min ⁻¹]	N_o [mg dm ⁻³]	Z [cm]	R^2
4	1.64	0.002	34.9	65	0.7357

Al igual que el modelo de Wolborska su índice de correlación fue menor de 0.8, siendo demasiado bajo para considerarse útil para este trabajo.

3.3. Resumen de la sección

El proceso de purificación de etanol demostró ser particularmente complejo, dada la existencia de un azeótropo con el agua, que impide una separación adecuada mediante el empleo exclusivo de métodos térmicos, siendo imprescindible el uso de un método físico, el cual fue modelizado satisfactoriamente.

Los procesos térmicos elegidos fueron: destilación simple, destilación con reflujo y destilación extractiva. La destilación simple separó incondensables, sólidos disueltos y una fracción de agua, llegando a una concentración de aproximadamente 60 % en volumen de etanol. El segundo método fue una destilación con reflujo que permitió concentrar la solución alcohólica a una concentración cercana al 92 % de etanol. Para el caso de la destilación extractiva, se determinó que la glicerina era el mejor agente extractivo, obteniendo así una concentración cercana al 96 % de etanol en volumen.

Finalmente, se utilizó adsorción para eliminar las últimas trazas de agua, llevando la solución alcohólica a una concentración de etanol superior al 99 % en volumen. Dicho proceso fue analizado mediante diversos modelos, siendo el modelo de Yoon-Nelson el más simple para ser empleado, además de presentar un índice de correlación mayor a 0.97.

Capítulo IV

Simulación del Proceso



4. Simulación del proceso

Hay varios temas importantes a considerar en el escalado de los procesos de laboratorio al nivel industrial. El escalado se logra a través de operaciones a escala de planta piloto y de laboratorio (Vogel & Todaro, 2014). Los pasos involucrados se pueden dividir en siete temas que requieren cierta elaboración:

- Optimización de la composición del medio y condiciones de cultivo como pH y temperatura.
- Suministro de oxígeno requerido para la fermentación.
- Selección de un modo operativo para el proceso de cultivo.
- Medición de las propiedades reológicas del fermento.
- Modelado y formulación de estrategias de control de procesos.
- Fabricación de sensores, biorreactores y otros equipos periféricos.

Para analizar estos elementos, un método eficaz es el uso de herramientas informáticas de simulación, como Aspen Plus®.

4.1. Simulación del modelo de fermentación

Entre los módulos disponibles en el mercado se encuentra el paquete *Aspen Custom Modeler* (ACM). Esta herramienta permite crear, editar y reutilizar modelos de unidades de proceso. Las aplicaciones de simulación se generan combinando estos modelos en un diagrama de flujo gráfico. Los modelos pueden usar herencia y jerarquía y pueden reutilizarse directamente o integrarse en bibliotecas. Las simulaciones dinámicas, de estado estacionario, de estimación de parámetros y de optimización se resuelven basándose en ecuaciones características de cada modelo. ACM utiliza un lenguaje de modelado orientado a objetos, editores para iconos y tareas y Microsoft Visual Basic para scripts (Aspentech, 2005). En este trabajo se realizó la simulación del proceso mediante *Aspen Custom Modeler* (ACM) v.8.4 del paquete de simulación *AspenONE*.

4.1.1. Modelado de sistemas mediante ecuaciones diferenciales parciales

ACM proporciona una forma sistemática de modelar y resolver sistemas de parámetros distribuidos en los que las variables del proceso varían con respecto a la posición espacial y el tiempo, que se describen matemáticamente mediante ecuaciones diferenciales parciales (PDEs). Las PDE son la base fundamental para describir fenómenos físicos complejos como el transporte de masa, calor y cantidad de movimiento acoplados a reacciones químicas (Aspentech, 2005). Entre los equipos de proceso que se pueden modelar en detalle mediante PDEs se incluyen reactores, como el requerido en esta investigación.

Para crear los modelos PDEs (Figura 4.1), se declararon los dominios, especificando, la derivada de mayor orden, el método de discretización⁵ (cuyo proceso de selección se describe en el Anexo T), longitud del dominio, número y ubicación de las secciones del dominio y preferencias de espaciado de elementos, y los nodos de integración.

⁵ **Discretización:** proceso de transferir funciones continuas, modelos, variables y ecuaciones a contrapartes discretas. Esta transformación es necesaria para la evaluación numérica y la implementación en software.

Tabla 4.1. Parámetros para la simulación del modelo de fermentación.

<i>Parámetro</i>	<i>Valor</i>	<i>Definición</i>
Orden de la derivada	1	
Método de discretización	BFD2	
Longitud de dominio	36	Horas de operación del reactor simulado
Número y ubicación de las secciones del dominio	1, 1	Este valor surge debido a que un es reactor tipo batch
Preferencias de espaciado de elementos	1	Representan una hora en la gráfica
Distribuciones del dominio		Concentraciones de levaduras, alcohol y sustrato durante la reacción
Condiciones iniciales	Levadura (0.41 g/L) Azúcar (241.38 g/L)	Concentraciones iniciales del alcohol, levadura y sustrato
Nodos de integración		Leyes de velocidad para células, etanol y sustrato
Balance del reactor		Ecuaciones diferenciales de reactantes y productos

Para establecer la simulación del modelo se utilizó la ecuación de Andrews y Levenspiel en su forma diferencial, cuyas constantes fueron determinadas previamente en este trabajo (ec. 2.6 y ec. 2.7), obteniendo la ecuación ec. 4.1:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{X/S}} \left(X \left(\frac{\mu_{max} S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_{IS}}} \right) \left(1 - \frac{P_E}{P_{X,max}} \right)^\alpha \right) + \frac{1}{Y_{P/S}} \left(X \left(\frac{q_{max} S}{K_{SP} + S + \frac{S^2}{K_{IP}}} \right) \left(1 - \frac{P_E}{P_{P,max}} \right)^\beta \right) + mX$$

ec. 4.1. Ecuación cinética para la simulación de la etapa de fermentación.

En esta ecuación diferencial las variables de operación son S (concentración del sustrato), P_E (concentración del etanol), X (concentración de las levaduras) y t (tiempo). Finalmente, se configuran los valores iniciales de la operación, a partir de los cuales se puede construir una gráfica, simulando variaciones de concentraciones frente al tiempo (Figura 4.2).

```

Model BIORREACTOR
ysc As RealVariable(Fixed,6.66);
ypc As RealVariable(Fixed,4.1);
ks As RealVariable(Fixed,1.32);
m As RealVariable(Fixed,0.00001);
umax As RealVariable(Fixed,0.34);
kis As RealVariable(Fixed,938.99);
ysp As RealVariable(Fixed,10);
qmax As RealVariable(Fixed,2.48);
ksp As RealVariable(Fixed,39.82);
kip As RealVariable(Fixed,99.72);

t As Domain (DiscretizationMethod:"BFD2",
              HighestOrderDerivative:1,
              Length:36,
              NumSections:1,
              SpacingPreference:1,
              Section(2).Location:1,
              Section(2).SpacingPreference:1);

FA As Distribution1D(XDomain Is t, HighestOrderXDerivative:1) Of RealVariable(0);
FB As Distribution1D(XDomain Is t, HighestOrderXDerivative:1) Of RealVariable(0);
FC As Distribution1D(XDomain Is t, HighestOrderXDerivative:1) Of RealVariable(0);

Nodes As IntegerSet([0 + t.Interior + t.EndNode]);
rg(Nodes) As RealVariable;
rp(Nodes) As RealVariable;
rd(Nodes) As RealVariable;
rsm(Nodes) As RealVariable;

// Concentraciones de partida
FA(0) = 0.41 ;
FB(0) = 231.4849 ;
FC(0) = 0 ;

// Balance del reactor para células, sustrato y alcohol
For i In [t.Interior + t.EndNode] Do
  FA(i).ddx = rg(i)-rd(i);
  FB(i).ddx = ysc*-rg(i)-ysp*rp(i)-rsm(i);
  FC(i).ddx = rg(i)*ypc;
EndFor

// Leyes de velocidades para el biorreactor
rd = FA*0.00005;
rsm = m*FA;
rp = (((qmax*(1-(FC/25.4179))^1.3505)* FA * FB)/(ksp + FB + ((FB^2)/kip)));
rg = (((umax*(1-FC/24)^1.4937) * FA * FB)/(ks + FB + ((FB^2)/kis)));

End

```

Figura 4.1. Código utilizado en la construcción del modelo en *Aspen Custom Modeler*.

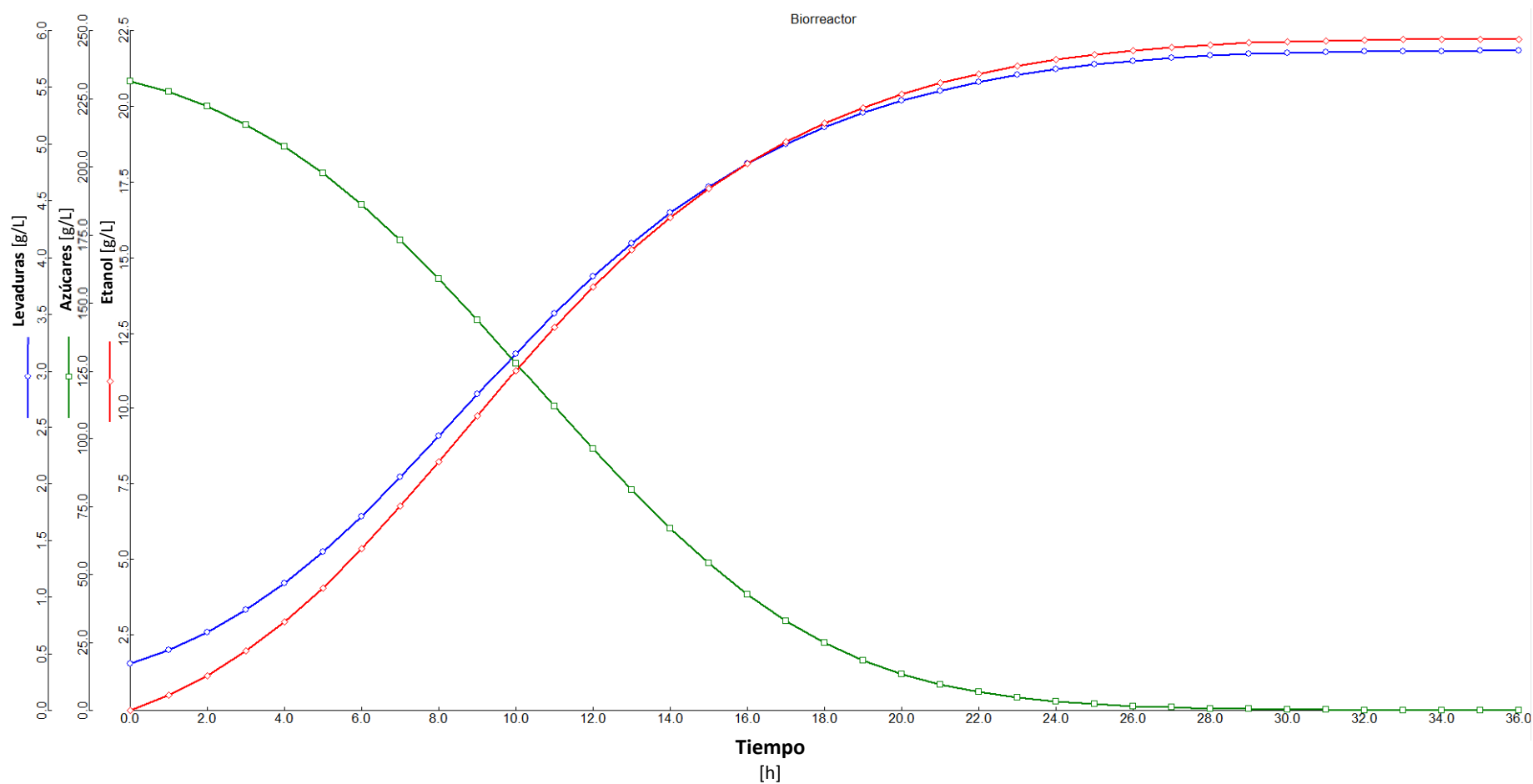


Figura 4.2. Parámetros obtenidos mediante el Método BFD2.

4.2. Simulación del proceso en Aspen Plus

Aspen Plus simula y predice el comportamiento de los procesos químicos haciendo uso del balance de materia, balance de energía, cinética de reacción y datos de equilibrio, bajo condiciones de operación especificadas (Acorsi et al., 2022; Mihul & Ashish, 2019). Para trabajar en Aspen Plus se debe generar un caso. El modelo termodinámico adecuado para el sistema se selecciona como método base del proceso. Posteriormente, se diseña un diagrama de flujo de proceso utilizando la biblioteca de módulos de operación de la unidad. Las corrientes se conectan y etiquetan en el diagrama de flujo del proceso. Posteriormente, se especifican las condiciones operativas de las corrientes y las especificaciones de cada unidad de proceso (Mihul & Ashish, 2019).

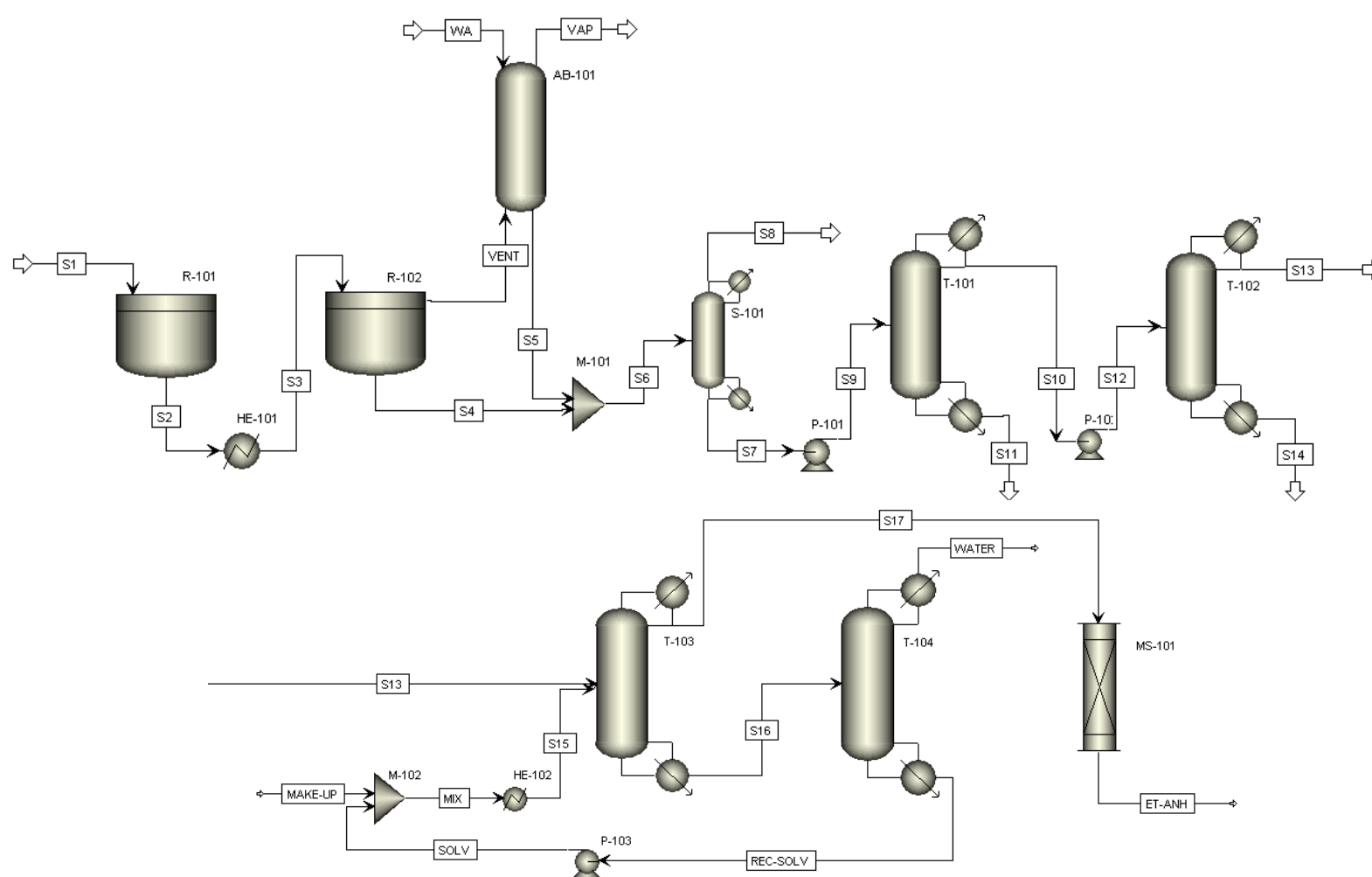
En este trabajo se realizó la simulación del proceso mediante *Aspen Plus v 8.1*. Para construir el modelo se establecieron las siguientes consideraciones:

- El proceso operaría en modo continuo, empleando alrededor de 1 000 kg diarios de materia prima, estableciéndose, por tanto, una corriente de alimentación de 43.4 kg/h de alimentación al proceso.
- No se considerarían tiempos muertos, dado que el principal objetivo de la simulación es la representación de concentraciones y el comportamiento de concentraciones en las corrientes.
- No se considerarían características geométricas o de diseño de los distintos equipos, usando las características preestablecidas de funcionamiento y operación del propio software.
- Para describir el funcionamiento de los reactores se utilizó el modelo cinético de Arrhenius a fin de describir la etapa de fermentación y la inversión de la sacarosa. Esto debido a ser el modelo estándar planteado por el software y a la imposibilidad de anexar otros modelos.
- La alimentación es una solución acuosa de tres azúcares: sacarosa (8.56 %), glucosa (8.13 %) y glucosa (7.91 %).

- No se considera el desgaste del lecho en la adsorción producto de la saturación del relleno.
- No se determinarán corrientes auxiliares como refrigerantes, calefacción o consideraciones de la levadura.

El modelo que describe el proceso se ha separado en dos etapas, mismas que fueron separadas en rutinas interconectadas (Figura 4.3):

- Fermentación:** se la subdividió en una etapa de pretratamiento, acondicionamiento térmico, la fermentación propiamente dicha y el control de efluentes del proceso.
- Deshidratación:** se la subdividió siguiendo la configuración planteada en la sección experimental descrita en el Capítulo 2 de esta memoria, constando de tres subetapas: destilación con reflujo, destilación extractiva y filtrado con tamices moleculares.



4.2.1. Fermentación

La etapa de fermentación se diseñó en dos reactores conectados en serie (Figura 4.4). En el primer reactor (R-101) se lleva a cabo la inversión térmica de la sacarosa, mientras que en el segundo (R-102) la fermentación propiamente dicha, previo acondicionamiento térmico en el intercambiador de calor HE-101.

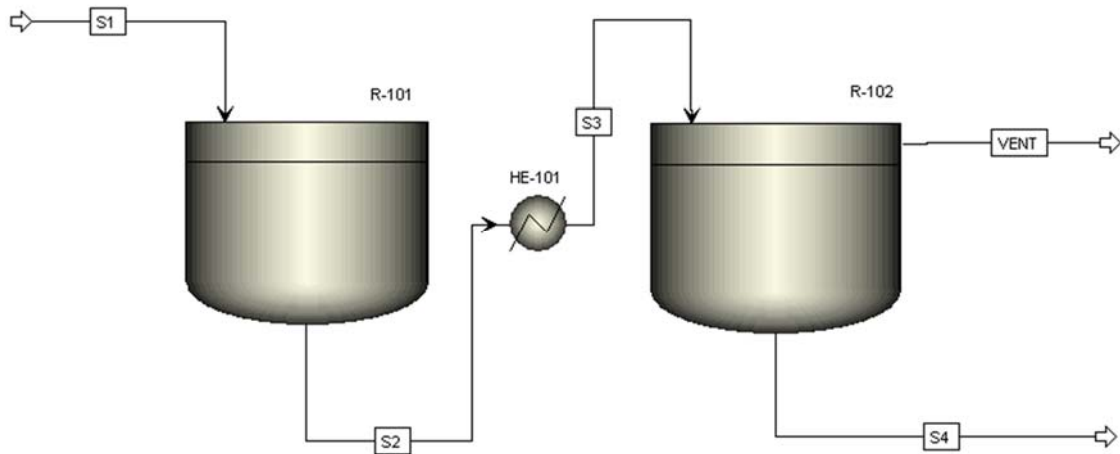


Figura 4.4. Configuración de reactores R-101 y R-102.

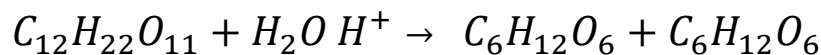
Como se detalló en el Capítulo 2, la fermentación es una reacción exotérmica donde la glucosa se convierte en etanol mediante la acción microbiana, produciendo CO_2 como subproducto (Figura 2.8). Producto de ello se requerirá una alimentación continua de refrigerante para mantener una temperatura constante (Ribas et al., 2010).

Tabla 4.2. Parámetros de las corrientes simuladas para la fermentación.

Corriente	S1	S2	S3	S4	VENT
Etanol [kg/h]	0	0	0	5.24	0.08
Glucosa [kg/h]	3.53	5.29	5.29	0.05	0
Agua [kg/h]	32.71	32.53	32.53	32.42	0.11
CO ₂ [kg/h]	0	0	0	0.42	4.67
Sacarosa [kg/h]	3.72	0.37	0.37	0.37	0
Fructosa [kg/h]	3.43	5.20	5.20	0.03	0
Total [kg/h]	43.39	43.39	43.39	38.53	4.86
Flujo volumétrico [L/h]	38.67	42.56	38.18	40.20	2883
Fracción volumétrica	0	0	0	0.17	0.02
Temperatura [°C]	20	127	30	35	35
Presión [atm]	1	1	1	1	1

4.2.1.1. Pasteurización e inversión de azúcares

La corriente de alimentación de mucílago (S1) ingresa al primer reactor a temperatura ambiente. La alimentación es tratada a 127 °C durante 12 min a 20 rpm para lograr la conversión de la sacarosa del 90 % (Torres et al., 1994), siguiendo la reacción descrita en la ec. 4.2. En esta etapa se garantiza tanto una esterilización como una ruptura de la sacarosa en glucosa y fructosa, producto de la temperatura y su pH ligeramente ácido (cercano a 4), esta reacción se conoce como inversión ácida de la sacarosa. Cuando la sacarosa se hidroliza a una mezcla de glucosa y fructosa, la rotación de la solución cambia de un valor positivo a un valor negativo, al ser observada en un polarímetro.

*Sacarosa**Agua**Glucosa**Fructosa*

ec. 4.2. Inversión de la sacarosa en medio ácido.

La inversión de la sacarosa es una reacción de primer orden con una energía de activación de 109.2 kJ/mol de sacarosa, con una entalpía de reacción de -14.4 kJ/mol de sacarosa a 310 K (Tombari et al., 2007). Al ser una reacción endotérmica requerirá un control del calentamiento del reactor.

4.2.1.2. Acondicionamiento

Para acondicionar la corriente de alimentación del reactor R-102 (S3), se consideró acoplar la corriente de salida del reactor R-101 (S2) un intercambiador de calor (HE-101) (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Parámetros del intercambiador de calor

Parámetro	HE-101
Temperatura de salida	30 °C
Presión de salida	1 atm

4.2.1.3. Reactor de fermentación

La corriente de salida (S2) se envía al intercambiador de calor HE-101 para reducir su temperatura hasta los 30 °C, previo al ingreso al reactor R-102 (S3) donde se mezclará con levadura *Saccharomyces cerevisiae* ya presente en el reactor. El proceso se mantuvo a 35 °C y a presión atmosférica durante 48 horas (tiempo óptimo obtenido durante el estudio experimental).

El reactor R-102 tiene una corriente de ventilación para eliminar los gases de fermentación, que son enviados a una columna de absorción (AB-101) para recuperar el etanol arrastrado. La corriente con el etanol recuperado (S5) se mezcla con la corriente de salida (S4) en el mezclador M-101 para dirigirse a la primera torre de destilación.

Tabla 4.4. Condiciones de operación propuestas para los reactores R-101 y R-102

Parámetro	R-101	R-102
Temperatura	127 °C	35 °C
Presión	1 atm	1 atm
Fases de reacción	Líquido	Vapor-Líquido
Fracción de conversión	$X_{\text{Sacarosa}} = 0.90$	$X_{\text{Glucosa}} = 0.99$
Tiempo de reacción	30 min	48 h

4.2.1.4. Recuperación de etanol

Para recuperar el etanol arrastrado con los gases incondensables durante los diferentes procesos, se optó por el uso de una columna de absorción tipo RadFrac⁶ (AB-101), para el lavado de los gases mediante una corriente de agua a condiciones ambientales, buscando una recuperación del 98 % del etanol en la corriente gaseosa (Figura 4.5).

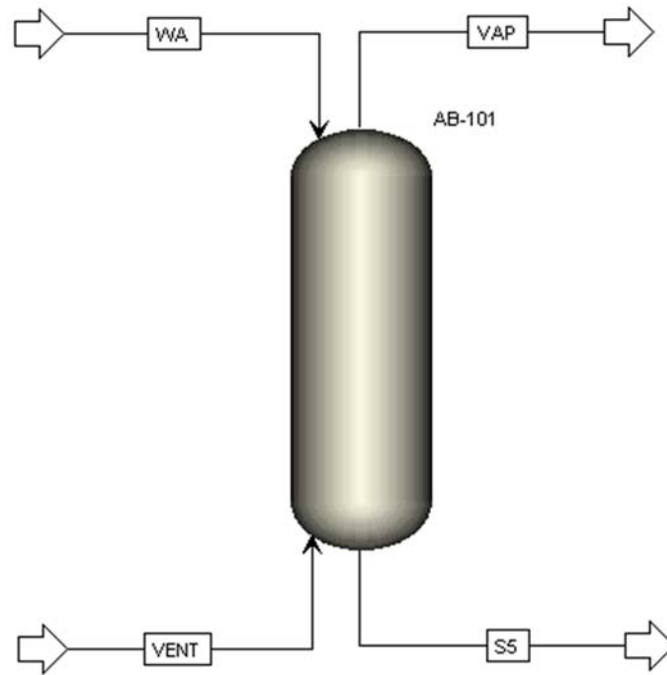


Figura 4.5. Configuración de columna de absorción AB-101.

⁶ Es un modelo de columna de destilación más riguroso que los basados en Underwood-Fenske o similares, y más sencillo que los usados para destilaciones de crudo; pero tiene el suficiente rigor para destilaciones convencionales. Además de la destilación ordinaria, puede simular la destilación extractiva y azeotrópica (Aspen Technology, 2018).

Tabla 4.5. Parámetros de las corrientes simuladas para la absorción.

Corriente	VENT	S5	VAP	WA
Etanol [kg/h]	0.08	0.08	0.001	0
Agua [kg/h]	0.11	2.41	0.008	2.38
CO₂ [kg/h]	4.67	0.02	4.65	0
Total [kg/h]	4.86	2.51	4.73	2.38
Flujo volumétrico [L/h]	2 883	2.57	2 740	2.38
Fracción volumétrica	0.02	0.04	0	0
Temperatura [°C]	35	37	30	20
Presión [atm]	1	1	1	1

Para el cálculo de la corriente másica del agua de lavado se realizó un balance de materia utilizando la ec. 4.3, considerando los valores del equilibrio a 20 °C y 1 atm ($y=0.0157$, $x=0.2023$), determinándose que para una alimentación de gas de 0.114 kmol/h (G), se requería una corriente 2.38 kg/h de agua (L).

$$G_{n+1}y_{n+1} + L_0x_0 = G_1y_1 + L_Nx_N$$

ec. 4.3. Balance de materia en una columna de absorción.

4.2.2. Deshidratación

En esta sección es necesario emplear 5 etapas (procesos) para alcanzar los requisitos de pureza del etanol (Tabla 1.2), y a su vez establecer un esquema similar a los propuestos en el apartado experimental que se describió previamente en el capítulo 3 de esta memoria. A este fin se establecieron las siguientes etapas:

- Columna de eliminación de incondensables, en la cual se eliminaría el CO_2 remanente, en la corriente proveniente de la fermentación.
- Torre de destilación que simule las condiciones de una destilación simple (sin reflujo).
- Torre de destilación con reflujo.
- Una torre de destilación extractiva con glicerina anexa a una columna de recuperación del solvente.
- Columna de adsorción.

El primer paso para establecer la simulación de una destilación es seleccionar el paquete de propiedades termodinámicas (Acorsi et al., 2022). Estos paquetes son una colección de métodos y modelos usados para calcular las propiedades termodinámicas (coeficientes de fugacidad, entalpías, entropías, energía libre de Gibbs, volúmenes) y las propiedades de transporte (viscosidades, conductividades térmicas, coeficientes de difusión y tensión superficial) (Aspen Technology, 2018). Para la simulación se utilizó como referencia el esquema propuesto por Cardona et al. (2005), para la destilación de una mezcla etanol - agua y las recomendaciones propias de la distribuidora del software (Aspen Technology, 2018) para este tipo de destilaciones se empleó para el cálculo de los coeficientes de actividad el modelo termodinámico NRTL y para el comportamiento de la fase de vapor el modelo de Hayden-O'Connell.⁷

⁷ El modelo Hayden-O'Connell incorpora la teoría química de la dimerización. Este modelo explica los fuertes efectos de asociación y solvatación, incluidos los que se encuentran en sistemas que contienen ácidos orgánicos, como el ácido acético.

Para la modelización de los procesos se aplicó el método corto DSTWU,⁸ para la estimación inicial del número de etapas teóricas, la relación de reflujo, la localización de la etapa de alimentación y la distribución de los componentes. Un cálculo de las etapas más riguroso de las condiciones de operación en las columnas de destilación se requiere utilizar el módulo RadFrac, a partir de los datos obtenidos inicialmente con el método DSTWU (Sarath Yadav et al., 2019). Los valores heurísticos requeridos como puntos de partida para la determinación de los parámetros operativos para esta simulación, fueron: 1.35 para la relación molar, 15 psia para la presión interna de las torres, y pérdidas por etapa de 0.1 psi, siguiendo los valores recomendados por Seader et al. (2006).

4.2.2.1. Eliminación de incondensables

Antes de pasar a la primera torre de destilación se estableció una etapa para separar el CO₂ disuelto en la corriente proveniente de la fermentación, donde este gas se produce como subproducto. Para ello se consideró el agregar un separador (S-101) (Figura 4.6) para purificar así la corriente S6, eliminándose el CO₂ a través de la corriente de purga S8. Posteriormente, la corriente S7 ingresa a la bomba P-101 para incrementar su presión a 15 psia, valor recomendado para una torre de destilación (Seader et al., 2006).

⁸ El método Winn-Underwood-Gilliland considera flujos molares de líquido y vapor, así como vaporización y volatilidades relativas constantes y etapas de equilibrio adiabáticas. Está formado por tres ecuaciones, la ecuación Winn estima el número mínimo de etapas, la ecuación de Underwood, estima el reflujo mínimo y la ecuación de Gilliland el número real de etapas (Gonzalez et al., 2015).

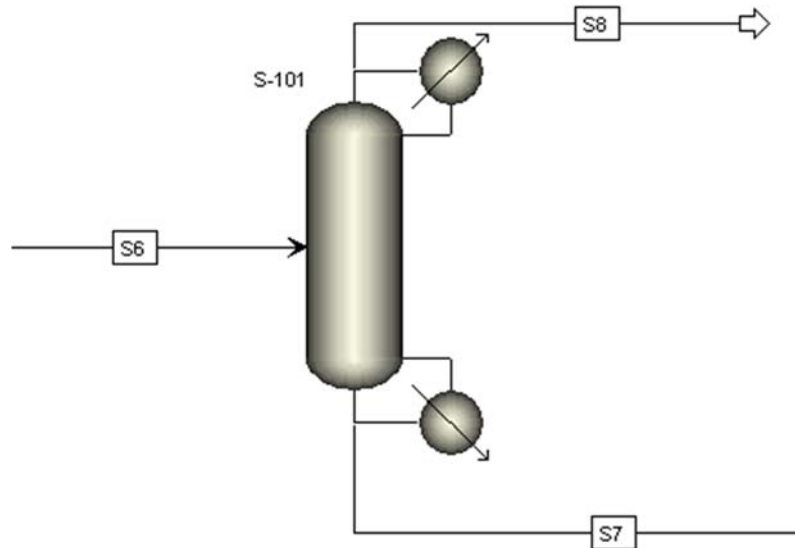


Figura 4.6. Esquema del separador (S-101).

Los parámetros de las corrientes involucradas se describen en la Tabla 4.6.

Tabla 4.6. Parámetros de las corrientes simuladas para la separación de CO₂.

Corriente	S6	S7	S8
Etanol [kg/h]	5.32	5.32	0
Agua [kg/h]	34.83	34.83	0
CO ₂ [kg/h]	0.43	0	0.43
Total [kg/h]	41.04	40.71	0.43
Flujo volumétrico [L/h]	42.76	42.40	246.78
Fracción volumétrica	0.16	0.16	0
Temperatura [°C]	35	35	35
Presión [atm]	1	1	1

4.2.2.2. Destilación primera etapa

Como se describió en el capítulo 3 de esta memoria, el objetivo de la destilación consiste en separar dos o más líquidos, aprovechando una diferencia entre sus puntos de ebullición, logrando así un vapor rico en el compuesto más volátil, junto con un líquido de fondos rico en el menos volátil. Siendo en este caso la corriente de alimentación aquella proveniente del separador (S7) aumenta su concentración a una cercana a los 50 °GL, simulando la destilación simple propuesta en la etapa experimental. Los parámetros considerados para la simulación se presentan en la Tabla 4.7, siguiendo el esquema propuesto en la Figura 4.7.

Tabla 4.7. Parámetros de las corrientes simuladas para la destilación simple.

Corriente	S7	S9	S10	S11
Etanol [kg/h]	5.32	5.32	5.05	0.27
Agua [kg/h]	34.83	34.83	2.71	32.13
Total [kg/h]	40.71	40.61	15.53	32.85
Flujo volumétrico [L/h]	42.40	42.40	9.76	35.76
Fracción volumétrica	0.16	0.16	0.70	0.01
Temperatura [°C]	35	35	80	101.42
Presión [atm]	1	2	1.02	1.09

Para determinar el número mínimo de etapas teóricas, el reflujo, la etapa de alimentación y la distribución de los componentes, en las torres de destilación se operó mediante el método corto *DSTWU*, obteniéndose valores tentativos para los reflujo (real y mínimo) como para los platos teóricos (Tabla 4.8). Como se indicó anteriormente, la simulación buscaba recrear las condiciones propuestas en la etapa experimental. Los valores de los platos teóricos y el reflujo real, en la simulación anterior, se ingresaron en una nueva aproximación con el método *RadFrac*, esta vez modificando manualmente el valor de reflujo, al más cercano a cero, para obtener de esta manera una simulación semejante a la destilación simple. Los resultados son presentados en la Tabla 4.9.

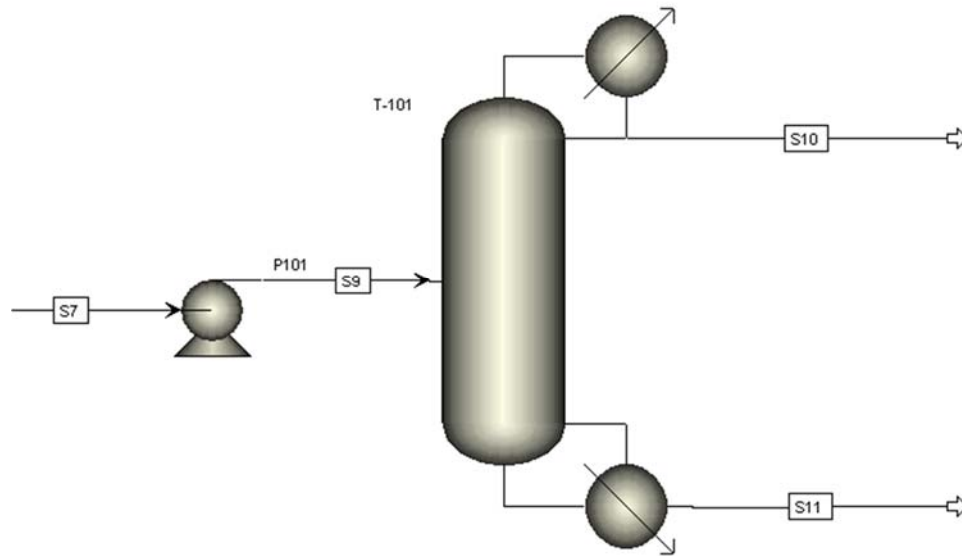


Figura 4.7. Esquema para el diseño de la columna T-101.

Tabla 4.8. Comparativa entre los parámetros para la columna de destilación T-101 determinados en la simulación.

Parámetro	DSTWU	RadFrac
Reflujo mínimo	1.27	
Reflujo real	1.72	0.0001
Número de etapas teóricas	9	11
Plato de alimentación	6	6

Tabla 4.9. Parámetros de operación de la torre de destilación T-101.

Equipo	T-101
Platos teóricos	11
Plato de alimentación	6
Tipo de condensador	Total
Tipo de rehervidor	Kettle
Reflujo molar	0.001
Temperatura del condensador [°C]	80
Presión del condensador [atm]	1.02
Calor transferido en el condensador [cal/s]	−709
Temperatura del rehervidor [°C]	101
Presión del rehervidor [atm]	1.09
Calor transferido en el rehervidor [cal/s]	1 423

4.2.2.3. Destilación con reflujo segunda etapa

Para la simulación se considera a la corriente de salida del separador (S7) como una mezcla simple alcohol-agua, en la que se busca llegar al valor azeotrópico. La fracción de recuperación de etanol se estima en un 95 % y para el agua 5 %. La corriente S10 entra a la columna de rectificación T-102 (Figura 4.8), que tiene 27 platos teóricos con un reflujo molar de 1.36; con un flujo de destilado de 5.03 kg/h. La corriente S13 que sale del condensador tiene una concentración volumétrica del 92 % de etanol a 80.4 °C y 1.02 atm. Debido a la configuración de las torres, se anexó una bomba (P-101) de una presión de descarga de 1.2 atm y una eficiencia del 60 %, para impulsar la corriente de alimentación (S7).

En este esquema se estableció una recuperación del 95 % de etanol en una solución de aproximadamente el 50 de la concentración inicial presente en la corriente de la etapa anterior (S7). Para el perfil de presiones de trabajo, se estableció una presión de 15 psia para el rehervidor y el condensador (valor cercano a la presión atmosférica del sitio de operación), con una caída de presión en cada plato de 0.1 psi por reglas heurísticas para columnas de destilación (valor predeterminado del simulador) (Kamal al-Malah, 2017).

Las especificaciones para simular la columna de rectificación T-102 a calcularse con el modelo *RadFrac* obtenidas a partir del modelo *DSTWU* (Tabla 4.11) fueron semejantes a las consideradas para la primera columna (T-101), aumentándose el número máximo de iteraciones y el reflujo dada la necesidad de alcanzar una concentración superior (Tabla 4.10). Las especificaciones de la columna se detallan en la Tabla 4.12.

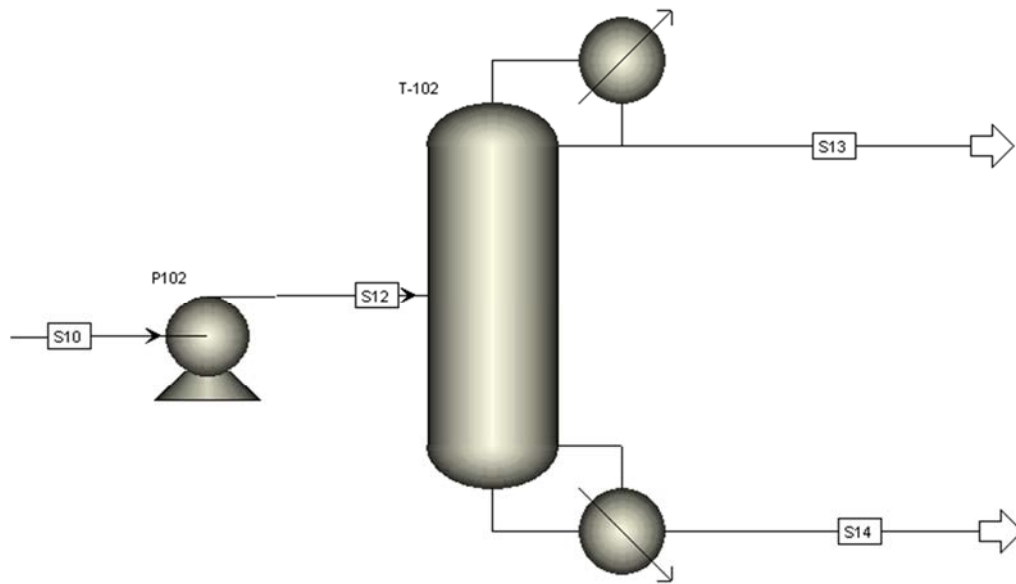


Figura 4.8. Esquema para la columna de rectificación T-102.

Tabla 4.10. Parámetros de las corrientes simuladas para la destilación con reflujo.

Corriente	S10	S12	S13	S14
Etanol [kg/h]	5.05	5.05	4.80	0.15
Agua [kg/h]	2.71	2.71	0	0.87
Total [kg/h]	15.53	7.76	5.33	2.44
Flujo volumétrico [L/h]	9.76	9.76	7.12	2.73
Fracción volumétrica	0.70	0.70	0.92	0.13
Temperatura [°C]	80	101	80	80
Presión [atm]	1.02	1.09	2	1.2

Tabla 4.11. Comparativa entre los parámetros para columna de destilación T-102 determinados en la simulación.

Parámetro	DSTWU	RadFrac
Reflujo mínimo	1.01	-
Reflujo real	1.35	1.35
Número de etapas	27	29
Plato de alimentación	26	26

Tabla 4.12. Parámetros de operación de la torre de destilación T-102.

Equipo	T-102
Platos teóricos	29
Plato de alimentación	26
Tipo de condensador	Total
Tipo de rehervidor	Kettle
Reflujo molar	0.94
Temperatura del condensador [°C]	80
Presión del condensador [atm]	1.2
Calor transferido en el condensador [cal/s]	—681
Temperatura del rehervidor [°C]	100
Presión del rehervidor [atm]	1.39
Calor transferido en el rehervidor [cal/s]	700

4.2.2.4. Destilación extractiva

Siguiendo lo planteado en el capítulo anterior (Figura 3.6), se utilizó glicerina como solvente de extracción, cuya corriente (S15) se une a la proveniente de la etapa de destilación con reflujo (S13) en una relación molar 3:1 en una columna *RadFrac*. Para este diseño se consideraron dos columnas (Figura 4.9), mientras que para la entrada de las corrientes de alimentación y del solvente con un flujo de destilado de salida se consideró un valor de 4.5 kg/h.

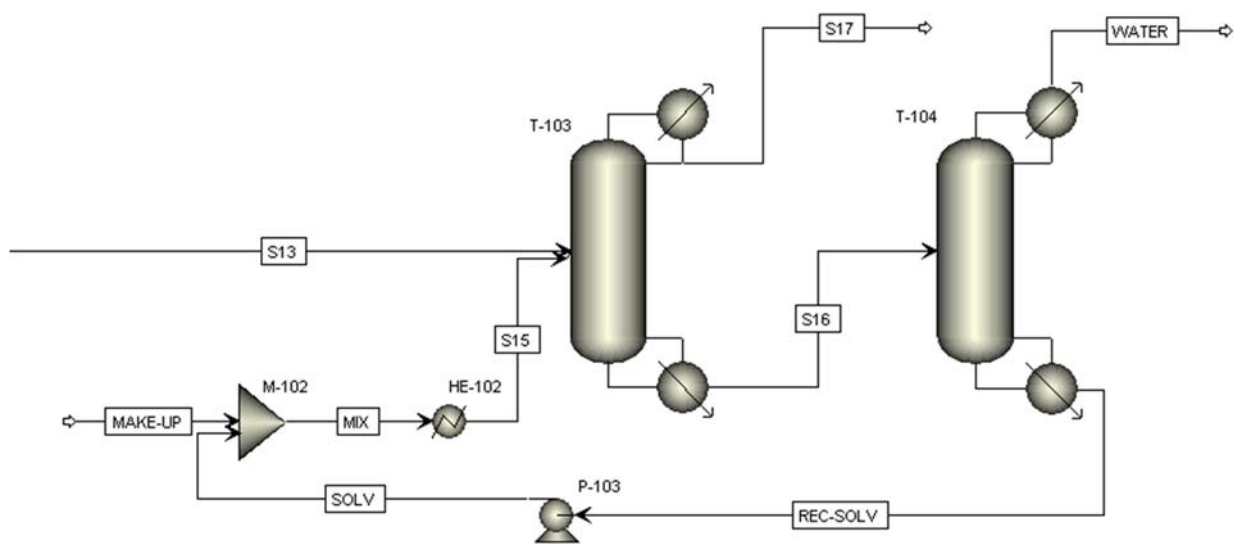


Figura 4.9. Esquema para el sistema de destilación extractiva y recirculación de solvente reciclado.

La torre T-103 se encuentra configurada según se muestra en la Figura 4.9. La corriente de etanol proveniente de la columna de destilación con reflujo (S13), junto con una corriente de 12 kg/h de glicerina a 80 °C (S15), ingresan a la columna con un reflujo molar de 2.5, alcanzando una concentración de etanol del 98 % en la corriente de cabeza (S17). Las corrientes consideradas en la simulación se detallan en la Tabla 4.13.

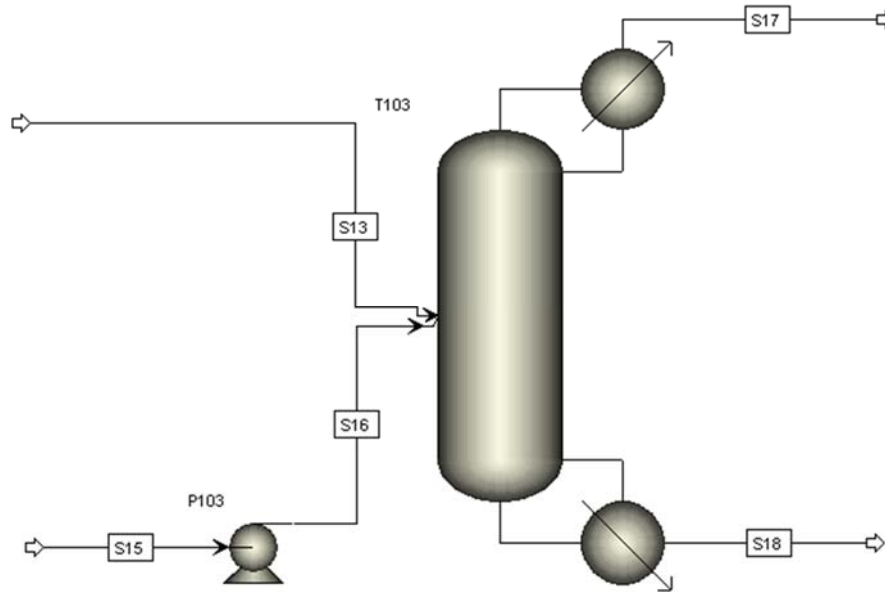


Figura 4.10. Esquema para columna de destilación extractiva con glicerina T-103.

Tabla 4.13. Parámetros de las corrientes simuladas para la destilación extractiva.

Corriente	S13	S15	S16	S17
Etanol [kg/h]	4.80	0	0.28	4.53
Agua [kg/h]	0	0.01	0.41	0.12
Glicerina [kg/h]	0	12.58	12.57	0
Total [kg/h]	5.33	12.59	13.26	4.65
Flujo volumétrico [L/h]	7.12	10.25	11.45	6.26
Fracción volumétrica	0.92	0	0.03	0.98
Temperatura [°C]	80.42	80	145	75
Presión [atm]	1.2	1.1	1.04	1.02

Para el proceso de recuperación de la glicerina, la corriente S16 entra a la columna T-104 con un reflujo molar de 6.2, obteniendo una corriente de destilados del 99.9 % de glicerina (Tabla 4.14). Para que la corriente de solvente reingrese al sistema, se anexó un mezclador (MIXER) (M-102) para unir las corrientes provenientes de la recuperación y una alimentación externa de solvente, para mantener así una cantidad constante de solvente (fresco) en la torre T-103. El mezclador combina flujos de material (o flujos de calor o flujos de trabajo) en un flujo de salida. Si las corrientes de material están

mezcladas, puede usar una corriente de decantación de agua opcional para decantar el agua libre de la salida. El modelo de mezclador determina la temperatura combinada de la corriente de salida y la condición de la fase mediante un cálculo de equilibrio de fase adiabático en las corrientes de alimentación compuestas (Aspen Technology, 2018).

Además, se anexó un intercambiador de calor (HE-102) a la salida del mezclador, para acondicionar la temperatura de la corriente S15 a 80 °C. Los valores para las dos columnas involucradas se detallan en la Tabla 4.15.

Tabla 4.14. Parámetros de las corrientes simuladas para la recuperación de solvente.

Corriente	S16	RECOV SOL	WATER	SOLV	MAKE-UP	MIX
Etanol [kg/h]	0.28	0	0.28	0	0	0
Agua [kg/h]	0.41	0.01	0.40	0.01	0	0.01
Glicerina [kg/h]	12.57	12.55	0.02	12.55	0.02	12.58
Total [kg/h]	13.26	12.57	0.70	12.56	0.02	12.59
Flujo volumétrico [L/h]	11.45	12.07	1 022	12.07	0.02	12.08
Fracción volumétrica	0.03	0	0	0	0	0
Temperatura [°C]	145	285	165	285	20	285
Presión [atm]	1.04	1.02	1	2	1	1.2

Tabla 4.15. Parámetros de operación de la torre de destilación T-103 y T-104.

Equipo	T-103	T-104
Platos teóricos	4	4
Plato de alimentación	3	1
Plato de alimentación del solvente	2	-
Tipo de condensador	Total	Ninguno
Tipo de rehervidor	Kettle	Kettle
Reflujo molar	2.5	6.28

4.2.2.5. Filtración por tamices moleculares

La corriente de cabeza de destilado (S17) ingresa al lecho de tamices moleculares (MS-101), con el objetivo de simular las condiciones propuestas en la etapa experimental. Como material de relleno se seleccionó zeolita tipo 3A (cuyas características se describen en la Tabla 3.3) con 0.1 m de diámetro interno y 0.45 m de altura.

La simulación de este proceso se realizó mediante el paquete especializado *Aspen Adsorption*[®] (Aspen Technology Inc., 2010). Tal como se comentó en apartados anteriores, el modelo NRTL fue utilizado para el cálculo de las propiedades termodinámicas. La representación esquemática de la unidad de adsorción se muestra en la Figura 4.11.

Para la configuración del lecho, se empleó un modelo predeterminado de deshidratación de etanol usando el modelo VSA (*Vacuum Swing Adsorption*) o adsorción por oscilación de presión al vacío, donde se emplea zeolita como material adsorbente. Las corrientes consideradas en la simulación se detallan en la Tabla 4.16.

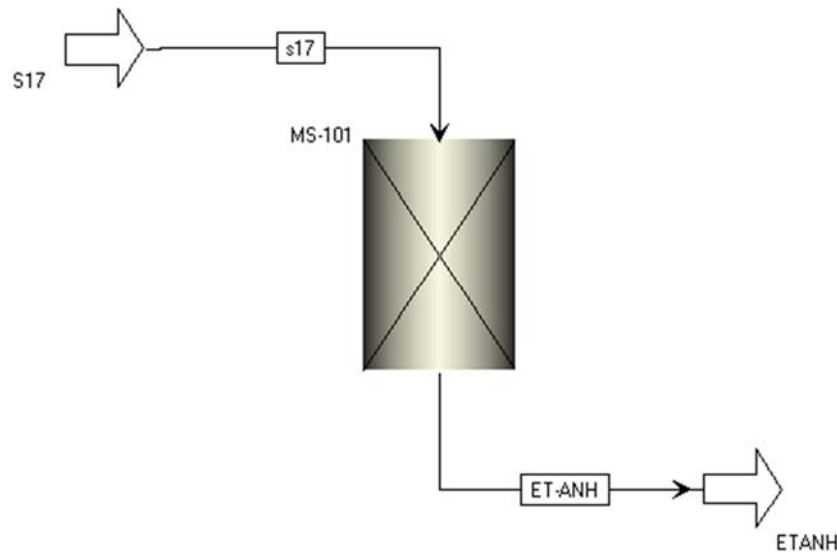


Figura 4.11. Esquema para el proceso de deshidratación con el lecho de tamices moleculares.

Tabla 4.16. Parámetros de las corrientes simuladas para la adsorción.

Corriente	S17	ET-ANH
Etanol [kg/h]	4.53	4.53
Agua [kg/h]	0.12	0.12
Total [kg/h]	4.65	4.64
Flujo volumétrico [L/h]	6.26	6.28
Fracción volumétrica	0.98	1
Temperatura [°C]	75	75
Presión [atm]	1.02	1.02

4.3. Análisis Económico

Para completar los estudios experimentales presentados en los Capítulos 2 y 3, al igual que la simulación presentada en el presente capítulo, se consideró necesario plantear un análisis tecno-económico (TEA). Este tipo de análisis puede proporcionar información crítica sobre: la viabilidad económica, cuellos de botella y riesgo en las cadenas de valor. Dicho análisis requiere el uso de herramientas computacionales, mismas que se pueden utilizar no solo para predecir, sino también para optimizar los parámetros tecno-económicos (Igbokwe et al., 2022).

Para realizar un análisis económico y el consecuente presupuesto establecido se requieren una gran cantidad de datos, muy diversos y susceptibles a variar en el corto plazo, como lo son costes de equipos, obra civil, mano de obra, logística e instalación. Es necesario efectuar una serie de suposiciones y restricciones, dada la falta de información crucial para este análisis. Para la elaboración del presupuesto, se decidió utilizar un paquete complementario a Aspen Plus: *Aspen Process Economic Analyzer versión 8.8*. Se basa en determinados modelos que permiten generar estimaciones de los costes de capital, así como los costes operativos del proyecto. Las características clave incluyen equipos interactivos para determinar los costes operativos y el análisis de inversiones, y la generación automática de diagramas de flujo de procesos (Al-Malah, 2016).

Para una simulación del análisis económico se requiere establecer ciertas restricciones, con el fin de simplificar los cálculos (Hunpinoy et al., 2013):

- Al no contar con datos técnicos como materiales o de dimensiones de equipos, tubería o instalaciones anexas, se utilizarán únicamente valores referenciales.
- Solo se considerarán los equipos detallados en la simulación en Aspen Plus, descrito en los apartados anteriores.
- No se considerarán valores de transporte de los equipos.
- No se harán análisis de los costes de mano de obra especializada.

- No se analizarán costes de terrenos y obra civil anexa a la misma.
- Para la simulación se decidió por los cotos referenciales de Estados Unidos por ser el dólar la moneda oficial de Ecuador.
- El presupuesto se estimó para una operatividad de 20 años.

El primer presupuesto a considerar fue el relacionado con la adquisición de los equipos y los costes asociados de instalación, obteniendo un valor de 1 987 700 USD, cuyos valores se detallan en la Tabla 4.17.

Tabla 4.17. Presupuesto estimado de equipos e instalación.

<i>Equipo</i>	<i>Costo</i> [USD]	<i>Instalación</i> [USD]	<i>Peso neto</i> [kg]	<i>Peso bruto</i> [kg]
AB-101	16 200	120 100	1 500	8 794
HE-101	8 100	45 200	150	1 461
HE-102	31 200	70 300	4 500	8 741
P-101	3 900	27 000	80	997
P-102	3 900	27 000	80	997
P-103	3 900	28 600	80	1 237
R-101	22 000	153 600	510	6 296
R-102	22 000	152 900	510	6 084
T-101	18 500	133 700	1 290	6 477
T-102	173 400	436 900	29 190	41 383
T-103	36 300	274 600	2 390	12 599
T-104	21 300	157 100	1 300	7 712
Subtotal	360 700	1 627 000		
Total	1 987 700			

4.3.1. Costes de capital (CAPEX)

Los Costes de Capital (CAPEX, *CAPital EXpenditures*) se refieren a la inversión en capital que realiza una compañía, ya sea para adquirir, mantener o mejorar sus activos, así como para expandir los bienes de capital (fábricas, maquinaria, vehículos, etc.) (Leotescu, 2019). Para la determinación de estos costes de capital se requiere determinar la inversión total de capital (TCI, *Total Capital Investment*) (Seguí et al., 2014), la cual se obtiene mediante la contribución de dos parámetros:

- La inversión fija de capital (FCI, *Fixed Capital Investment*) o el capital requerido para las instalaciones destinadas a la producción y al resto de la planta.
- El capital de trabajo (WC, *Working Capital*) o el capital necesario para la operación normal de la planta.

Por norma general, el capital de trabajo (WC) representa entre un 10 y un 20 % de la inversión total (TCI), considerándose el valor promedio del 15 %, para este análisis. Por su parte, el 85 % restante representará la inversión fija (FCI), cuyo valor se consideró el costo bruto de los equipos, propuesto en la Tabla 4.17.

Tabla 4.18. Costes involucrados en el CAPEX.

Parámetro	Valor
Inversión fija de capital (FCI)	1 987 700
Capital de trabajo (WC)	350 770.59
Inversión total de capital (TCI)	2 338 470.59

4.3.2. Costes operacionales (OPEX)

Los costes operacionales (OPEX, *Operational Expenditures*) es un costo permanente para el funcionamiento de un producto, negocio o sistema. Para su cálculo se requiere realizar una estimación de los costes de producción y los gastos generales asociados a ellos, como se detalla en la Tabla 4.19, valores que fueron determinados con base a lo propuesto por Sanz Martínez (2019).

Tabla 4.19. Descripción de los costes operacionales (OPEX) para la planta propuesta.

Código	Coste	Cálculo	Valor
A	Costes de producción	$A1 + A2 + A3$	403 559.77
A1	Costes de producción variables	$A1-i$, con $i = a, \dots, g$	225 535.33
A1-a	Materias primas	Texto	7 480
A1-b	Laborales	Texto	44 349.12
A1-c	Supervisión	$0.15 \cdot A1-b$	6 652.36
A1-d	Servicios	Texto	6 264
A1-e	Catalizador	Texto	780
A1-f	Mantenimiento	$0.09 \cdot FCI$	139 139
A1-g	Suministros	$0.15 \cdot A1-f$	20 870.85
A2	Costes de producción fijos	$A2-a + A2-b + A2-c$	166 616.02
A2-a	Depreciación	$TCI / 20$	116 923.52
A2-b	Impuestos locales	$0.01 \cdot FCI$	29 815.50
A2-c	Seguros	$0.01 \cdot FCI$	19 877
A3	Otros Costes	$0.06 \cdot (A1-b + A1-c + A1-f)$	11 408.42
B	Gastos Generales	$B1 + B2 + B3$	44 839.97
B1	Costes Administrativos	$0.25 \cdot A1-b$	8 869.82
B2	Distribución-marketing	$0.02 \cdot OPEX$	8 967.94
B3	Costes de I+D	$0.05 \cdot OPEX$	22 419.98
C	Costes Operacionales (OPEX)	$A + B$	448 399.74

A1-a. Materias primas: para estos costes se consideraron como materias primas la glicerina y la zeolita, la primera necesaria para la destilación extractiva y la segunda para el lecho de la torre de adsorción. Se consideró una pérdida de glicerina de 0.03 kg/h, además de añadir una cantidad apreciable para suplir eventualidades, se propusieron 200 litros por año, a un costo de 7.5 dólares por litro. Por su parte, para el consumo de zeolita se consideró 2.5 kg por semana con un costo de 20 dólares por kilogramo.

A1-b. Laborales: Para este análisis se consideró el salario básico en Ecuador de 425 dólares, decidiéndose establecer un salario referencial de 850 USD dada la naturaleza de la actividad industrial. Requiriendo un mínimo de 4 operadores.

A1-e. Catalizador: Como se precisó en capítulos anteriores, la producción utiliza la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, considerándose un requerimiento total de 156 Kg por año a un costo de 5 dólares por kilogramos.

A2-a. Depreciación: Este apartado se refiere al deterioro y obsolescencia progresiva de una propiedad en un periodo determinado de tiempo, para este caso se asumió un periodo de 20 años.

A3. Otros costes: Hace referencia a una serie de importes no relacionados de forma directa con el proceso productivo, como: servicios médicos, de seguridad o de restauración.

Además de plantear un estimado del CAPEX (Tabla 4.18), se realizó una estimación de los costes directos e indirectos relacionados. Con estos valores, se planteó un análisis de su depreciación, teniendo como valor referencial 20 años, generando una tasa interna de retorno del 13 % y un valor actual neto (VAN) de 528 860.78 dólares, con una recuperación de capital de 10 años (Figura 4.12).

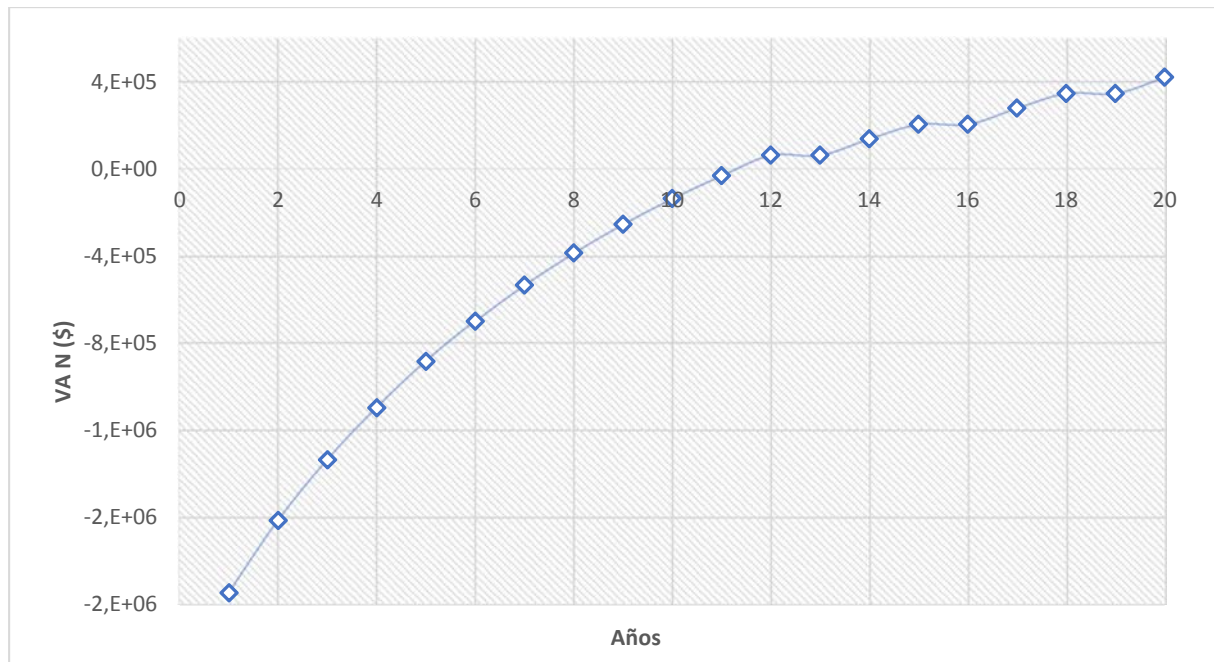


Figura 4.12. Perfil del VAN estimado.

4.4. Resumen de la sección

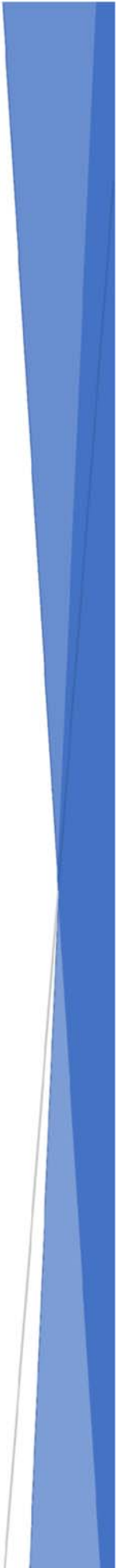
Los paquetes de software especializados, como Aspen Plus, presentan gran cantidad de opciones y herramientas que facilitan el modelado y cálculo de balances, además de obtener valiosa información para el diseño de un proceso industrial. Aunque, presenta grandes limitaciones propias del programa o asociadas a licencias de pago. Lo cual obligó a dividir la simulación en la presente investigación, en tres etapas: el modelo de fermentación, simulación de operación y la adsorción. Los cuales han permitido obtener un balance de materiales de todo el proceso y ciertos valores energéticos.

Esta simulación ha buscado emular lo más fielmente posible la configuración propuesta en la etapa experimental descrita en los capítulos 2 y 3 de esta memoria, sin llegar a plantear una optimización de tales configuraciones. Este último ejercicio, sería una buena base para estudios posteriores, que complementen a este primer acercamiento al tema, siendo requerido muchos más datos técnicos y de maquinaria para acercarse más a las condiciones operativas.

Aunque el principal objetivo fue simular las condiciones experimentales a una escala industrial, se decidió complementarlo con un análisis económico, auxiliado por las herramientas especializadas de Aspen Plus, junto con consideraciones planteadas por estudios similares. Esta aproximación, aunque incompleta, permite tener una idea bastante clara de la tasa de retorno y presupuestos para la implementación de este proyecto a largo plazo.

Capítulo V

Resumen de resultados



5. Resumen de los resultados

5.1. Producción industrial de etanol a partir de residuo mucilaginoso de cacao

En la actualidad, uno de los principales problemas ambientales se deriva del uso de fuentes fósiles de energía, primarias y secundarias, cuya combustión contribuye de manera importante a la contaminación del agua, suelo y aire. Sin embargo, se buscan intensamente alternativas energéticas, siendo el empleo de los biocombustibles una de las más atractivas y prometedoras. Entre los biocombustibles líquidos más utilizados están el biodiésel y bioetanol, ya que, al mezclarse con otros combustibles, incrementan el octanaje original del combustible puro, disminuyen las emisiones contaminantes y se integran fácilmente a los sistemas logísticos de distribución de combustibles.

En el procesamiento del cacao se generan varios residuos, uno de ellos es el mucílago, obteniéndose aproximadamente 0.39 kg de mucílago por kilogramo de granos de cacao, lo cual significa que en el año 2019 se generaron 110 635 toneladas de este residuo. La composición de mucílago contiene azúcares, ácidos y pectina. Una parte de esta pulpa es empleada para fermentar las almendras que producirán el chocolate, pero entre el 5-7 % se drena como exudado. Usualmente, se desperdician más de 150 litros de mucílago por tonelada de almendras de cacao húmedas, principalmente debido a la falta de conocimiento sobre el aprovechamiento eficiente del mismo. Por lo cual el mucílago de cacao CCN-51, residuo de la creciente industria cacaotera, representa una materia prima con un gran potencial para la obtención de etanol, puesto que contienen azúcares fermentables y se encuentra de manera abundante en el Ecuador y en la actualidad sin aprovechamiento útil y rentable. Sin embargo, representa una materia prima con alto potencial energético para la producción de etanol anhidro para uso como aditivo en gasolinas.

5.2. Caracterización del mucílago de cacao CCN-51

El principal de la presente investigación fue la determinación de las condiciones necesarias para una potencial producción de etanol a partir del mucílago de cacao. Para ello, se consideró indispensable una caracterización completa y exhaustiva de esta materia prima. Se determinó la concentración de azúcares expresados en grados Brix, su pH, su acidez titulable y la concentración de iones Na^+ , K^+ y Ca^{+2} . Junto a estas medidas se consideró útil determinar diversas propiedades físico-químicas que podrían utilizarse en futuras investigaciones. Entre los parámetros más relevantes se determinaron: sólidos solubles 17.15 ± 0.86 °Brix; pH $4,05 \pm 0.004$; acidez titulable 245.25 ± 21.19 meq/L; concentración de Ca^{+2} $169.21 \pm 31,04$ ppm; concentración de Na^+ 161.85 ± 40.41 ppm y la concentración de K^+ 462.9 ± 49.96 ppm.

Si bien la determinación de los °Brix presenta una visión efectiva de la concentración de los azúcares, se consideró oportuno determinar las concentraciones de los azúcares en forma individual a partir de una muestra aleatoria, ya que para la aplicación de modelos cinéticos se requiere la concentración de sustrato. Para ello, se empleó: espectroscopia infrarroja (FT-IR), cromatografía de alta eficiencia (HPLC) y espectrofotometría UV-visible, obteniendo concentraciones de 92 g/L de sacarosa, 91.3 g/L de glucosa y 88 g/L de fructosa cuando se aplica la técnica FT-IR. Cuando se aplicó HPLC se obtuvieron concentraciones de 93.44 g/L de sacarosa, 67.75 g/L de glucosa y 55.61 g/L de fructosa. Finalmente, al aplicar UV-visible, la concentración de todos estos azúcares sumó un valor de 231.6 g/L. Adicionalmente, se realizó un análisis de micronutrientes, carbono orgánico total (TOC), nitrógeno total disponible y poder calorífico. Entre los micronutrientes más significativos se descartó la presencia de metales pesados. Para el caso del TOC su concentración fue de 879.35 ± 24.32 ppm y el nitrógeno total disponible fue de 18.98 ± 1.11 ppm. El poder calorífico de la muestra se realizó en un laboratorio externo, la muestra fue preparada desecándose 250 mL de mucílago mediante liofilización, obteniéndose 22.35 g con un poder calorífico de 13 852 J/g.

5.3. Operación en biorreactor tipo *batch* (CSTR)

A título general, la operación en un biorreactor tipo batch debe considerar aspectos como acondicionamiento y operación del biorreactor.

Para la batería de experimentos sobre la fermentación, se consideró mantener dos de sus variables constantes: el volumen de la carga y la velocidad de agitación. El volumen del reactor fue de 2 litros, decidiéndose utilizar un volumen de 1.6 litros de carga, a fin de asegurar un espacio suficiente para la generación de espuma. La velocidad de agitación empleada fue de 250 rpm, misma que aseguraba que la espuma generada se mantuviera dentro de los límites, además de encontrarse dentro de los parámetros recomendados para este tipo de fermentación (200-400 rpm).

El procedimiento de fermentación consideró etapas fundamentales como la preparación de la materia prima, la cual fue descongelada e inmediatamente sometida a calentamiento directo para alcanzar la temperatura establecida y dilución con agua desmineralizada para alcanzar la concentración requerida. El acondicionamiento del reactor previo a cada serie de experimentos, consistió en el lavado y esterilización (121 °C, 20 minutos) de los elementos móviles del biorreactor, mientras que a la muestra se ajustó su pH mediante la adición de soluciones de NaOH 1N o HCl 1N a través de bombas peristálticas. Finalmente, se realizó un proceso de estabilización en atmosfera de nitrógeno para asegurar la fermentación anaerobia.

Las variables consideradas dentro de matriz de diseño experimental fueron: temperatura, pH y concentración de levadura. La temperatura tuvo un rango entre 25 y 35 °C, el pH entre 4 y 5 y la concentración de levadura entre 1 y 3 g/L. La experimentación transcurrió desde 30 a 96 horas, dependiendo de los parámetros de operación.

El experimento, con temperatura de 35 °C, pH de 4 y concentración de levadura de 3 g/L, fue aquel en el que se generó la máxima concentración de bioetanol a las 36 horas. Otros experimentos como el que se consideró una temperatura de 35 °C, pH de 4 y concentración de levadura de 1 g/L; o aquel que se realizó a una temperatura de 25 °C, pH de 4 y concentración de levadura de 3 g/L alcanzaron concentraciones cercanas; sin embargo, los tiempos de reacción se incrementaron. Adicionalmente, se observó que los experimentos que presentan valores inferiores de temperatura, pH y concentración de levadura generan una menor concentración de alcohol, bajas productividades y mayor tiempo de reacción. Finalmente, para el experimento de mayor productividad, se evaluó la concentración de sustrato y de levadura a lo largo de la fermentación.

El microorganismo utilizado en la fermentación fue la *Saccharomyces cerevisiae*, una levadura de panadería comercial, la cual crece si dispone de glucosa, sales, iones inorgánicos y algunos factores de crecimiento. Los macronutrientes que comprenden fuentes de carbono (azúcares), nitrógeno libre (aminoácidos, péptidos pequeños y sales de amonio), oxígeno, azufre, fósforo, potasio y magnesio. Entre los micronutrientes necesarios para la fermentación se encuentran: calcio, cobre, hierro, manganeso y zinc. Otros aspectos para considerar durante el diseño del proceso de fermentación fueron la espuma generada y los antiespumantes, por lo cual, para el análisis de su eficacia y posibles interferencias en el proceso fermentativo, se tomaron como referencia las primeras 24 horas de fermentación y se empleó aceite de silicona, alginato de sodio y polietilenglicol. Para comparar su eficacia se realizó una fermentación a una temperatura de 35 °C, un pH de 4 y una concentración de levadura de 3 g/L, midiendo el volumen de espuma producida durante las primeras horas de fermentación. De los compuestos considerados, la silicona fue la que mejores resultados presentó, por su parte, el alginato redujo sensiblemente la producción de etanol probablemente por sus propiedades aglutinantes. Así, el principal factor a considerar para la elección del antiespumante fue su efectividad a la hora de evitar la formación de espuma, siendo el polietilenglicol el seleccionado durante el estudio experimental.

5.4. Métodos Analíticos y Modelado Cinético de la fermentación del mucílago de cacao CCN-51

Para la cuantificación del bioetanol se utilizó el método de microdifusión que es un método alternativo no cromatográfico que utiliza una cámara Conway o similar, que permite determinar sustancias susceptibles a volatilizarse como el etanol y la fijación al medio apropiado para ser cuantificadas. El método fenol-ácido sulfúrico, llamado también método de Dubois, permitió cuantificar diversos azúcares del mucílago de cacao como polisacáridos, oligosacáridos, monosacáridos y sus derivados. Los carbohidratos son generalmente sensibles a altas temperaturas y a los ácidos fuertes. La coloración amarillo-naranja generada en los complejos formados por reacción con el fenol en ácido sulfúrico concentrado es muy estable hasta las 24 horas. La intensidad del color es proporcional a la concentración de carbohidratos y se mide por absorbancia a longitudes de ondas que varían entre 488 nm y 492 nm. El contenido de levadura (biomasa) determinado mediante un método de conteo directo y los pesos de células secas se obtuvieron mediante secado por liofilización.

El incremento de la concentración de levadura a lo largo de la fermentación sugiere que las levaduras están constantemente produciendo nuevas células por mitosis, generando así una mayor concentración de ellas a lo largo del experimento hasta llegar a un punto de estado estacionario.

El consumo de sustrato es debido a que las levaduras usan el mismo como alimento para crecer y reproducirse, metabolizando la glucosa para producir alcohol y dióxido de carbono en condiciones anaerobias del medio. Dado que las levaduras van a procesar la glucosa disponible en el sustrato, esta disminuye a lo largo del proceso fermentativo.

Los resultados experimentales obtenidos fueron ajustados a distintos modelos matemáticos utilizando un método de mínimos cuadrados no lineales de *Levenberg-Marquardt* programado en MATLAB®. Para los casos que requirieron resolver los modelos diferenciales se utilizó un método de *Runge-Kutta* de tercer orden (ODE23).

Al aplicar el modelo logístico integrado y Gompertz modificado se obtuvo un buen ajuste a los datos experimentales, con valores de R^2 de 0.9696 y 0.9796, respectivamente, para el experimento de mayor producción de etanol. Se alcanzó una tasa máxima de crecimiento específico (μ_{max}) de $0.39 \pm 0.028 \text{ h}^{-1}$, un tiempo de retraso (t_l) de 2 horas, y una tasa máxima de producción de bioetanol (rpm) de $1.11 \pm 0.055 \text{ g/(L}\cdot\text{h)}$. Estos modelos no incluyen el consumo de sustrato y los términos de inhibición del producto, como sí lo hace el modelo de *Andrews y Levenspiel*, su simulación se empleó para determinar parámetros cinéticos: $P_{X,max}$, K_{SP} , K_{IS} , K_{IP} , m , q_{max} , α , β , $Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$, μ_{max} , K_S . Para este método se obtuvieron los valores de los parámetros cinéticos con altos grados de correlación: para la producción de levadura ($R^2 = 0.9038$), el etanol ($R^2 = 0.9450$), y el consumo de sustrato (azúcares) ($R^2 = 0.9831$).

Este trabajo contribuye al conocimiento existente, ya que se aplicaron con éxito modelos cinéticos para la fermentación con levaduras del tipo *Saccharomyces cerevisiae*, permitiendo predecir y controlar sistemas fermentativos del mucílago de cacao CCN-51. Aunque todos los modelos tuvieron un ajuste razonable ($R^2 > 0.90$), el método de *Andrews y Levenspiel* tiene la ventaja adicional de considerar los términos de inhibición del sustrato y producto.

La investigación futura debe dirigirse hacia la aplicación de estos modelos con células inmovilizadas para predecir y comparar resultados de producción de bioetanol y posteriormente su escalado industrial.

5.5. Purificación del Etanol

En esta tesis doctoral, la destilación simple fue utilizada como primer medio de separación del alcohol, eliminación de volátiles y del mosto proveniente de la etapa de fermentación. Para llevar esta operación a cabo se usó un kit de destilación de vidrio estándar, con muestras de 500 mL. Las condiciones de presión atmosférica en el laboratorio (564 mmHg por encontrarse en una ciudad a más de 2 500 metros sobre el nivel del mar) y la configuración del equipo permitieron que la concentración máxima alcanzable sea alrededor de 63 °GL (determinado mediante un alcoholímetro), mientras que en el análisis de cromatografía de un laboratorio externo se obtuvieron valores de: etanol 62.48 °GL; acetaldehído 6.40 mg/100 cm³ de etanol; metanol 6.94 mg/100 cm³ de etanol; alcoholes superiores 995.57 mg/100 cm³ de etanol; etilacetato 86.97 mg/100 cm³ de etanol y furfural 7.20 mg/100 cm³ de etanol. Los alcoholes superiores son el producto del metabolismo secundario de las levaduras, y dado su alto contenido, este destilado no es apropiado para consumo humano, sin embargo, esto no influye con la utilidad que se pretende dar al mismo, como aditivo para biocombustibles posterior a otros procesos de separación, ya que estos serán eliminados en las nuevas etapas de purificación.

Para la segunda destilación se utilizó una columna de platos con reflujo en la cabeza, mediante un temporizador y una alimentación por lotes, construida enteramente de vidrio, sin aislamiento térmico. La torre de destilación fue calentada mediante una resistencia eléctrica, que mantenía una temperatura de 95 °C. El reflujo se controlaba mediante una válvula temporizada en la salida del condensador, permitiendo que este avanzará al enfriador o fuera redirigido a la cabeza de la torre. La concentración alcanzada fue de 92 °GL y con un volumen por lote de 3.4 litros de destilado.

La destilación con reflujo se ve limitada por la existencia del azeótropo etanol-agua, mismo que puede ser superado empleando una destilación extractiva con solventes no polares. Para este estudio se decidió utilizar un kit de destilación simple, ya que, en la etapa anterior, no se logró obtener más de 4 litros de etanol con un 92 % de pureza.

Con dicho etanol, se estableció una batería de experimentos utilizando 3 solventes para la destilación extractiva: etilenglicol, propilenglicol y glicerina; en relaciones volumétricas 1:1, 2:1 y 3:1. En la etapa de destilación extractiva se incrementó la concentración de etanol hasta 98 °GL, donde la glicerina resultó ser el solvente más apropiado con una relación 3:1.

La etapa final de purificación fue la adsorción, al ser una técnica de separación que emplea un material de gran superficie específica, generalmente identificado por su tamaño de poro (tamiz molecular). El relleno seleccionado fue zeolita 3A de la casa comercial Merck, cuyas propiedades y las del lecho se detallaron en el capítulo 3. En este trabajo de investigación, se preparó una columna con un diámetro de 11.5 mm y 650 mm de altura de relleno, con un flujo volumétrico de 2 mL/min, la alimentación provino del producto obtenido en la etapa de destilación extractiva con glicerina, que poseía una concentración inicial de aproximadamente 98 °GL, manteniendo una altura constante de líquido de 5 cm sobre el lecho. En esta etapa en particular se requiere obtener un producto con una concentración mínima definida de 99.6 °GL, cuya concentración puede ser usada como aditivo de gasolinas. La concentración alcanzada fue de 99.9 % tras 50 minutos de operación de la columna. Para la sección de adsorción se utilizaron los siguientes modelos matemáticos: Modelo de *Yoon-Nelson*, Modelo *BDST*, Modelo de *Thomas*, Modelo de *Dosis Respuesta*, Modelo de *Wolborska*, Modelo de *Adams-Bohart*; eligiéndose como el modelo más apropiado modelo de *Yoon-Nelson*, por su simplicidad y tener un índice de correlación mayor a 0.97.

5.6. Modelado cinético del proceso con el uso de *Aspen Custom Modeler* (ACM)

Los resultados de concentraciones obtenidas mediante experimentación en laboratorio y su tratamiento matemático utilizando Matlab®, fueron comprobados frente a un modelo simulado utilizando el software comercial *Aspen Custom Modeler*® (ACM).

El modelo de *Andrews y Levenspiel*, usado en la sección de modelado cinético, permitió establecer los diferentes parámetros cinéticos (P_{Xmax} , K_{SE} , K_{IS} , K_{IE} , m , q_{max} , α , β , $Y_{X/S}$, $Y_{E/S}$, μ_{max} , K_S), que fueron empleados en ACM.

Fue necesario determinar e incorporar los componentes que participaban en el proceso como reactantes y productos, junto con el método de estimación de propiedades termodinámicas basado en el método *Non Random Two Liquids* (NRTL). Con esta información, el módulo ACM permitió crear, editar y usar un modelo propio.

Una vez declaradas las variables empleadas en el modelo (parámetros cinéticos), se determinaron los datos del dominio y las concentraciones de partida, para continuar con los métodos de discretización, orden y tipo de aproximación. La codificación del modelo del biorreactor se realizó de forma modular, utilizando el concepto de “submodelo”. Con estos condicionantes, se determinaron: concentraciones y la velocidad de producción de bioetanol $\left(\frac{dP_E}{dt}\right)$, velocidad del consumo de sustrato $\left(-\frac{dS}{dt}\right)$ y velocidad de crecimiento de levaduras $\left(\frac{dX}{dt}\right)$.

ACM proporcionan dos clases bien conocidas de métodos de discretización para aproximar derivadas e integrales: diferencias finitas sobre cuadrículas uniformes (FD) y colocación ortogonal sobre elementos finitos (OCFE). Para este estudio del biorreactor desarrollado en ACM, se utilizaron varios métodos de discretización, evidenciándose la falta de convergencia con los métodos de diferencia finita hacia delante de primer y segundo orden (FFD1) y (FFD2). Con todos los demás métodos, como son diferencia finita hacia atrás de primer y segundo orden, diferencia finita central de segundo y

cuarto orden, colocación ortogonal en elementos finitos de segundo, tercer y cuarto orden, y diferencia finita sesgada, se obtuvo convergencia. Sin embargo, los mejores resultados se obtuvieron con las diferencias finitas hacia atrás de segundo orden (BFD2) y la colocación ortogonal de cuarto orden en elementos finitos (OCFE4).

ASM demostró ser una herramienta útil para construir una unidad personalizada de fermentación, ya que permitió crear el modelo, declarar dominios, declarar distribución para cada variable, escribir ecuaciones diferenciales sobre el dominio, escribir condiciones de contorno y finalmente escribir condiciones iniciales o de partida. Todas estas posibilidades, sumadas al correcto método de discretización permitió obtener concentraciones de etanol, levadura y azúcares semejantes a las experimentales y a las obtenidas en MATLAB, así como las velocidades de reacción.

5.7. Simulación en *Aspen Plus* y análisis tecnoeconómico

Se logró simular con satisfacción el proceso de producción de etanol anhidro a partir de mucílago de cacao CCN-51 de la Zona 6 de Ecuador como parte de un diseño conceptual. Se aplicó como herramienta profesional el software de simulación de plantas químicas *Aspen Plus v.8.1*. y se incluyeron los procesos de fermentación, recuperación de etanol, destilación y deshidratación.

Las bases para el diseño y simulación de este proceso fueron establecidas a partir de parámetros determinados en trabajos de investigación elaborados en la Universidad de Cuenca-Ecuador sobre el mucílago de cacao. Se recopiló toda la información de caracterización y transformación de dicha materia prima y, de forma holística, fueron analizados, interpretados y adaptados al software con el fin de escalar los resultados obtenidos en laboratorio hasta la escala de planta piloto. Se establecieron las condiciones óptimas de fermentación mediante dos reactores tipo *batch*. En el primero se llevó a cabo la inversión de sacarosa, azúcar presente en alta concentración en el mucílago de cacao, y en el segundo, la fermentación alcohólica de glucosa y sacarosa.

De la mano de *Aspen Plus*[®], se diseñaron desde cero las columnas de destilación simple y de rectificación a través del modelo DSTWU para luego ser simuladas con el modelo riguroso RadFrac que utiliza ecuaciones más complejas para concentrar el alcohol lo más posible a su azeótropo con el agua.

Se simuló el proceso de destilación extractiva para deshidratar el alcohol hasta un 97.54 % v/v junto con el sistema de reciclaje y recirculación de la glicerina, empleada como medio extractor. Se empleó *Aspen Adsorption*[®] para escalar el proceso de adsorción con tamices moleculares de zeolita tipo 3A para lograr etanol anhidro con una concentración mayor a 99 % v/v, lo que lo hace apto para su uso como aditivo de gasolina en Ecuador.

Para efectos de esta investigación, se propuso la capacidad de diseño para una planta piloto que procese 1000 litros por día de mucílago de cacao CCN-51 en una semana de producción, correspondientes a la producción total de cacao de la Zona 6 en Ecuador, en reactores por lotes, al ser estos la tecnología más utilizada. Con el valor general de 42 045.99 L/año, se eligió la operación durante 52 semanas de trabajo por año, con 808.57 L de mucílago por semana. Teniendo en cuenta que la producción de cacao en el país se ha incrementado paulatinamente desde 2014, se consideró como base cálculo de 1000 L por semana. Además, una semana es el tiempo aproximado para la producción de etanol anhidro, teniendo en cuenta la recolección de materia prima, el tiempo de fermentación, los procesos de deshidratación y de almacenamiento del producto final.

La materia prima que ingresa es el mucílago de cacao CCN-51 a temperatura y presión ambiente. El primer reactor es de tipo *batch* y es donde tiene lugar una reacción de inversión de la sacarosa para aumentar el rendimiento del proceso. La que ocurre a 127 °C durante 12 min con un grado de conversión del 90 %. A continuación, la corriente de mucílago pasa a través del intercambiador de calor para reducir la temperatura hasta los 30 °C. A esta temperatura, será posible que ingrese al segundo reactor junto con las levaduras de tipo *Saccharomyces cerevisiae* para empezar la reacción de fermentación

alcohólica de la glucosa a 35 °C y presión atmosférica durante 48 horas de tiempo máximo. Desde este reactor salen las corrientes de ventilación, y la corriente con la solución alcohólica.

La corriente de ventilación sirve para separar la fase gaseosa producida durante la reacción y debe eliminarse de manera continua del reactor. Esta fase contendrá en su mayoría CO₂ que arrastra fracciones de etanol, por lo que es necesario dirigirla hacia una columna de absorción para recuperarlo. La columna de absorción cuenta con 5 etapas y utiliza 2.38 kg/h de agua a temperatura ambiente para recuperar el 98 % del etanol en la fase gaseosa. La corriente con el etanol recuperado se va a mezclar con la corriente de salida del segundo reactor para dirigirse a la etapa de destilación.

Para comenzar el proceso de destilación, es necesario separar el CO₂ remanente que salió diluido luego de la fermentación. Para ello, se emplea el equipo de separación para eliminar el 99 % del mismo y así facilitar los procesos siguientes. Entonces, la corriente ingresa a una bomba para aumentar la presión en aproximadamente en un 20 % de la presión de operación del condensador de la columna (15 psia) según reglas heurísticas. En esta columna se lleva a cabo el proceso de destilación simple, es decir, sin reflujo en el condensador. La columna cuenta con 9 etapas, y se alimenta en la sexta. La corriente de salida del condensador tiene una concentración másica de etanol del 70 % a 79.67 °C y 1.02 atm de presión. Dicha corriente ingresa directamente a la una columna de rectificación, cuyas especificaciones serán 27 etapas, un reflujo molar de 1.36, presión en el condensador de 15 psia con un flujo de destilado de 5.03 kg/h. La corriente que sale del condensador tiene una concentración volumétrica del 92 % de etanol y sale a 80.4 °C y 1.02 atm de presión.

Luego, es necesario llevar la corriente a la primera sección de deshidratación, que consiste en una columna de destilación extractiva que usa glicerina como solvente extractor. La corriente de solvente lleva aproximadamente 12 kg/h de glicerina, que es igual a tres veces la cantidad de alcohol en la corriente de alimentación. La columna de destilación extractiva T-103 cuenta con dos etapas, la primera que es por donde ingresa

el solvente, y la segunda para el etanol concentrado y con un reflujo molar de 2.5. De aquí sale la corriente que contiene alcohol en un 98 % de fracción másica a 74.6 °C y la corriente con la glicerina y el agua separada a 145 °C. Se instala una segunda columna de destilación con dos etapas para efectos de recuperación del solvente (glicerina), donde se utiliza un reflujo molar de 6.2 que produce una corriente de glicerina con el 99.9 % de pureza. Esta glicerina recircula al sistema mediante junto con una corriente de ajuste, ingresa y es enfriada a 80 °C antes de entrar nuevamente al sistema. Finalmente, la corriente se traslada hasta el lecho de tamices moleculares de zeolita tipo 3A con 0.1 m de diámetro interno y 0.45 m de altura, por donde es adsorbida la cantidad de agua suficiente para deshidratar el alcohol hasta dejarlo al 99.6 % v/v.

El análisis económico efectuado por *Aspen Plus*® determinó un presupuesto necesario de 1 987 700 dólares como costo de capital, que incluye costes de equipos y de instalación para la economía de Estados Unidos para una planta con un tiempo de vida de 20 años. Los costes de los equipos y los costes de instalación de los mismos se presentan como los de mayor inversión en bienes de capital (68.5 %, respecto al CAPEX total). Por su parte, los costes operacionales se concentran principalmente en los ámbitos laborales, mantenimiento y depreciación. Su contribución supone un 66 % del OPEX general. Finalmente, se determinó una tasa interna de retorno (TIR) del 13 %, un valor actual neto (VAN) de 528 860.78 dólares y un período de recuperación de inversión (PDR) de 10 años.

Capítulo VI

Conclusiones



6. Conclusiones

El principal objetivo del presente estudio consistió en demostrar que el mucílago de cacao, residuo de la creciente industria cacaotera, puede considerarse una materia prima con un gran potencial para la obtención de etanol, con la pureza necesaria para ser utilizada como aditivo de los combustibles, puesto que contiene la concentración de azúcares y nutrientes necesarios para la fermentación. El clon seleccionado para ello fue el CCN-51, debido a que se encuentra de manera abundante en Ecuador.

Para cumplir este objetivo, en primer lugar, se requirió caracterizar la muestra, para a continuación establecer un modelo cinético de fermentación. Tras establecer un plan de muestreo, se procedió a la aplicación de una batería de experimentos que permitió determinar tanto las propiedades físico-químicas del mucílago, como las condiciones óptimas de operación del biorreactor. Los datos obtenidos demostraron que el mucílago contiene los nutrientes suficientes para la fermentación y que esta puede realizarse fácilmente en un biorreactor agitado. Estos datos fueron aplicados a modelos cinéticos empíricos (*Logístico Integrado*, *Gompertz modificado* y el de *Andrews y Levenspiel*) y demostraron un buen ajuste con los datos experimentales obtenidos, presentando aceptabilidad para predecir y controlar sistemas fermentativos con mucílago de cacao CCN-51.

El mucílago fermentado fue sometido a procesos de purificación para separar el etanol contenido. Dichos procesos fueron seleccionados tomando en consideración los equipos y reactivos disponibles. La configuración elegida para ello fue: destilación simple y con reflujo, destilación extractiva y adsorción mediante zeolitas, con los cuales se alcanzó la concentración de etanol requerida para el producto final.

Con los parámetros cinéticos obtenidos mediante el modelo de *Andrews y Levenspiel* se generó una unidad personalizada de fermentación de mucílago de cacao utilizando *Aspen Custom Modeler* (ACM), mostrando un buen ajuste con los datos experimentales.

A continuación, se simuló exitosamente el proceso de producción de etanol, aplicando el paquete de software de simulación de plantas químicas *Aspen Plus*®, donde se incluyó los procesos de fermentación, destilación y deshidratación. En primer lugar, se establecieron dos reactores: en el primero se configuró un proceso de inversión térmica de la sacarosa y en el segundo, la fermentación alcohólica. De la mano de *Aspen Plus*®, se diseñaron las columnas de destilación a través del modelo DSTWU para luego ser ajustadas con el modelo riguroso RadFrac. Se simuló el proceso de destilación extractiva para deshidratar el alcohol con el sistema de reciclaje y recirculación de la glicerina, empleada como medio extractor. Además, se empleó *Aspen Adsorption*® para simular el proceso de adsorción con tamices moleculares de zeolita tipo 3A para conseguir etanol anhidro, apto para su uso como aditivo de gasolina en Ecuador.

Finalmente, se propuso un análisis económico efectuado mediante el empleo de *Aspen Plus*®, que proporcionó diferentes costos referenciales para establecer una planta con un tiempo de vida de 20 años.

Anexos



Anexo A. Cultivo de Cacao en el Ecuador durante el año 2015

Tabla A.1. Cultivo de Cacao en el Ecuador durante el año 2015 (ANECACAO, 2016).

PROVINCIA	CÓDIGO DE CANTÓN	CANTÓN	SUPERFICIE (km ²)	PRODUCCIÓN ABSOLUTA (t/año)	DENSIDAD DE PRODUCCIÓN (t/km ² /año)	RESIDUOS (t/año)	DENSIDAD DE RESIDUOS (t/km ² /año)	ENERGÍA BRUTA (TJ/año)
GUAYAS	118	ALFREDO BAQUERIZO MORENO	218.62	1 520.20	6.95	18 821.88	86.09	127.31
	119	BALAO	409.10	7 541.88	18.44	93 377.49	228.25	631.59
	120	BALZAR	1 187.47	736.80	0.62	9 122.43	7.68	61.70
	137	CRNEL MARCELINO MARIDUEÑA	254.41	1 011.38	3.98	12 522.15	49.22	84.70
	123	DURÁN	300.45	605.68	2.02	7 499.09	24.96	50.72
	125	EL TRIUNFO	395.42	1 133.41	2.87	14 033.04	35.49	94.92
	124	EMPALME	715.93	6 818.67	9.52	84 423.33	117.92	571.02
	140	GNRAL ANTONIO ELIZALDE	153.26	389.57	2.54	4 823.34	31.47	32.62
	117	GUAYAQUIL	4 111.67	3 317.89	0.81	41 079.45	9.99	277.85
	141	ISIDRO AYORA	487.47	205.33	0.42	2 542.23	5.22	17.20
	126	MILAGRO	405.49	7 357.84	18.15	91 098.93	224.66	616.18
	127	NARANJAL	1 732.07	17 649.03	10.19	218 516.17	126.16	1 478.00
	128	NARANJITO	224.83	1 091.61	4.86	13 515.43	60.11	91.42
	133	SALITRE	393.43	952.12	2.42	11 788.45	29.96	79.73
	134	SAN JACINTO DE YAGUACHI	509.45	3 467.24	6.81	42 928.63	84.27	290.36
	136	SIMÓN BOLÍVAR	291.60	3 879.43	13.30	48 032.03	164.72	324.88
	SUBTOTAL		11 790.69	57 678.10	103.88	714 124.06	1 286.18	4 830.19

LOS RÍOS	158	BABA	517.03	1 740.30	3.37	21 546.98	41.67	145.74
	157	BABAHOYO	1 086.77	3 057.29	2.81	37 852.88	34.83	256.03
	166	BUENA FE	581.27	3 937.73	6.77	48 753.85	83.87	329.76
	168	MOCACHE	567.99	5 760.95	10.14	71 327.42	125.58	482.44
	159	MONTALVO	363.22	2 820.45	7.77	34 920.53	96.14	236.20
	165	PALENQUE	579.59	1 694.01	2.92	20 973.91	36.19	141.86
	160	PUEBLOVIEJO	335.48	944.28	2.81	11 691.33	34.85	79.08
	161	QUEVEDO	304.64	2 501.40	8.21	30 970.32	101.66	209.48
	162	URDANETA	378.50	2 661.47	7.03	32 952.13	87.06	222.88
	167	VALENCIA	977.94	4 054.93	4.15	50 204.86	51.34	339.58
	163	VENTANAS	531.29	5 466.06	10.29	67 676.44	127.38	457.75
	164	VINCES	696.49	2 235.82	3.21	27 682.10	39.74	187.24
	SUBTOTAL		6 920.21	36 874.68	69.49	456 552.76	860.32	3 088.03
MANABÍ	171	BOLÍVAR	538.23	1 425.60	2.65	18 074.58	33.58	122.25
	172	CHONE	3 054.55	6 387.60	2.09	80 985.56	26.51	547.77
	173	EL CARMEN	1 266.83	1 345.50	1.06	16 658.89	13.15	112.68
	174	FLAVIO ALFARO	1 346.90	3 298.87	2.45	40 843.94	30.32	276.26
	176	JUNÍN	246.14	559.54	2.27	6 927.79	28.15	46.86
	186	PEDERNALES	1 904.18	717.71	0.38	8 886.17	4.67	60.10
	180	PICHINCHA	1 075.19	2 249.44	2.09	27 850.78	25.90	188.38
	170	PORTOVIEJO	961.78	562.52	0.58	6 964.73	7.24	47.11
	182	SANTA ANA	1 026.27	494.91	0.48	6 127.59	5.97	41.45
	183	SUCRE	676.71	487.79	0.72	6 039.44	8.92	40.85
	SUBTOTAL		12 096.78	17 529.50	14.78	219 359.46	184.42	1 483.70
ESMERALDAS	35	ATACAMES	508.27	212.80	0.42	2 634.74	5.18	17.82
	31	ELOY ALFARO	4 264.32	7 153.74	1.68	88 571.91	20.77	599.08

	30	ESMERALDAS	1 340.64	574.95	0.43	7 118.58	5.31	48.15
	32	MUISNE	1 239.45	449.37	0.36	5 563.68	4.49	37.63
	33	QUININDÉ	3 874.01	4 730.08	1.22	58 564.02	15.12	396.12
	36	RIOVERDE	1 507.38	369.66	0.25	4 576.86	3.04	30.96
	34	SAN LORENZO	3 019.45	1 324.73	0.44	16 401.74	5.43	110.94
	SUBTOTAL		15 753.51	14 815.33	4.79	183 431.54	59.34	1 240.69
EL ORO	222	ARENILLAS	806.13	690.05	0.86	8 543.61	10.60	57.79
	109	EL GUABO	603.39	1 186.91	1.97	14 695.35	24.35	99.40
	105	MACHALA	323.47	619.17	1.91	7 666.04	23.70	51.85
	111	PASAJE	455.94	2 542.37	5.58	31 477.61	69.04	212.91
	114	SANTA ROSA	810.67	1 194.29	1.47	14 786.73	18.24	100.01
	SUBTOTAL		2 999.60	6 232.78	11.79	77 169.34	145.93	521.96
COTOPAXI	14	LA MANÁ	657.16	1 773.77	2.70	21 961.37	33.42	148.54
	15	PANGUA	721.52	2 454.14	3.40	30 385.15	42.11	205.52
	16	PUJILÍ	1 300.43	825.79	0.64	10 224.28	7.86	69.16
	SUBTOTAL		2 679.10	5 053.69	6.74	62 570.80	83.39	423.22
PICHINCHA	58	PUERTO QUITO	694.70	3 378.83	4.86	41 833.99	60.22	282.96
	56	SAN MIGUEL DE LOS BANCOS	850.68	659.69	0.78	8 167.81	9.60	55.25
	SUBTOTAL		1 545.37	4 038.53	5.64	50 001.79	69.82	338.20
SANTO DOMINGO DE LOS TSÁCHILAS	83	LA CONCORDIA	324.28	538.45	1.66	6 666.65	20.56	45.09
	79	SANTO DOMINGO	3 446.15	3 465.13	1.01	42 902.51	12.45	290.18
	SUBTOTAL		3 770.43	4 003.58	2.67	49 569.16	33.01	335.28
BOLÍVAR	5	CALUMA	176.85	526.32	2.98	6 516.49	36.85	44.08
	1	CHILLANES	662.43	758.34	1.14	9 389.12	14.17	63.51
	3	ECHEANDÍA	230.61	582.73	2.53	7 214.86	31.29	48.80
	0	GUARANDA	1 891.84	432.47	0.23	5 354.52	2.83	36.22

	6	LAS NAVES	148.71	1 151.02	7.74	14 250.96	95.83	96.39
	SUBTOTAL		3 110.44	3 450.87	14.62	42 725.94	180.97	288.99
CAÑAR	100	CAÑAR	1 798.51	1 473.72	0.82	18 246.39	10.15	123.42
	101	LA TRONCAL	318.89	1 511.40	4.74	18 712.92	58.68	126.57
	SUBTOTAL		2 117.40	2 985.12	5.56	36 959.31	68.83	249.99
SUCUMBÍOS	73	CASCALES	1 252.38	181.57	0.14	2 248.11	1.80	15.21
	68	LAGO AGRIO	3 157.31	1 038.45	0.33	12 857.25	4.07	86.96
	71	SHUSHUFINDI	2 533.44	1 614.86	0.64	19 993.95	7.89	135.24
	SUBTOTAL		6 943.14	2 834.89	1.11	35 099.31	13.76	237.40
ORELLANA	77	LA JOYA DE LOS SACHAS	1 202.12	915.79	0.76	11 338.61	9.43	76.69
	78	LORETO	2 150.75	877.30	0.41	10 861.98	5.05	73.47
	75	FRANCISCO DE ORELLANA	7 079.47	366.02	0.05	4 531.79	0.64	30.65
	SUBTOTAL		10 432.35	2 159.11	1.22	26 732.38	15.12	180.81
NAPO	44	ARCHIDONA	3 028.15	329.20	0.11	4 075.85	1.35	27.57
	43	TENA	3 922.23	1 189.69	0.30	14 729.82	3.76	99.63
	SUBTOTAL		6 950.38	1 518.89	0.41	18 805.67	5.10	127.20
AZUAY	88	PUCARÁ	585.09	374.67	0.64	4 638.89	7.93	31.38
	SUBTOTAL		585.09	374.67	0.64	4 638.89	7.93	31.38
PASTAZA	51	ARAJUNO	8 864.29	348.03	0.04	4 309.07	0.49	29.15
	SUBTOTAL		8 864.29	348.03	0.04	4 309.07	0.49	29.15
ZAMORA CHINCHIPE	208	YANTZAZA	1 015.90	344.44	0.34	4 264.60	4.20	28.84
	SUBTOTAL		1 015.90	344.44	0.34	4 264.60	4.20	28.84

Anexo B. Cuantificación de Grados Brix y pH

Los grados Brix sirven para determinar el cociente total de materia seca (generalmente azúcares) disuelta en un líquido (INEN, 2008). La escala Brix se utiliza en el sector de alimentos para medir la cantidad aproximada de azúcares en zumos de fruta, vino o bebidas suaves, y en la industria azucarera. Dado que los azúcares como la sacarosa presentan actividad óptica, proporcional a su composición, se emplea la medida de la refracción como medio para determinarlo. Indica el número de sólidos disueltos en un líquido medido a través de su gravedad específica. Un grado Brix es 1 g de sacarosa en 100 g de solución ($1^{\circ}\text{Brix} = 1\%$ azúcar) (Jaywant et al., 2022).

La cuantificación de los grados Brix y del pH (INEN, 1983) se detalla a continuación:

pH

- Calibrar el pHmetro o potenciómetro usando patrones.
- Introducir los electrodos en la muestra y esperar a que la lectura se estabilice.
- Agitar la muestra y repetir la determinación.

$^{\circ}\text{Brix}$

- Colocar 2 o 3 gotas de la muestra en el prisma del refractómetro
- Cerrar la tapa suavemente.
- Observar a través de la mirilla y registrar el valor.

Anexo C. Cuantificación Acidez titulable

La titulación es un método de análisis químico cuantitativo utilizado para determinar la concentración desconocida de un reactivo a partir de un reactivo con concentración conocida (expresada en normalidad) (INEN, 2013b). En el caso de la acidez se emplea una reacción de neutralización, empleando un indicador o la medición potenciométrica para determinar el fin de la reacción y poder realizar la medición volumétrica. La palabra neutralización se puede interpretar como aniquilación o como eliminación, lo cual no está muy lejano a la realidad. Cuando un ácido se mezcla con una base, ambas especies reaccionan en diferentes grados que dependen en gran medida de las concentraciones, sus volúmenes y sus fuerzas iónicas.

La determinación de la acidez titulable se detalla a continuación:

- Medir de 5 mL de la muestra problema.
- Agregar 2 a 3 gotas de fenolftaleína como indicador.
- Titula con NaOH 0.1 N hasta el viraje del indicador (color rosado) o registrado mediante la determinación del pH en muestras coloreadas.
- Representar la concentración como ácido cítrico.

Anexo D. Determinación del Ácido Acético

Para la determinación del ácido acético se utiliza el método de titulación potenciométrica, utilizando una solución de NaOH 0.1 N como neutralizante y el resultado es expresado como ppm de ácido acético (ec. D.1) (INEN, 2012).

Para la determinación de la acidez por titulación se resume en la Figura D.1:

- Tomar una muestra de 8 mL.
- Centrifugar por 15 minutos, tomar el sobrenadante, desechar el sedimento y colocar el sobrenadante en un vaso de 100 mL y adicionar 50 mL de agua destilada.
- Medir el pH y colocar unas gotas de fenolftaleína como indicador.
- Titular con NaOH 0.1 N (el punto de viraje de la fenolftaleína se da en un pH=8.3).

$$\frac{mg}{L_{CH_3COOH}} = \frac{V * N * K * Meq_{CH_3COOH} * 1000 * 1000}{V_M}$$

ec. D.1. Concentración de ácido acético en meq/L.

- **V:** mL de NaOH consumido
- **N:** Normalidad de la solución de NaOH
- **K:** K de la solución de NaOH
- **E:** Equivalente químico del ácido acético
- **V_M:** mL de muestra problema

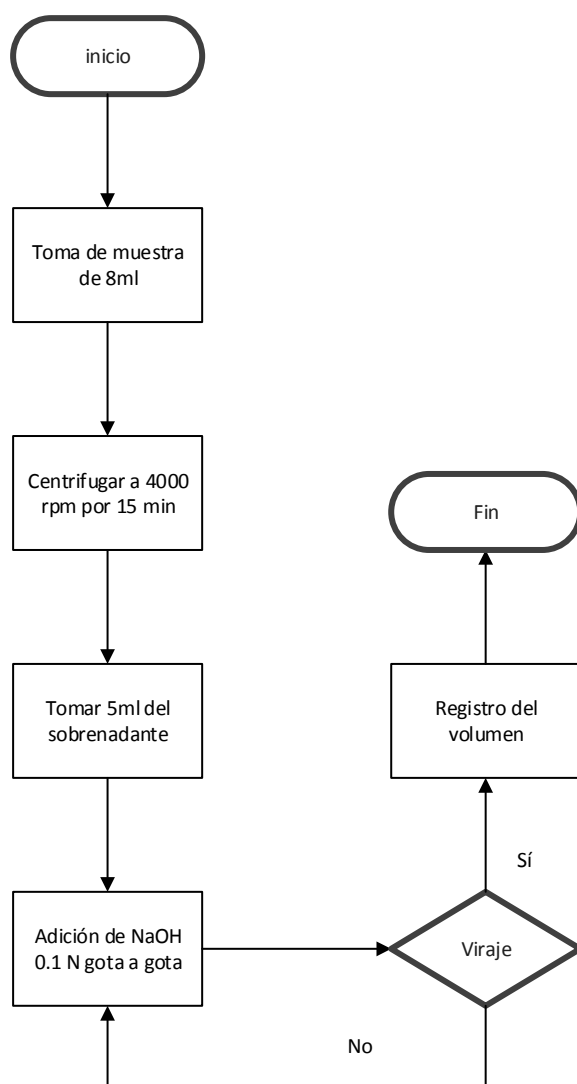


Figura D.1. Esquema de la titulación potenciométrica.

Anexo E. Espectrometría de absorción atómica para la cuantificación de sodio, potasio, calcio y mercurio

Se basa en la atomización del analito en matriz líquida y que utiliza comúnmente un nebulizador prequemador (o cámara de nebulización) para crear una niebla de la muestra y un quemador con forma de ranura que da una llama con una longitud de trayecto más larga. La niebla atómica queda desolvatada y expuesta a una energía a una determinada longitud de onda emitida, ya sea por la llama, o por una lámpara de cátodo hueco construida con el mismo analito a determinar o una lámpara de descarga sin electrodo (INEN, 2013a).

La temperatura de la llama es lo bastante alta como para llevar a los átomos de la muestra a su estado fundamental. La excitación de los átomos del analito se consigue con el uso de lámparas cuya emisión, es dirigida a través de la llama a diversas longitudes de onda para cada tipo de analito. La medida de luz absorbida después de pasar a través de la llama determina la cantidad de analito existente en la muestra. Hoy día se utiliza frecuentemente una mufla de grafito (u horno de grafito) para calentar la muestra a fin de desolvatarla y atomizarla, aumentando la sensibilidad.

La cuantificación de sodio, potasio y calcio se detalla a continuación:

- Tomar una muestra de 2 mL.
- Hacer la digestión de la muestra con 2 mL de ácido sulfúrico concentrado.
- Filtrar la muestra hasta que la prueba de cloruros sea negativa
- Aforar el filtrado a 100 mL.

Una vez que la muestra es tratada, es importante establecer cuál será el analito problema, ya que de este dependerá la rejilla, longitud de onda, y la curva de calibración que se debe construir. Para la generación de curvas de calibración se utilizaron los siguientes patrones:

- **Na:** 0.25-0.5-0.75-1-1.25 ppm + 5 mL de acomplexante de Calcio + 1 mL de *HCl*
- **Ca:** 1-2-3-4-5 ppm +1 mL de *KCl* al 10 % + 1 mL de *LaCl₃* al 10 %
- **K:** 0.25-0.5-0.75-1-1.25 ppm + 5 mL de acomplexante de Calcio + 1 mL de *HCl*

Finalmente, se mide la absorbancia utilizando en un espectrofotómetro Varian SpectrAA-110.

Anexo F. Espectroscopia FT-IR

La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) es un método instrumental basado en la medición de la vibración de una molécula excitada por la radiación infrarroja en un rango de número de onda específico (Santos et al., 2019). Se refiere a una gama de técnicas, en su mayoría basadas en espectroscopia de absorción sobre muestras sólidas, líquidas o gaseosas.

Un espectro de IR se puede visualizar en un gráfico de la absorbancia de luz infrarroja (o transmitancia) en el eje vertical en función de la frecuencia o la longitud de onda en el eje horizontal. Las unidades típicas de frecuencia utilizadas en los espectros IR son centímetros inversos [cm^{-1}] (Berthomieu & Hienerwadel, 2009).

La espectroscopia infrarroja mide vibraciones producidas por la radiación del espectro infrarrojo ($12\,800\text{--}10\,\text{cm}^{-1}$). Típicamente, se lo divide en: IR cercano (NIR): $12\,800\text{--}4\,000\,\text{cm}^{-1}$, IR medio: $4000\text{--}400\,\text{cm}^{-1}$; IR lejano: $400\text{--}10\,\text{cm}^{-1}$. Es una técnica no invasiva y requiere poco tratamiento previo de la muestra, aunque esté dirigida al análisis cuantitativo.

a. Determinación de azúcares reductores

Al igual que en otros métodos instrumentales, ya descritos, se requiere de la construcción de una curva de calibración en la que se utilizaron los siguientes patrones:

- **Patrones:** 50 g/L, 100 g/L, 200 g/L, 400 g/L y 500 g/L

Para desarrollar este método no es necesario realizar diluciones a la muestra.

b. Determinación de alcohol etílico

Primero se realizó la curva de calibración del alcohol etílico. Para ello se dispuso de etanol del 98.9 % de pureza, a partir del cual se preparó patrones de 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70 °GL, además de un blanco.

El alcohol diluido se cuantificó usando un espectrofotómetro infrarrojo (FT-IR, marca: *ThermoFisher Scientific*, Modelo: iS5, serie: ASB1504156), en la zona intermedia del espectro infrarrojo (NIR). Con este equipo se midió el porcentaje de absorbancia de los grupos-OH que presenta el etanol en una frecuencia de 3000-4000 cm^{-1} . La muestra no se somete a ningún tratamiento y la lectura se ejecuta de manera directa. La curva de calibración se representa en la Figura F.1.

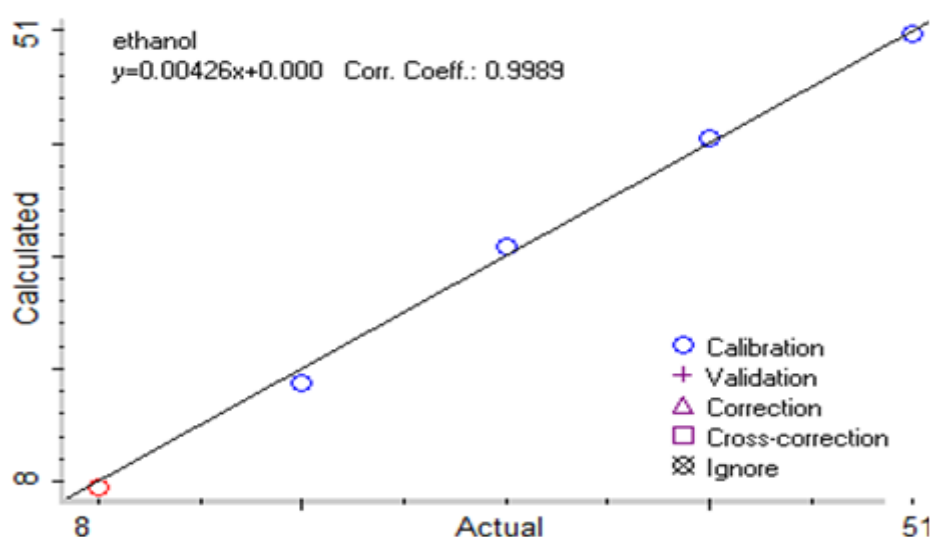


Figura F.1. Curva de calibración para etanol en el espectrofotómetro infrarrojo.

Anexo G. HPLC para determinación de azúcares

En la HPLC isocrática⁹ el compuesto pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria (un cilindro con un relleno específico) mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. La muestra es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que atraviesa por la columna. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El uso de presión incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro de la columna y reduce así su difusión dentro de la columna mejorando la resolución de la cromatografía. Los disolventes más utilizados son el agua, el metanol y el acetonitrilo. El agua puede contener compuestos que ayudan a la separación (Agblevor et al., 2007; Widmer, 2010).

El método de cromatografía líquida consta de los siguientes equipos y condiciones:

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución, marca JASCO, modelo CO-4061, con “loop” de inyección de 10 μ L
- Bomba cuaternaria JASCO PU 4180
- Detector IR-4030
- Fase estacionaria
 - Columna *Nucleogel sugar* 810 Ca
 - Tipo fase reversa
 - Longitud: 300 mm
 - Diámetro de partícula: 9 μ m
 - Diámetro interno: 7.8 mm
 - Temperatura: 85 °C

⁹ **Elución isocrática** es un término empleado en cromatografía cuando la fase móvil tiene una concentración constante. La concentración de la fase móvil es constante durante todo el proceso (Yam et al., 2012).

- Fase Móvil
 - Reservorio A (Agua: H₂SO₄ 0.1 % v/v)
 - Fase móvil 100 % a condiciones isocráticas

Las condiciones del método HPLC fueron las siguientes:

- Fase móvil (Agua: H₂SO₄ 0.1 % v/v)
- Flujo (0.5 mL/min)
- Temperatura (85 °C)
- Presión (7 MPa)
- Detección (RI)
- Volumen de inyección (10 µL)
- Columna para azúcares (*Nucleogel sugar* 810 Ca)

El procedimiento del método consta de los siguientes pasos:

- Filtrado de la muestra por papel *Whatman*
- Dilución de la muestra con una solución de ácido sulfúrico 0.1 % v/v (1:1)
- Filtrado mediante membrana 0.45 µm
- Análisis HPLC

Anexo H. Espectrofotometría UV-visible para la cuantificación de azúcares totales

La espectroscopia ultravioleta-visible o espectrofotometría ultravioleta-visible (UV/VIS) es una técnica espectroscópica que utiliza radiación electromagnética (luz) de las regiones visible, ultravioleta cercana (UV) e infrarroja cercana (NIR) del espectro electromagnético, es decir, una longitud de onda entre 380 nm y 780 nm. La radiación absorbida por las moléculas desde esta región del espectro provoca transiciones electrónicas que pueden ser cuantificadas. Dada la especificidad de esta transición, la espectroscopia UV-visible se emplea para identificar algunos grupos funcionales de moléculas, además, para determinar el contenido y fuerza de una sustancia. Se usa de manera general en la determinación cuantitativa en el rango de ppm de los componentes de soluciones de iones de metales de transición y compuestos orgánicos altamente conjugados (Hashimoto et al., 2001; Rashid et al., 2022). Para este análisis se empleó un espectrofotómetro Ciba-Corning 2800.

Entre muchos métodos colorimétricos para el análisis de carbohidratos, el **método fenol – ácido sulfúrico** es el método más fácil y confiable. Se emplea para medir azúcares neutros en oligosacáridos, proteoglicanos, glicoproteínas y glicolípidos. También se utiliza para medir el contenido total de azúcares en mezclas o muestras biológicas. Sin embargo, la reproducibilidad y, por lo tanto, la precisión del método depende de varios parámetros del proceso. Se han descrito varias modificaciones para aumentar la sensibilidad y reducir la variabilidad del ensayo hacia diferentes azúcares en mezclas (Masuko et al., 2005).

El método fenol-ácido sulfúrico consiste en los pasos descritos en la Figura H.1:

- Tomar 7 mL de muestra en tubos plásticos.
- Centrifugar la muestra a analizar durante 15 min a 4 000 rpm.
- Aislar el sobrenadante e inyectar a un tubo al vacío.

- Criogenizar las muestras en nitrógeno líquido y descongelar todas las muestras después de finalizado el experimento, para ejecutar su tratamiento y ensayo.
- Colocar en un tubo de ensayo: 2 mL de la solución de azúcares, 1 mL de fenol 5 % y 5 mL de H₂SO₄ concentrado (98 % de pureza).
- Dejar reposar por 10 minutos los tubos de ensayo y agitar por 30 segundos.
- Colocar los tubos de ensayo en un baño de agua fría durante 20 minutos.
- Medir la absorbancia en el espectrofotómetro a 490 nm.

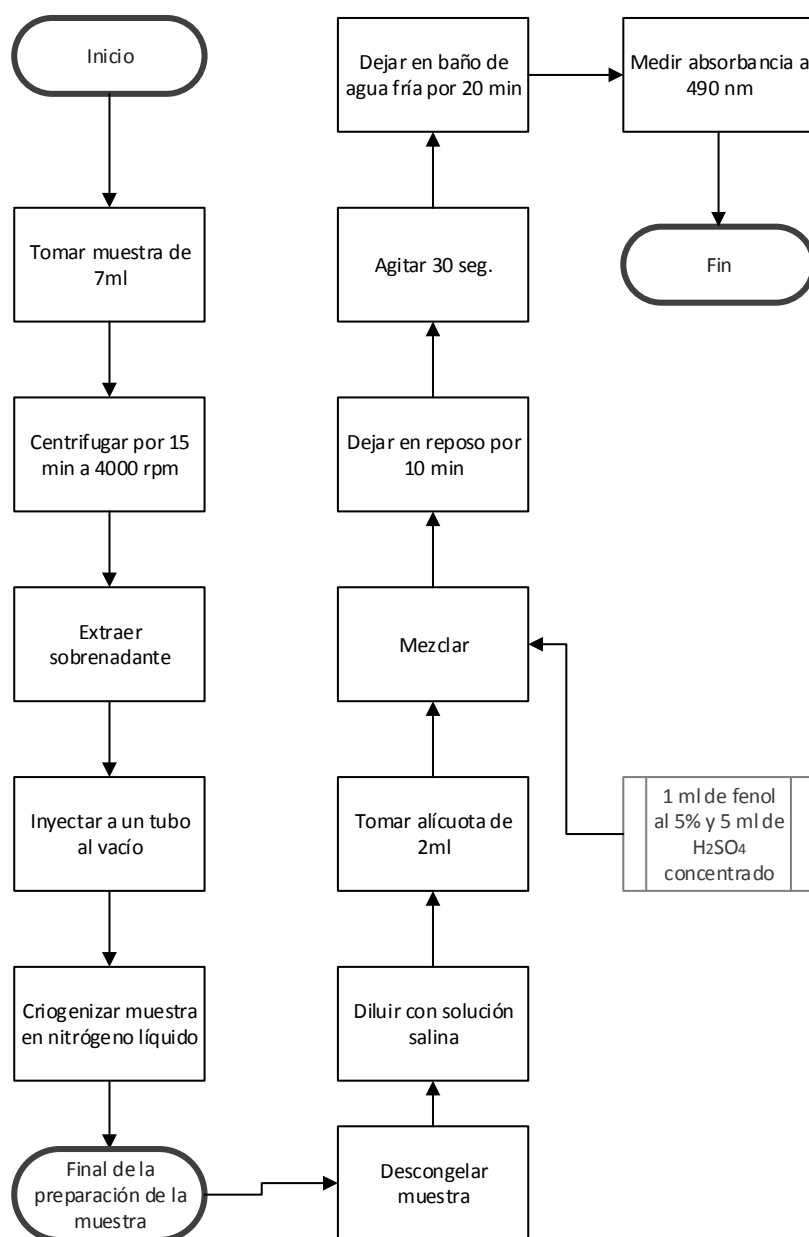


Figura H.1. Esquema del método Fenol-Ácido Sulfúrico.

Anexo I. Determinación de micronutrientes mediante detección de trazas por Espectrometría de Masas

Este método proporciona procedimientos para la determinación de elementos disueltos en aguas subterráneas, aguas superficiales y agua potable. Para el caso de residuos agrícolas se lo utiliza para la determinación de sustancias tóxicas y metales pesados provenientes de plaguicidas o pesticidas, fungicidas y herbicidas, así como otros aditivos agrícolas (Kita et al., 2022). Se puede usar para determinar las concentraciones de elementos recuperables totales en estas aguas, así como también para aguas residuales, lodos y muestras de suelos (Creed et al., 1994).

Una muestra acuosa o sólida, homogénea, bien mezclada, se pesa o mide con precisión. Los analitos se solubilizan primero a reflujo suave con ácidos nítrico y clorhídrico. Después de enfriar, la muestra se completa en volumen, se mezcla y se centrifuga o se deja reposar durante la noche antes del análisis. Para la determinación de analitos disueltos en una alícuota de muestra acuosa filtrada, o para la determinación total recuperable de analitos en “agua directa” donde la turbidez de la muestra es <1 NTU (*Nephelometric Turbidity Unit*). La muestra se prepara para su análisis mediante la adición apropiada de ácido nítrico, y luego se diluye a un volumen predeterminado y se mezcla antes del análisis.

El material de muestra en solución se introduce mediante nebulización neumática en un plasma de radiofrecuencia donde los procesos de transferencia de energía causan desolvatación, atomización y finalmente ionización. Los iones se extraen del plasma a través de una interfaz de vacío bombeada diferencialmente y se separan en función de su relación de carga másica mediante un espectrómetro de masas cuadrupolo que tiene una capacidad de resolución mínima de 1 uma de ancho a 5 % de altura de pico. Los iones transmitidos a través del cuadrupolo son detectados por un multiplicador de electrones o detector de Faraday. La información de iones es procesada por un sistema de manejo de datos.

La determinación de micronutrientes mediante detección de trazas por Espectrometría de Masas aplicando se detalla a continuación:

- Para la determinación de analitos disueltos, pipetear una alícuota (≥ 20 mL) de la muestra filtrada y conservada en ácido en un tubo de centrifuga de polipropileno de 50 mL. Agregar un volumen apropiado de (1 + 1) ácido nítrico para ajustar la concentración de ácido de la parte alícuota para aproximarse a una solución de ácido nítrico al 1 % (v/v) (por ejemplo, agregar 0.4 mL (1 + 1) de HNO_3 a una parte alícuota de 20 mL de muestra). En caso de utilizar el procedimiento de adición directa, agregar estándares internos, tapar el tubo y mezclar.
- Para el “análisis directo” de los analitos recuperables totales en muestras de agua potable con turbidez <1 NTU, tratar una muestra alícuota conservada en ácido sin filtrar.
- Para la determinación de los analitos recuperables totales en muestras acuosas (que no sean agua potable con <1 NTU de turbidez), transferir una alícuota de 100 mL (± 1 mL) de una muestra a un vaso de precipitados de Griffin de 250 mL.
- Agregar 2 mL de ácido nítrico (1 + 1) y 1.0 mL de ácido clorhídrico (1 + 1) al vaso que contiene el volumen medido de la muestra. Colocar el vaso de precipitados en una placa caliente para la evaporación de la solución. La placa caliente debe ubicarse en una campana extractora de vapores y ajustarse previamente para proporcionar evaporación a una temperatura de aproximadamente pero no superior a 85 °C.

Anexo J. Determinación del Carbono orgánico total

El carbono orgánico se mide utilizando un analizador de carbono, donde el carbono orgánico en la muestra se convierte en dióxido de carbono (CO_2) por combustión catalítica u oxidación química húmeda (Schumacher, 2002). El CO_2 formado se mide directamente mediante un detector infrarrojo o convertido en metano (CH_4) por un detector de ionización de llama, medidas que son directamente proporcionales a la concentración de carbono (EPA, 1974).

Los analizadores carbonáceos pueden medir todas las formas de carbono en la muestra. Sin embargo, debido a las diversas propiedades de los compuestos que contienen carbono en muestras líquidas, su tratamiento preliminar y la configuración del instrumento determinarán qué las formas de carbono son realmente medidas:

- Carbono orgánico no volátil soluble (azúcares)
- Carbono orgánico volátil soluble (mercaptanos, alcanos, alcoholes de bajo peso molecular)
- Carbono insoluble, parcialmente volátil (aceites de bajo peso molecular)
- Materiales carbonosos insolubles en partículas (fibras de celulosa)
- Materiales carbonosos solubles o insolubles adsorbidos o atrapados en materia suspendida inorgánica (materia oleosa)

El carbonato y el bicarbonato son formas inorgánicas de carbono y deben separarse del valor del carbono orgánico total. Dependiendo de las instrucciones del fabricante del instrumento, esta separación se puede lograr mediante una simple resta matemática, o retirando el carbonato y bicarbonato mediante la conversión a CO_2 con desgasificación previo al análisis. La cuantificación del carbono orgánico total mediante el método EPA 415.1 se detalla a continuación:

- Homogeneizar la muestra.
- Bajar el pH de la muestra a 2.
- Purgar la muestra con nitrógeno durante 10 min.
- Calibrar el equipo con estándares que abarquen el rango de concentración esperado.

Para evitar resultados erróneos, se debe tener en cuenta el carbono inorgánico. El método preferido es medir el carbono total y el carbono inorgánico y obtener el carbono orgánico por la correspondiente diferencia.

Anexo K. Determinación de nitritos

Existen diversos métodos para la determinación de nitritos, cada uno presenta sus ventajas y desventajas (Q. Wang et al., 2017). El método de determinación utilizando sulfato de brucina es aplicable al análisis de bebidas, agua salada, agua superficial, agua proveniente de residuos domésticos e industriales (EPA, 1971). La modificación se puede hacer para eliminar o corregir la turbidez, el color, la salinidad o los compuestos orgánicos disueltos en la muestra. El rango de concentración aplicable es de 0.1 a 2 mg NO_2 /litro. Este método se basa en la reacción del ion nitrato con sulfato de brucina en una solución de H_2SO_4 a una temperatura de 100 °C. El complejo coloreado se mide a 410 nm. El control de temperatura de la reacción de color es extremadamente crítico (EPA, 1971).

La cuantificación de nitritos se detalla a continuación:

- Ajustar el pH de las muestras a un valor cercano a 7 con ácido acético o hidróxido de sodio. Es caso de ser necesario, filtrar para eliminar la turbidez.
- Pipetear 10 mL de muestra y estándares.
- Pipetear 10 mL de solución de ácido sulfúrico al 5 % en cada tubo y mezclar permitiendo que los tubos alcancen el equilibrio térmico en el baño frío.
- Agregar 0.5 mL de reactivo de ácido brucina-sulfanílico a cada tubo (excepto el tubo de control de interferencia) y mezcle cuidadosamente girando, luego coloque el estante de tubos en el baño de agua a 100 °C durante exactamente 25 minutos.
- Determinar la absorbancia a 410 nm.

Anexo L. Determinación de nitrógeno de amoníaco

Este método es aplicable al análisis de bebidas, agua salada, agua superficial, agua proveniente de residuos domésticos e industriales. El rango aplicable es 0.01 - 2 mg/L NH_3 como N. Se pueden alcanzar concentraciones más altas determinadas por dilución de la muestra. La muestra se tampona a un pH de 9.5 con un tampón de borato para disminuir la hidrólisis de cianatos y compuestos orgánicos de nitrógeno, y se destila en una solución de ácido bórico. El fenol alcalino y el hipoclorito reaccionan con el amoníaco para formar indofenol azul que es proporcional a la concentración de amoníaco. El color azul formado se intensifica con nitroprusiato de sodio y se mide colorimétricamente (EPA, 1971).

La cuantificación de amoníaco mediante el método EPA 352.1 se detalla a continuación:

- **Preparación del equipo:** agregar 500 mL de agua desionizada al matraz de 800 mL.
- **Kjeldahl matraz.** La adición de chips de ebullición que han sido tratados previamente con NaOH diluido evitará los golpes. Vaporizar muestra dentro del aparato de destilación hasta que el destilado no muestre rastro de amoníaco.
- **Preparación de la muestra:** eliminar el cloro residual de la muestra agregando agente decolorante equivalente al cloro residual. A 400 mL de muestra agregar 1 N NaOH, hasta que el pH sea 9.5, verificar el pH durante la adición con un medidor de pH o mediante el uso de un papel de pH de corto alcance.
- **Destilación:** transferir la muestra, cuyo pH se ha ajustado a 9.5, a un matraz Kjeldahl de 800 mL y agregue 25 mL del tampón de borato. Destilar 300 mL a la velocidad de 6-10 mL/min. en 50 mL de ácido bórico al 2 % contenido en un matraz Erlenmeyer de 500 mL.

Anexo M. Poder calorífico por bomba calorimétrica

Una bomba calorimétrica es un tipo de calorímetro de volumen constante usado para medir el calor de combustión de una reacción particular. Los calorímetros de bomba deben soportar la gran presión dentro del calorímetro mientras se mide la reacción. A medida que se quema el combustible, calentará el aire circundante, que se expande y escapa a través de un tubo que conduce al aire fuera del calorímetro. Cuando el aire se escapa a través del tubo de cobre, también calentará el agua fuera del tubo. El cambio en la temperatura del agua permite calcular el contenido calórico. Requiriendo múltiples repeticiones para obtener un resultado fiable (Ioelovich, 2017; Pal et al., 2020).

La determinación del poder calorífico se realizó de la siguiente manera:

- Colocar la muestra a ser analizada en el crisol.
- Colocar a la muestra en contacto con la mecha en la cámara de combustión.
- Sellar la cámara de combustión y alimentar con oxígeno.
- Colocar correctamente la cámara con la muestra en el equipo.
- Colocar 2 litros de agua destilada con 2 mL de sulfato de cobre en el reservorio.

Los resultados del análisis realizado en un laboratorio externo se presentan en la Figura M.1.



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
LABORATORIO DE FÍSICO QUÍMICA

INFORME DE RESULTADOS

Cliente: ING. JORGE DELGADO
Atención: ING. JORGE DELGADO
Teléfono: 0999781140
email: jorge.delgado@ucuenca.edu.ec

RESULTADOS

Muestra 1 : Mucilago de cacao (OC VC y 3B)
Fecha de recibido: 21 de Junio del 2018
Fecha de análisis: 22 de Junio del 2018

Parámetro	Método	Resultado	Unidades
Poder Calorífico	Bomba Calorimétrica IKA C 200	13.852	J/g

Condiciones del análisis: Peso muestra= 0,4533 g.
Temperatura inicial del sistema: 20,6189 °C

RESULTADO: Trece mil ochocientos cincuenta y dos jouls/gramo.

Nota: Se realizó el análisis por duplicado por ser la primera vez que se trata este tipo de muestra.

Ing. Alexandra Criollo A.
Analista Laboratorio Físicoquímica

Cuenca, 23 de Junio del 2018

Figura M.1. Resultado del análisis del poder calorífico del mucílago.

Anexo N. Determinación de la concentración peso/volumen de etanol [g/L]

Existen diversos métodos que utilizan pequeñas cantidades de muestra y tiene como fundamento la volatilidad del alcohol y su poder para reducir los agentes oxidantes (Noriega-Medrano et al., 2016). El método *Winnick* aplica las unidades Conway siendo esencialmente el principio empleado el de la evaporación de la muestra en el compartimento exterior y la absorción del alcohol en el compartimento central por medio de dicromato y ácido sulfúrico. El exceso de dicromato se determina finalmente yodométricamente (Arévalo et al., 2004). Se debe aplicar calor para asegurar una rápida absorción, lo que a su vez requiere el uso de un fijador especial (Sunshine & Nenad, 1953).

- Colocar en la cámara A de la caja bipetri, 4 mL de la muestra previamente diluida (1:100).
- Agregar 4 mL de una solución de K_2CO_3 al 20 % a la cámara A de la caja bipetri.
- Colocar en la cámara B de la caja bipetri, 2 mL de solución $K_2Cr_2O_7$ 0,4 N en solución de H_2SO_4 10 N.
- Cerrar la caja bipetri herméticamente y distribuir los reactivos dentro de las cámaras con movimientos suaves.
- Colocar en el secador las cajas a una temperatura de 50 °C durante 2 horas.
- Si la coloración en la cámara B es de coloración verde, verde azulado o amarillo ocre se debe efectuar una titulación, caso contrario, si presenta una coloración azul se descarta y se procede a realizar una nueva dilución.
- Agregar 2 mL de KI 3N y 3 gotas de una solución de almidón de 5 g/L, agitando la mezcla con una varilla.
- Titular con una solución de $Na_2S_2O_3$ 0.1 N hasta viraje amarillo-naranja a verde-azul (Figura N.1).

Para calcular la concentración del etanol obtenido en el experimento se encuentra con la diferencia entre el volumen de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ consumido en la titulación de la muestra control (blanco) y la muestra problema, multiplicado por la normalidad del titulante y el factor de corrección (11.51). El valor de la concentración en gramos/litro se determina con la ec. N.1.

$$Etanol = \frac{N * (V_b - V_m)}{VM} * 11.51$$

ec. N.1. Concentración de alcohol en g/L.

- **N:** Normalidad del $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$
- **V_b :** mL de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ consumido en la titulación del blanco
- **V_m :** mL de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ consumido en la titulación de la muestra
- **VM:** Volumen de la muestra. (mL)
- **11.51:** Peso molecular del etanol/4 (reacción Redox)

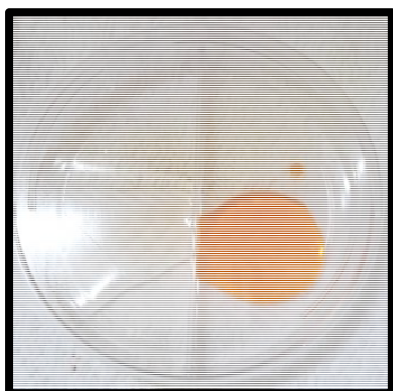


Figura N.1. Ejemplo de viraje en la titulación con tiosulfato.

Anexo O. Cuantificación de biomasa mediante liofilización

La liofilización es un método para eliminar el agua por sublimación de cristales de hielo del material congelado (Beena et al., 2014). Este proceso tiene como primer paso congelar la muestra y posteriormente someter a alto vacío, por lo que el hielo del agua se sublima (evaporación directa, sin fundirse). El vapor de agua que se libera generalmente se atrapa en la superficie de un condensador a bajas temperaturas. La sublimación es la transición directa entre el estado sólido al estado gaseoso sin fusión, ocurre en un rango definido de temperaturas y presiones dependiendo de la muestra analizada. El producto seco obtenido por esta técnica suele alcanzar humedades menores al 4 %, sin pérdidas significativas de proteínas o lípidos (Santo et al., 2013)

La sublimación consta de dos etapas: una de enfriamiento y otra de calentamiento al vacío. El enfriamiento se produjo en un rango de temperatura de -35 °C a -30 °C, para ello se tomó una muestra de 5 mL, que fue sometido a 10 minutos de centrifugación a 400 rpm. Durante la etapa de calentamiento se alcanzaron 25 °C, aumentando el vacío de 0.2 mbar a 0.030 mbar durante otras 24 horas.

Anexo P. Conteo de levaduras

Para esta detección se requiere diluir la muestra y acondicionarla, mediante la adición de nutrientes que estimulen el crecimiento de las levaduras (Hong et al., 2013). Para esto, se pesaron 25 gramos de muestra que fueron agregados a 225 mL de una solución de peptona al 0.1 %. De la que se obtuvo una alícuota de 1 mL que fue sometida seis veces a una dilución 1:10 (Figura P.1).

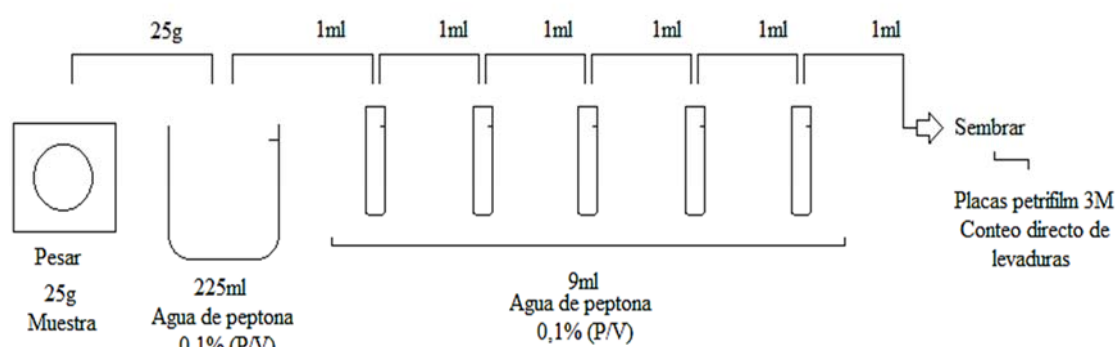


Figura P.1. Dilución de la muestra para la cuantificación de levaduras.

Para la cuantificación de levaduras se utilizó placas de conteo directo petrifilm 3M (Figura P.2) para levaduras. El proceso se resume en la Figura P.3.

- Colocar la placa en una superficie plana y nivelada.
- Con un pipetor calibrar 1 mL colocándolo perpendicularmente 1 mL de la muestra en el centro de la película cuadrículada inferior.
- Con una barra cruzada para mohos y levaduras, colocar sobre la película superior, presionándola suavemente para distribuir la muestra.
- Dejar en reposo por un minuto para que el gel se solidifique. Luego las placas se incuban a 25 °C por 5 días.

Para obtener el resultado de la cuantificación de levadura real se multiplica por el factor de dilución, el mismo que es por 1×10^5 . Mediante este método se contabiliza la cantidad de unidades propagadoras de colonias por mL de muestra (UPC) durante la fermentación alcohólica.

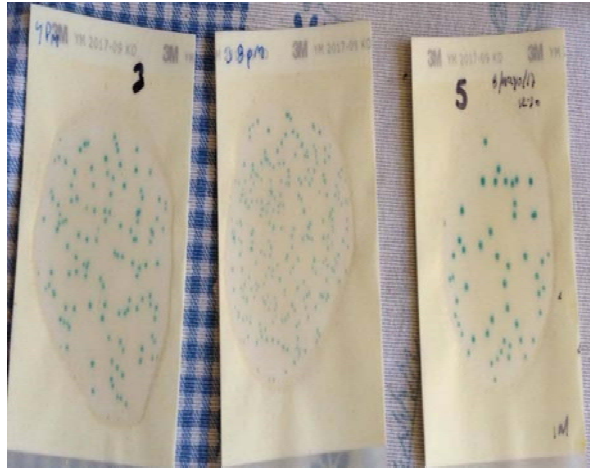


Figura P.2. Ejemplo de una petrifilm, donde puede observarse el crecimiento de las levaduras

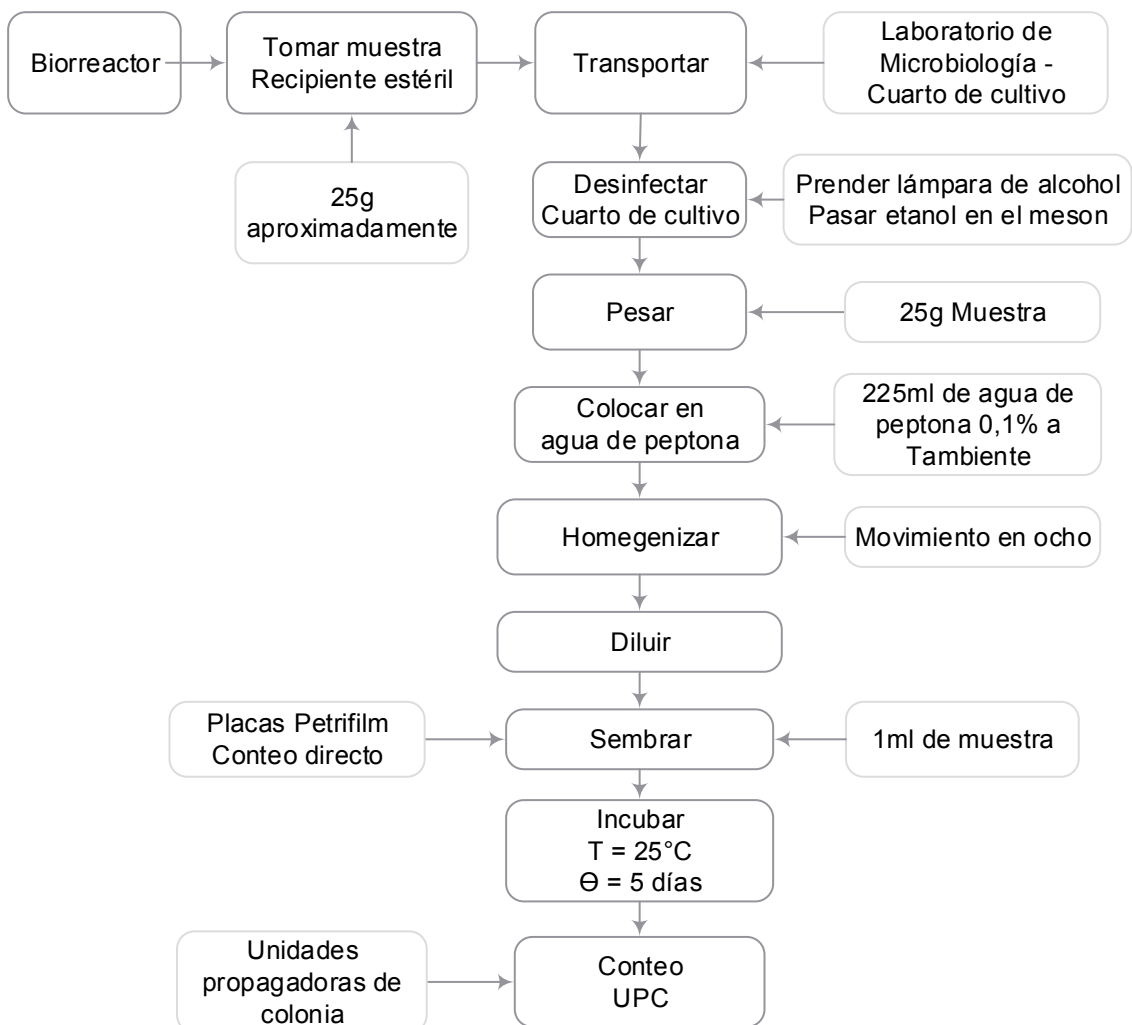


Figura P.3. Método para cuantificar levaduras. Conteo directo de levaduras.

Anexo Q. Artículo sobre el modelado de la obtención de etanol

Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers 000 (2021) 1–7



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jtice

Kinetic modeling of batch bioethanol production from CCN-51 Cocoa Mucilage

Jorge Delgado-Noboa^{a,*}, Tamara Bernal^a, Jaime Soler^b, José Ángel Peña^b^a Department of Applied Chemistry and Systems of Production, Faculty of Chemical Sciences, Universidad de Cuenca, Cuenca Ecuador^b Catalysis, Molecular Separations and Reactor Engineering Group (CREG), Aragon Institute of Engineering Research (I3A), Universidad Zaragoza, Zaragoza Spain

ARTICLE INFO

Article History:

Received 6 May 2021

Revised 23 July 2021

Accepted 27 August 2021

Available online xxx

Keywords:

Alcoholic fermentation

kinetic models

Cocoa mucilage

Saccharomyces cerevisiae

ABSTRACT

Background: The aim of this study was the production of bioethanol generated during the fermentation of CCN-51 Cocoa mucilage with *Saccharomyces cerevisiae* yeast and the fitting of experimental data to the mathematical models: Logistic, modified Gompertz, and Andrews and Levenspiel. There are limited studies regarding the high energy potential of cocoa mucilage from Ecuador for bioethanol production as a gasoline additive. Currently, this by-product of the cocoa industry is considered as waste.

Methods: Discontinuous fermentation was performed in a batch bioreactor under different conditions of pH, temperature and yeast concentration. During the reaction, bioethanol concentration, yeast and consumed substrate were evaluated by means of microdiffusion, dry weight by lyophilization and UV spectrophotometry, respectively.

Significant Findings: The result of the final bioethanol concentration was 25.41 g/L at a temperature of 35 °C, pH of 4 and yeast concentration of 3 g/L. The models were fitted with determination coefficients greater than 0.9. From the results, the logistic model was used to describe yeast growth. Modified Gompertz model is considered appropriate for modeling bioethanol production. Both models fit the data adequately; however, Andrews and Levenspiel model, besides of the good adjustment, considered inhibition terms of the substrate and product.

© 2021 Taiwan Institute of Chemical Engineers. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Introduction

The use of primary fossil energy sources has been the driving force behind economic development and welfare of nations, and continues to be so, such that in 2018 they represented around 81% of the world's primary energy production, with a contribution of 31% of oil, 27% of carbon and 23% of natural gas [1]. However, the exploitation and intensive use of primary fossil energy sources has several disadvantages, among them, the certainty of its depletion in the medium-term and its important contribution to greenhouse gases emission which are causing significant environmental and climate imbalances in all areas [2]. In this sense, due to the changing world energy market and growing environmental concerns, alternative fuels such as biofuels represent perhaps the most attractive alternative, both due to their ability to substitute fossil fuels and their possibility for generating new markets for agricultural producers and for the valorization of biomass residues, of different origin, used in their production [3].

Most widely used liquid biofuels are biodiesel and bioethanol. Since these oxygenated additives are used for increasing the octane number of the fuel and reduce emissions (i.e., circular economy),

they present an increase in power output [4,5]. In the case of liquid biofuels, bioethanol is the main vector because it represents 67% of the world production of biofuels, with an increase of 3.8% compared to 2016 [6], which is fully intended to the transport sector to use it alone or mixed with gasoline in different proportions. By these means, bioethanol has received much attention as a possible replacement for fossil fuels [7]. Bioethanol production processes vary significantly according to the type of residual biomass, its availability and its sugar content [8]. For these reasons, agricultural wealth provides renewable sources of high potential for energy use, such as African palm, banana, rice, and cocoa.

In the specific case of cocoa, Ecuador plays an important role in the world market in terms of volume and quality, since it is the largest fine cocoa producer, generating around 65% of the global supply [9], with one of the main residues being its mucilaginous pulp which contains sap cells rich in sugars capable of fermentation without modifications, transforming sugar into alcohol. The total volume of exudate is substantial, but to date, no suitable use has been found at an industrial level [10]. With a growing interest in industrial fermentation applications, mathematical modeling has been developed as a tool to help predicting and making decisions [11,12], reduce process expenses and avoid superfluous experimentation.

* Corresponding Author

E-mail address: jorge.delgado@ucuenca.edu.ec (J. Delgado-Noboa).<https://doi.org/10.1016/j.jtice.2021.08.040>

1876-1070/© 2021 Taiwan Institute of Chemical Engineers. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

In microbial growth, logistic model describes the changes in the number of organisms that appear from the initial to the maximum yeast concentration. However, this model does not consider substrate inhibition [13]. Modified Gompertz model is frequently used to describe bioethanol production during fermentation [7]. Andrews and Levenspiel model is a kinetic model proposed to represent the specific growth rate (μ) contemplating the mixed inhibition phenomenon. Andrews model was proposed in 1968 and it considers a substrate inhibition constant (K_{IS}) in a culture in an stirred tank reactor [14]; while Levenspiel model was proposed in 1980 and it considers the phenomenon of inhibition by product (α) [15]. However, during bioethanol fermentation, the leading inhibitory factors are high concentrations of sugar and bioethanol. Both agents affect yeast growth in a non-competitive inhibitory manner, so a model by Andrews and Levenspiel which includes terms for substrate and product inhibition, turns out to be a particularly suitable model.

The aim of this research was to study the possibility of using cocoa residues for bioethanol production by means of current technologies and the application of kinetic models to predict and control alcoholic fermentation, using *Saccharomyces cerevisiae* yeast. This research represents a step towards industrial-scale production, since it defines kinetic parameters [16] that will allow subsequent scaling to meet the energy demands of the countries in which cocoa-derived waste is generated.

Materials and Methods

Collection and Extraction of Cocoa Mucilage

CCN-51 cocoa mucilage, a residue of the growing cocoa industry, currently does not have a beneficial and cost-effective use. It belongs to geographical area number 6 of Ecuador, corresponding to Azuay, Cañar and Morona Santiago provinces. This variety was chosen due to its higher productivity. Cocoa was transferred from the cultivation land to University of Cuenca laboratories and underwent pretreatment processes such as those described by [17], the most important steps being harvesting, cutting, separation and softening to separate the mucilaginous pulp from the rest of its components. Subsequently, it was pasteurized at 88 °C for 5 minutes and stored at -18 °C [18].

Experimental design

The experimental design matrix used in this study corresponds to a two-level full factorial design 2^3 , a maximum and a minimum. The variables considered were temperature, pH and *Saccharomyces cerevisiae* yeast concentration [19] (Table 1) due to their importance in fermentation reactions [20].

During the experimental design the software STATGRAPHICS® Centurion XV was used.

Substrate and microorganism

The cocoa mucilage is a liquid, viscous, whitish pulp, with a sweet and acid flavor that covers the beans of the fruit, it is mainly composed of cellulosic polysaccharides, gums and pectins. The fermentation volume is 80% of the total capacity of the fermenter under

anaerobic conditions and the microorganism used is *Saccharomyces cerevisiae*, a commercial baker's yeast [21].

Alcoholic Fermentation

Alcoholic fermentation was carried out under the described operating conditions, in a homogenous 2-liter Biotron GX batch bioreactor, with a fermentation volume of 1.6 L and a stirring of 200 rpm to ensure homogeneity in the reaction mass and under anaerobic conditions. The experiment took between 30 to 96 hours, depending on the operating parameters.

Bioethanol Quantification

For the bioethanol quantification, the microdiffusion method was used; an alternative non-chromatographic method which uses a Conway chamber that allows determining substances susceptible to volatilization and the attachment to the appropriate medium to be quantified [22]. The chamber must be hermetically sealed and consists in two compartments. One of them contains the alcohol, which due to its high vapor pressure and the test temperature, volatilizes towards the second chamber. Ethanol oxidation to acetic acid occurs due to the presence of potassium dichromate dissolved in sulfuric acid; the excess of dichromate that remains unreacted is measured by the reaction with potassium iodide to form iodine, which is titrated with sodium thiosulfate in the presence of starch as an indicator.

Sugar Quantification

The phenol-sulfuric acid method allows quantifying several sugars such as polysaccharides, oligosaccharides, monosaccharides and their derivatives. Carbohydrates are generally sensitive to high temperatures and strong acids [7].

The yellow-orange color of the complexes formed by the reaction with phenol in concentrated sulfuric acid is very stable up to 24 hours. Color intensity is proportional to carbohydrate concentration and is measured by absorbance at wavelengths ranging from 488 nm to 492 nm. The samples were quantified in triplicate on a Ciba-Corning 2800 spectra scan UV and visible light spectrophotometer, at a wavelength of 490 nm, previously carrying out the calibration curves.

Yeast Quantification

Yeast content was determined by a direct counting method [23,24]. Dry cell weights were determined by lyophilization drying. The centrifuged samples were stored in liquid nitrogen at -190 °C to avoid degradation reactions. When the experimental process concluded, the samples were lyophilized in an Armfield FT 33 lyophilizer, remaining in it for 48 hours. Freezing was carried out in the first 24 hours and drying in the following 24 hours [25].

Mathematic Models

The experimental results obtained were adjusted to different mathematic models using a Levenberg-Marquardt nonlinear least squares method programmed in MATLAB® [7]. For the cases that required solving the differential models, a third-order Runge-Kutta method (ODE23) was used [24,26].

The integrated logistic equation (eq.1) was used to model the fermentation process and determine the maximum specific growth rate (μ_{max}), fitting the experimental data corresponding to the optimal operating conditions.

$$X = \frac{X_0 \cdot \exp(\mu_{max} \cdot t)}{1 - \left(\frac{X_0}{X_{max}} \right) \cdot (1 - \exp(\mu_{max} \cdot t))} \quad (1)$$

Table 1
Variables and levels for the experimental design.

Factor	Variable	Values	
		Minimum (-)	Maximum (+)
Temperature [°C]	X ₁	25	35
pH [dimensionless]	X ₂	4	5
Yeast concentration [g/L]	X ₃	1	3

where:

X : Yeast concentration at time t [g/L]
 X_0 : Initial yeast concentration [g/L]
 X_{max} : Maximum yeast concentration [g/L]
 μ_{max} : Maximum specific growth rate [h^{-1}]
 t : Fermentation time [h]

Modified Gompertz equation (eq.2) was used to model the fermentation process and determine the maximum bioethanol production rate (r_{pm}), fitting the experimental data corresponding to the optimal operating conditions.

$$P_E = P_{E\max} \cdot \exp\left\{-\exp\left[\frac{r_{pm} \cdot \exp(1)}{P_{E\max}} \cdot (t_l - t) + 1\right]\right\} \quad (2)$$

where: r_{pm} : Maximum bioethanol production rate [g/(L·h)]

P_E : Bioethanol concentration at time t [g/L]
 $P_{E\max}$: Maximum bioethanol concentration [g/L]
 t : Fermentation time [h]
 t_l : Lag phase [h]

The Andrews and Levenspiel model (eq.3) was used to determine different kinetic parameters, adjusting the experimental data corresponding to the optimal operating conditions. The precision of the models was evaluated based on their determination coefficients (R^2).

During fermentation, the main inhibitory factors are high sugar and bioethanol concentrations. Both agents affect yeast growth in an inhibitory non-competitive way. A model that includes terms for substrate and product inhibition is the Andrews and Levenspiel model (eqn 3). Bioethanol is a primary metabolite of yeast growth under anaerobic conditions and its formation is associated with cell growth. Using the same philosophy based on the Andrews and Levenspiel equation, a product formation model is considered as evidence in (eq.4).

$$\mu = \left(\frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_S}}\right) \cdot \left(1 - \frac{P_E}{P_{E\max}}\right)^\alpha \quad (3)$$

$$q_E = \left(\frac{q_{\max} \cdot S}{K_{SE} + S + \frac{S^2}{K_E}}\right) \cdot \left(1 - \frac{P_E}{P_{E\max}}\right)^\beta \quad (4)$$

where:

μ : Specific growth rate at time t [h^{-1}]
 μ_{max} : Maximum specific growth rate [h^{-1}]
 S : Sugar concentration at time t [g/L]
 K_S : Monod constant for growth [g/L]
 K_{IS} : Substrate inhibition constant for growth [g/L]
 P_{Xmax} : Maximum bioethanol concentration for yeast growth [g/L]
 X : Yeast concentration at time t [g/L]

q_{max} : Maximum specific bioethanol production rate [g/(g·h)]
 q_E : Specific bioethanol production rate [g/(g·h)]
 K_{SE} : Bioethanol saturation constant [g/L]
 K_{IS} : Substrate inhibition constant for growth [g/L]
 K_{IE} : Substrate inhibition constant for bioethanol formation [g/L]
 $Y_{X/S}$: Yeast yield [$g_{\text{yeast}}/g_{\text{sugar}}$]
 $Y_{E/S}$: Bioethanol yield [$g_{\text{ethanol}}/g_{\text{sugar}}$]
 m : Cell maintenance coefficient [h^{-1}]
 P_E : Bioethanol concentration [g/L]
 $P_{E\max}$: Maximum bioethanol concentration for alcoholic fermentation [g/L]
 α, β : Bioethanol inhibition constant [g/L]
 t : Fermentation time [h]

Equation (eq.5) was used to describe yeast growth rate and (eq.6) to describe product formation rate.

$$\frac{dX}{dt} = X \left(\frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_S}} \right) \left(1 - \frac{P_E}{P_{E\max}} \right)^\alpha \quad (5)$$

$$\frac{dP_E}{dt} = X \left(\frac{q_{\max} \cdot S}{K_{SE} + S + \frac{S^2}{K_E}} \right) \left(1 - \frac{P_E}{P_{E\max}} \right)^\beta \quad (6)$$

In batch fermentation, substrate (sugars from cocoa mucilage) is used for cell growth and maintenance, as well as for bioethanol production. The substrate utilization rate was described by equation (eq.7).

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \left(\frac{dX}{dt} \right) + \frac{1}{Y_{E/S}} \cdot \left(\frac{dP_E}{dt} \right) + m \cdot X \quad (7)$$

Finally, productivity of each experiment is calculated with the maximum value of bioethanol concentration and the time to reach that concentration. It is described by equation (eq.8).

$$Productivity = \frac{\text{Maximum Bioethanol Concentration}}{\text{Time to achieve Maximum Bioethanol Concentration}} = \frac{\left[\frac{g}{L}\right]}{[h]} \quad (8)$$

Results and Discussion

The 2^k experimental design allowed to establish the best bioreactor operating conditions considering temperature, pH and yeast concentration to obtain the highest bioethanol concentration. These variables were selected due to their relevance in fermentative processes, both for yeast development and for control during fermentations. Moreover, for the higher productivity experiment, substrate and yeast concentration was evaluated throughout the fermentation.

Table 2
Experimental results of concentration, time and productivity of bioethanol in CCN-51 cocoa mucilage fermentative processes for three operating parameters.

Experiment	Operating Parameters			$P_{E^{**}}$ [g/L]	Time to maximum bioethanol concentration [h]	Process productivity [g/(L · h)]
	Temperature [°C]	pH	X_0 [g/L]			
1	25	4	1	22.84	70	0.32
2	35	4	1	23.40	50	0.46
3	25	5	1	18.72	30	0.62
4	35	5	1	22.84	47	0.48
5	25	4	3	24.51	80	0.30
6	35	4	3	25.41	36	0.70
7	25	5	3	18.94	96	0.19
8	35	5	3	21.17	44	0.48
9-1*	30	4.5	2	22.28	57	0.39
9-2*	30	4.5	2	23.95	46	0.52

*A replica of experiment 9 was performed.

** Concentrations were estimated in triplicate throughout the reaction. The average is shown.

Table 3

Yeast, bioethanol and sugars concentration for the experiment with the highest production and productivity (experiment 6 of Table 2).

Time [h]	X [g/L]	P _E [g/L]	S [g/L]
0	0.41 ± 0.07	0.00 ± 0.00	231.48 ± 2.04
6	3.09 ± 0.11	7.19 ± 0.67	185.58 ± 10.26
12	5.18 ± 0.17	9.11 ± 2.04	110.18 ± 9.42
18	5.39 ± 0.28	16.51 ± 0.13	81.71 ± 3.86
24	5.85 ± 0.76	21.10 ± 0.68	33.01 ± 1.89
30	6.20 ± 0.13	24.45 ± 0.68	28.02 ± 2.46
36*	6.20 ± 0.25	25.41 ± 0.67	31.99 ± 0.87
42	6.20 ± 0.09	25.39 ± 0.19	30.68 ± 1.42
48	6.20 ± 0.17	25.40 ± 0.19	30.11 ± 0.69

*Time at which the maximum concentration of biomass and bioethanol is considered.

Table 4

Kinetic parameters of CCN-51 cocoa mucilage batch obtained by fitting to Andrews and Levenspiel model.

Parameter	Value	Standard deviation	Units
μ_{max}	0.34	±0.05	[h ⁻¹]
q_{max}	2.48	±0.33	[h ⁻¹]
K_S	1.32	±0.37	[g/L]
K_{SE}	39.82	±0.22	[g/L]
K_{IS}	938.99	±48.63	[g/L]
K_{IE}	99.72	±2.69	[g/L]
$Y_{X/S}$	0.15	±0.03	[g/g]
$Y_{E/S}$	0.1	±0.004	[g/g]
m	5.71E-06	±5.35E-06	[h ⁻¹]
$P_{X,max}$	23.14	±1.07	[g/L]
α	1.49	±0.004	[g/L]
β	1.39	±0.09	[g/L]

The key limitation of this study was that obtained kinetic parameters correspond only to the fermentation of CCN-51 cocoa mucilage and they are not suitable to any other type of yeast strain but *Saccharomyces cerevisiae*. Table 2 shows the main results obtained. Experiment labeled 6 (shaded area of the table), is the one in which the maximum bioethanol concentration was generated after 36 hours. Other experiments such as 2 and 5 reached close concentrations, nonetheless, reaction times were increased. Also, experiments that present lower values of temperature, pH and yeast concentration generate a lower alcohol concentration, low productivities and greater reaction time.

Table 3 indicates yeast growth; bioethanol production and substrate consume results for experiment 6. They were observed during fermentation up to 48 hours. Concentrations stabilize between 30 to 36 hours.

The increase of yeast concentration throughout the fermentation suggests that yeasts are constantly producing new cells by mitosis, thus generating a higher concentration of them throughout the experiment until reaching a steady state point.

Substrate consumption is because yeasts use it as food to grow and reproduce, metabolizing glucose to produce alcohol and carbon dioxide under anaerobic conditions of the environment. Since the yeasts are going to process the glucose available in the substrate, it decreases throughout the fermentation process.

When applying the integrated logistic model (eq.1) and Modified Gompertz (eq.2) a good fit was obtained to the experimental data, with R^2 values of 0.97 and 0.98 respectively. A maximum specific rate (μ_{max}) of $0.39 \pm 0.03 \text{ h}^{-1}$, lag phase (t_l) of 2 hours and a maximum bioethanol production rate (r_{pm}) of $1.11 \pm 0.06 \text{ g/(L·h)}$ were achieved. These models do not include substrate consumption and product

inhibition terms, as Andrews and Levenspiel (eq.3) does. For this method, good results were obtained for yeast production (eq.4) ($R^2 = 0.90$), bioethanol (eq.5) ($R^2 = 0.95$), and substrate consumption (sugars) (eq.6) ($R^2 = 0.98$).

Table 4 shows kinetic parameters obtained by adjustment of Andrews and Levenspiel model. It was carried out using Levenberg-Marquardt algorithm developed in MATLAB®, this model is suitable to several experimental systems among which is CCN-51 cocoa mucilage fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*.

As an example of the results of the parametric fitting to the empirical results, Figure 1 indicates the comparison between the temporal evolution of bioethanol, yeast and sugars concentrations for

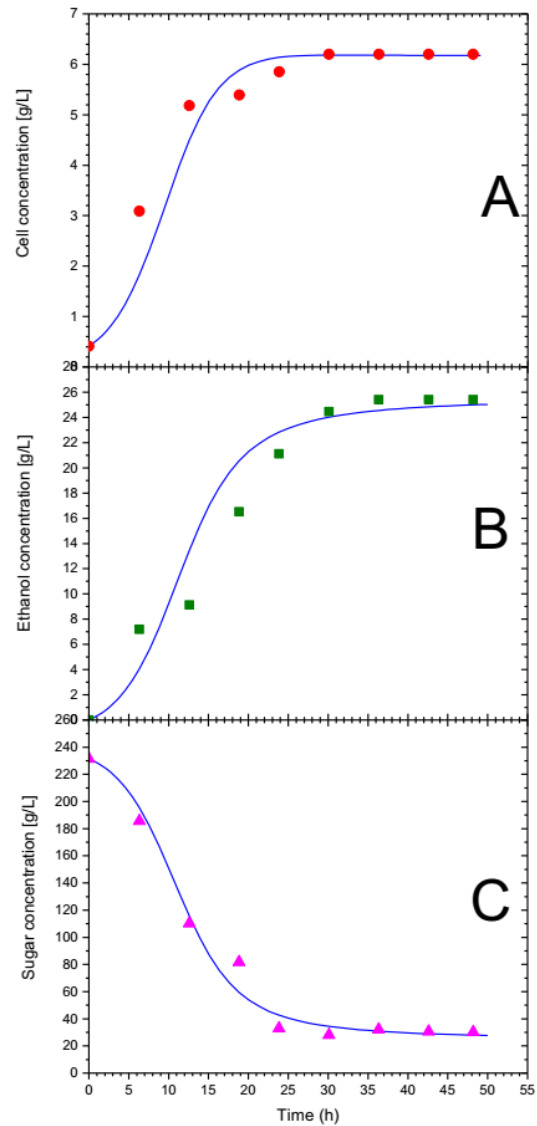


Figure 1. Yeast concentration (A), bioethanol concentration (B), sugars concentration (C), in CCN-51 cocoa mucilage discontinuous fermentation, adjusted with Andrews and Levenspiel model (solid lines).

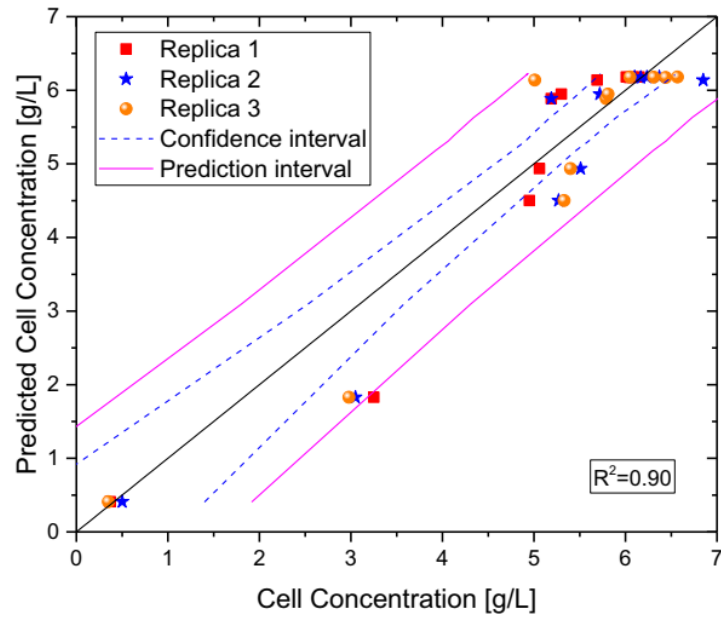


Figure 2. Correlation between yeast concentration calculated by Andrews and Levenspiel model (eq.5) and the experimental data. Solid line (black) represents a linear correlation coefficient of 1. Dashed lines (blue) represent a 95% confidence interval. Solid line (magenta) represents the prediction interval.

experiment 6 of Table 1 (pH=4, temperature= 35 °C y $X_0=3$ g/L) and the results obtained for the parameters shown in Table 4.

Figures 2, 3 and 4 show the correlation between yeast, bioethanol and sugars concentration calculated by Andrews and Levenspiel

model and experimental data. They have a high R^2 valued and data points are in the 95% prediction band, this suggested that Andrews and Levenspiel model can be used to predict and control fermentation systems with CCN-51 cocoa mucilage, as well as it could have

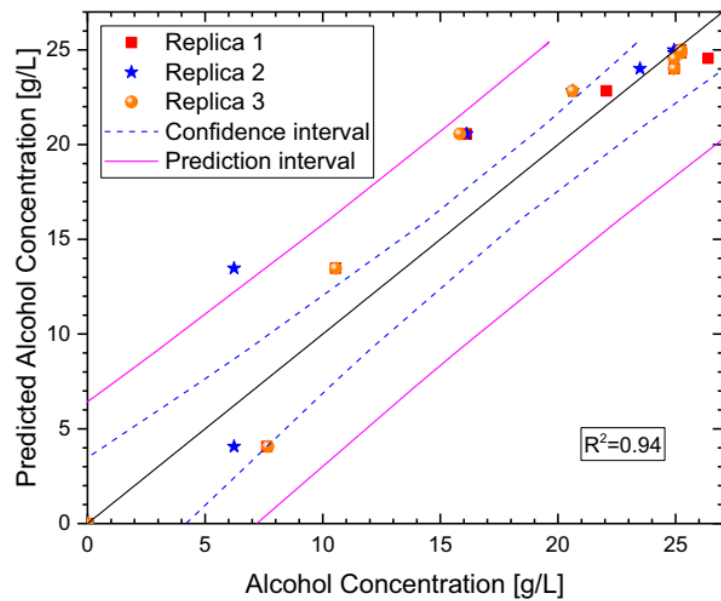


Figure 3. Correlation between bioethanol concentration calculated by Andrews and Levenspiel model (eq.6) and the experimental data. Solid line (black) represents a linear correlation coefficient of 1. Dashed lines (blue) represent a 95% confidence interval. Solid line (magenta) represents the prediction interval.

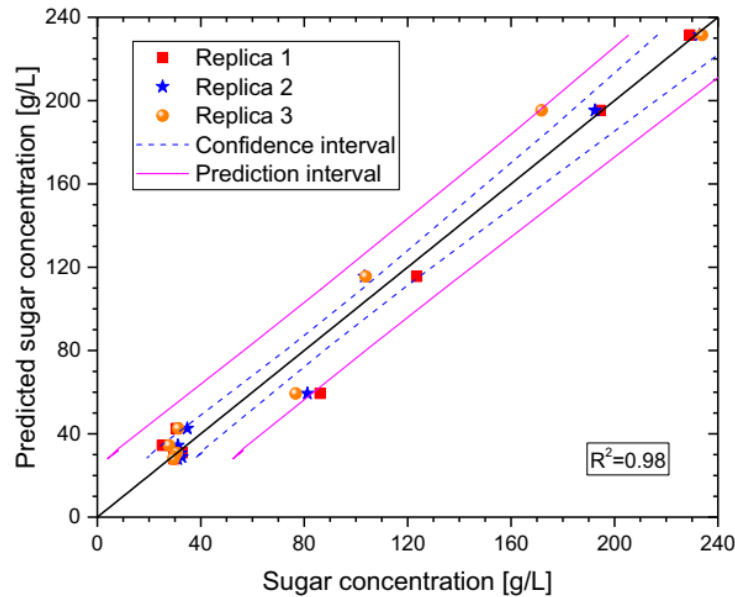


Figure 4. Correlation between sugars concentration calculated by Andrews and Levenspiel model (eq.7) and the experimental data. Solid line (black) represents a linear correlation coefficient of 1. Dashed lines (blue) represent a 95% confidence interval. Solid line (magenta) represents the prediction interval.

wide feasibility to systems operating under other conditions and with several carbon sources, so it could possibly be used to predict and control those systems as well.

The primary objective of this study was to determine the best conditions to operate a bioreactor to ferment CCN-51 cocoa mucilaginous residue. The results show that the optimum operating conditions correspond to a temperature of 35 °C, pH of 4 and an initial yeast concentration of 3 g/L. These findings are similar to other experimental systems such as those reported by [20] and [27], where the temperature varies between 30 and 35 °C, pH between 4 and 6; the main difference being the culture medium.

The present study found that lag phase (t_l) is around 2 hours with an initial concentration of sugars of 230 g/L, and biomass concentration stabilizes after 30 [h]. Comparable results were reported by [7], who studied the kinetic models for batch bioethanol production from sweet sorghum juice and indicate that lag phase is generated during the first 2 hours of the fermentation and the stationary phase was observed after 24 hours of reaction.

When applying the integrated logistic model, a maximum specific growth (μ_{max}) rate of $0.39 \pm 0.03 \text{ h}^{-1}$ was reached, while when applying Andrews and Levenspiel model, μ_{max} was $0.34 \pm 0.05 \text{ h}^{-1}$, being lower because the logistic model did not include the substrate consumption and the product inhibition terms. However, both values are higher than the reported by [13] whose value of μ_{max} is 0.19 h^{-1} for a bioethanol fermentation from sugar beet juice containing 136 g/L of total sugar without nutrients supplementation, this variation may be due to elements like yeast strain type, substrate type, substrate concentration and the bioreactor operating conditions.

The highest bioethanol concentrations were reached after 36 hours with a value of 25.41 g/L and a productivity of 0.70 g/(L·h). By applying the Modified Gompertz model, a maximum bioethanol production rate (r_{pm}) of $1.11 \pm 0.06 \text{ g/(L·h)}$ was determined. All these values were lower than the reported by [7], where maximum bioethanol concentration may improve if the initial amount of sugars is increased as reported by [28] and [29].

P_{Xmax} was 24 g/L. This finding indicates the alcohol concentration at which yeast stops growing. On the other hand, P_{Emax} for the fermentation was 25.41 g/L. This value suggests the bioethanol concentration from which yeasts inhibit their growth.

If compared with other results found in different culture media and other yeast strains, different values of P_{Xmax} and P_{Emax} were obtained, being 112 g/L and 115 g/L for [30] respectively, and 83.35 g/L and 107.79 g/L, respectively, in [24] study. Results shown are superior to those obtained in this study. This difference may be due to the type of strain used and its immobilization [24], in addition to the existence of a risk of inhibition when using thick juice and molasses [21]. Substrate inhibition constant for bioethanol formation (K_{IE}) was $99.72 \pm 2.69 \text{ g/L}$, and substrate inhibition constant for growth (K_{IS}) was $938.99 \pm 48.63 \text{ g/L}$. Both substrate inhibition constants were relatively lower compared to substrate concentration squared S^2 (231.48 g/L^2), indicating that the substrate at higher concentrations could inhibit products formation, especially yeast growth [8].

Biomass yield (Y_{XS}) was $0.15 \pm 0.03 \text{ g}_{\text{yeast}}/\text{g}_{\text{sugars}}$, and ethanol yield (Y_{XS}) was $0.1 \pm 0.004 \text{ g}_{\text{ethanol}}/\text{g}_{\text{sugars}}$, like the experimental 0.12 $\text{g}_{\text{ethanol}}/\text{g}_{\text{sugars}}$. However, both values are lower than the theoretical value of 0.51 $\text{g}_{\text{ethanol}}/\text{g}_{\text{sugars}}$ [31], since reaching this value is difficult because yeast uses glucose to produce other metabolites [26].

Conclusions

In this research, the objective was to evaluate CCN-51 cocoa mucilage, a residue from the cocoa industry, as a raw material with great potential to obtain bioethanol, since it contains fermentable sugars and is plentifully found in Ecuador.

The study has identified that the application of a 2^3 complete experimental design, makes it possible to establish the optimal operating conditions for a discontinuous bioreactor. The results show that the highest bioethanol production is generated at an operating temperature of 35 °C, pH 4 and yeast concentration of 3 g/L.

This work contributes to the existing knowledge, since kinetic models for fermentation with yeast of the type *Saccharomyces cerevisiae* were successfully applied, allowing to predict and control CCN-51 cocoa mucilage fermentative systems. Although all the evaluated models had a reasonable adjustment ($R^2 > 0.90$), the Andrews and Levenspiel method has the additional advantage of considering the substrate and product inhibition terms.

Future research should be directed towards the application of these models with immobilized cells to predict and compare results of bioethanol production and subsequently its industrial scaling.

Declaration of Competing Interest

None

Acknowledgments

The authors thank the University of Cuenca-Ecuador and its Faculty of Chemical Sciences for the support in equipment and materials. Also, Gobierno de Aragón (Aragon, Spain) is gratefully acknowledged for the financial support (European Social Fund - FEDER) of the consolidated research Catalysis, Molecular Separations and Reactor Engineering Group (CREG) (T43_17R).

References

- [1] IEA. Key World Energy Statistics 2020. Int Energy Agency 2020;33:4649.
- [2] Bebbington J, Schneider T, Stevenson L, Fox A. Fossil fuel reserves and resources reporting and unburnable carbon: Investigating conflicting accounts. Crit Perspect Account 2020;66:102083. doi: 10.1016/j.cpa.2019.04.004.
- [3] Gupta A, Verma JP. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. Renew Sustain Energy Rev 2015;41:550–67. doi: 10.1016/j.rser.2014.08.032.
- [4] Melo E, Sánchez Y, Ferrer N, Ferrer N. Evaluación de un motor de encendido por chispa trabajando con mezclas etanol-gasolina. Ing Energética 2012;33:94–102.
- [5] Mofijur M, Masjuki HH, Kalam MA, Ashrafur Rahman SM, Mahmudul HM. Energy scenario and biofuel policies and targets in ASEAN countries. Renew Sustain Energy Rev 2015;46:51–61. doi: 10.1016/j.rser.2015.02.020.
- [6] 2018 Hales DRenewables. Global Estatus Report 2018 978-3-9818911-3-3.
- [7] Phukoetphim N, Salakkam A, Laopaiboon P, Laopaiboon L. Kinetic models for batch ethanol production from sweet sorghum juice under normal and high gravity fermentations: Logistic and modified Gompertz models. J Biotechnol 2017;243:69–75. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.12.012.
- [8] Ge XM, Bai FW. Intrinsic kinetics of continuous growth and ethanol production of a flocculating fusant yeast strain SPSC01. J Biotechnol 2006;124:363–72. doi: 10.1016/j.jbiotec.2005.12.029.
- [9] Díaz-Montenegro J, Varela E, Gil JM. Livelihood strategies of cacao producers in Ecuador: Effects of national policies to support cacao farmers and specialty cacao landraces. J Rural Stud 2018;63:141–56. doi: 10.1016/j.jrurstud.2018.08.004.
- [10] García MI, Tigre A, Domínguez V, Barragán Vinuesa U, Guamán J, Ramón R, et al. Elaboration Of An Alcoholic Drink From The Aerobic Fermentation Of Mucilage Of Cocoa (Theobroma cacao L.) 2018;9:1375–80.
- [11] López-Pérez PA, Cuervo-Parra JA, Robles-Olivera VJ, Del C Rodríguez Jimenes G, Pérez España VH, Romero-Cortés T. Development of a Novel Kinetic Model for Cocoa Fermentation Applying the Evolutionary Optimization Approach. Int J Food Eng 2018;14:1–14. doi: 10.1515/ijfe-2017-0206.
- [12] Romero Cortes T, Cuervo-Parra JA, José Robles-Olivera V, Rangel Cortes E, López Pérez PA. Experimental and Kinetic Production of Ethanol Using Mucilage Juice Residues from Cocoa Processing. Int J Chem React Eng 2018;16:1–16. doi: 10.1515/ijcre-2017-0262.
- [13] Dodić JM, Vučković DG, Dodić SN, Grahovac JA, Popov SD, Nedeljković NM. Kinetic modelling of batch ethanol production from sugar beet raw juice. Appl Energy 2012;99:192–7. doi: 10.1016/j.apenergy.2012.05.016.
- [14] Andrews JF. A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. Biotechnol Bioeng 1968;10:707–23. doi: 10.1002/bit.260100602.
- [15] Levenspiel O. The monod equation: A revisit and a generalization to product inhibition situations. Biotechnol Bioeng 1980;22:1671–87. doi: 10.1002/bit.260220810.
- [16] Ariyajaroenwong P, Laopaiboon P, Salakkam A, Srinophakun P, Laopaiboon L. Kinetic models for batch and continuous ethanol fermentation from sweet sorghum juice by yeast immobilized on sweet sorghum stalks. J Taiwan Inst Chem Eng 2016;66:210–6. doi: 10.1016/j.jtice.2016.06.023.
- [17] Alalwan HA, Alminshid AH, Aljaafari HAS. Promising evolution of biofuel generations. Subject review. Renew Energy Focus 2019;28:127–39. doi: 10.1016/j.ref.2018.12.006.
- [18] Kaavya R, Pandiselvam R, Kothakota A, Banuu Priya EP, Arun Prasath V. Sugarcane Juice Preservation: A Critical Review of the State of the Art and Way Forward. Sugar Tech 2019;21:9–19. doi: 10.1007/s12355-018-0622-2.
- [19] Mohd Azhar SH, Abdulla R, Jambo SA, Marbawi H, Gansau JA, Mohd Faik AA, et al. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. Biochem Biophys Reports 2017;10:52–61. doi: 10.1016/j.bbrep.2017.03.003.
- [20] Pimpakan P, Yongmanitchai W, Limtong S. Bioethanol production from sugar cane syrup by thermo-tolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042, using fed-batch and repeated-batch fermentation in a nonsterile system. Kasetsart J - Nat Sci 2012;46:582–91.
- [21] Dodić S, Popov S, Dodić J, Ranković J, Zavargo Z, Jevtić Mučibabić R. Bioethanol production from thick juice as intermediate of sugar beet processing. Biomass and Bioenergy 2009;33:822–7. doi: 10.1016/j.biombioe.2009.01.002.
- [22] Noriega-Medrano LJ, Vega-Estrada J, Ortega-López J, Ruiz-Medrano R, Cristiani-Urbina E, Montes-Horcasitas M del C. Alternative non-chromatographic method for alcohols determination in *Clostridium acetobutylicum* fermentations. J Microbiol Methods 2016;126:48–53. doi: 10.1016/j.mimet.2016.05.001.
- [23] Ariyajaroenwong P, Laopaiboon P, Laopaiboon L. Capability of sweet sorghum stalks as supporting materials for yeast immobilization to produce ethanol under various fermentation processes. J Taiwan Inst Chem Eng 2015;49:79–84. doi: 10.1016/j.jtice.2014.11.016.
- [24] Ariyajaroenwong P, Laopaiboon P, Salakkam A, Srinophakun P, Laopaiboon L. Kinetic models for batch and continuous ethanol fermentation from sweet sorghum juice by yeast immobilized on sweet sorghum stalks. J Taiwan Inst Chem Eng 2016;66:210–6. doi: 10.1016/j.jtice.2016.06.023.
- [25] Polomska X, Wojtatowicz M, Zarowska B, Szoltysek M, Chrzanowska J. Freeze-drying preservation of yeast adjunct cultures for cheese production. Polish J Food Nutr Sci 2012;62:143–50. doi: 10.2478/v10222-011-0045-1.
- [26] Thangprompan P, Thanapimmetha A, Saisriyoot M, Laopaiboon L, Srinophakun P. Production of ethanol from sweet sorghum juice using VHG technology: A simulation case study. Appl Biochem Biotechnol 2013;171:294–314. doi: 10.1007/s12010-013-0365-1.
- [27] Lee JS, Park EH, Kim JW, Yeo SH, Kim MD. Growth and fermentation characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* NK28 isolated from kiwi fruit. J Microbiol Biotechnol 2013;23:1253–9. doi: 10.4014/jmb.1307.07050.
- [28] Nuanpeng S, Laopaiboon L, Srinophakun P, Klanrit P, Jaisil P, Laopaiboon P. Ethanol production from sweet sorghum juice under very high gravity conditions: Batch, repeated-batch and scale up fermentation. Electron J Biotechnol 2011;14:1–12. doi: 10.2225/vol14-issue1-fulltext-2.
- [29] Khongsay N, Laopaiboon L, Jaisil P, Laopaiboon P. Optimization of agitation and aeration for very high gravity ethanol fermentation from sweet sorghum juice by *saccharomyces cerevisiae* using an orthogonal array design. Energies 2012;5:561–76. doi: 10.3390/en5030561.
- [30] Loung JH. Kinetics of Ethanol Inhibition in Alcohol Fermentation. Biotechnol Res Inst 1985;XXVII:280–5.
- [31] Branco RHR, Amândio MST, Serafim LS, Xavier AMRB. Ethanol production from hydrolyzed kraft pulp by mono- And co-cultures of yeasts- And challenge of C6 and C5 sugars consumption. Energies 2020;13. doi: 10.3390/en13030744.

Anexo R. Índice de refracción

El índice de refracción de un material refleja las propiedades ópticas de un material, que requiere ser interpretado a través de diversas técnicas como una curva de calibración (Singh, 2002). Las curvas de calibración se utilizan para comprender la respuesta instrumental a un analito y predecir la concentración en una muestra desconocida. Por lo general, un conjunto de muestras estándar se hace a diferentes concentraciones con una gama que incluye al desconocido de interés y se registra la respuesta instrumental en cada concentración (Figura R.1) (INEN, 2002).

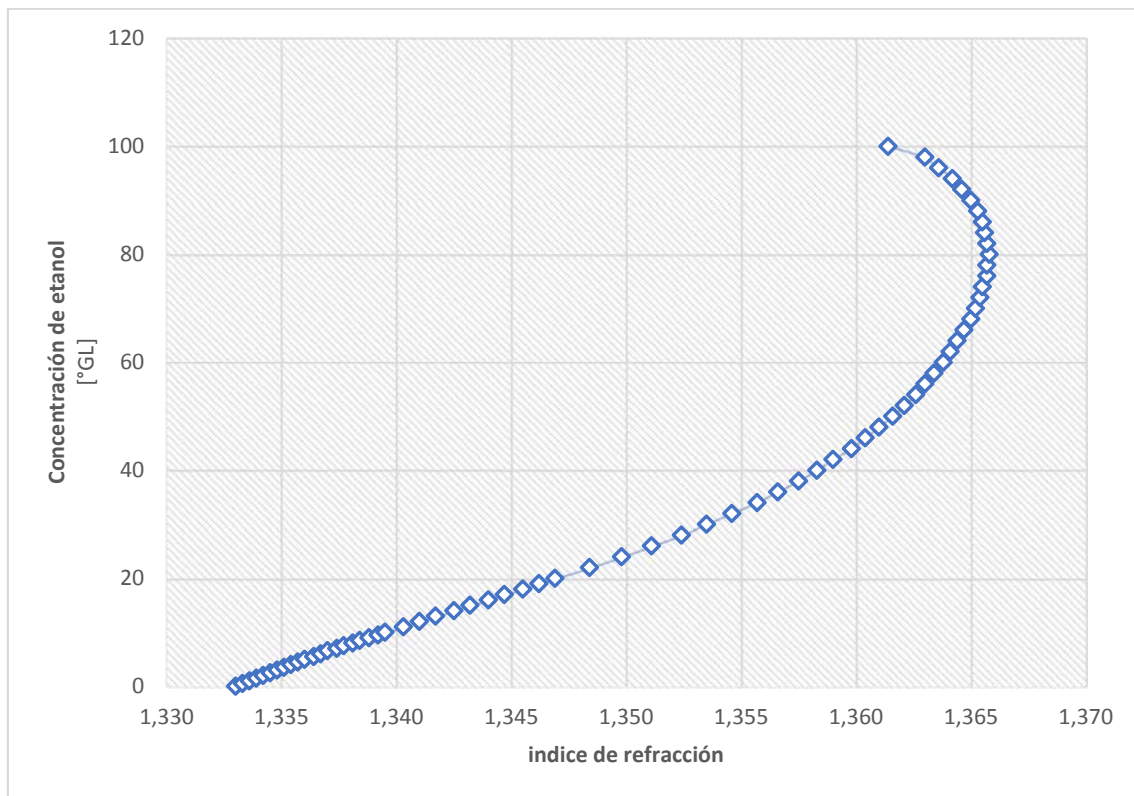
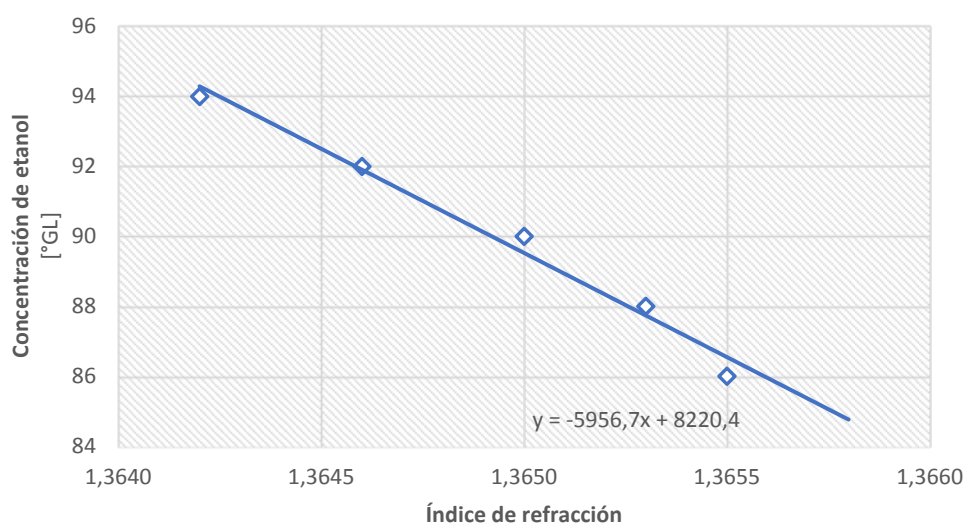


Figura R.1. Índice de refracción vs. concentración del etanol

Se toman los datos a partir de una concentración de 80 °GL esto debido a que mediante el alcoholímetro de Gay Lussac se determinó que la concentración del etanol no disminuye de los 88 °GL. Se realiza la curva de calibración de esta manera para obtener un mejor ajuste de la recta (Tabla R.1 y Figura R.2).

Tabla R.1. Curva de calibración para la rectificación entre 80 a 94 °GL.

<i>Concentración</i>	<i>Índice de refracción</i>
80	1.3658
82	1.3657
84	1.3656
86	1.3655
88	1.3653
90	1.3650
92	1.3646
94	1.3642

**Figura R.2.** Índice de refracción vs. concentración en el rango de 80 a 94 °GL.

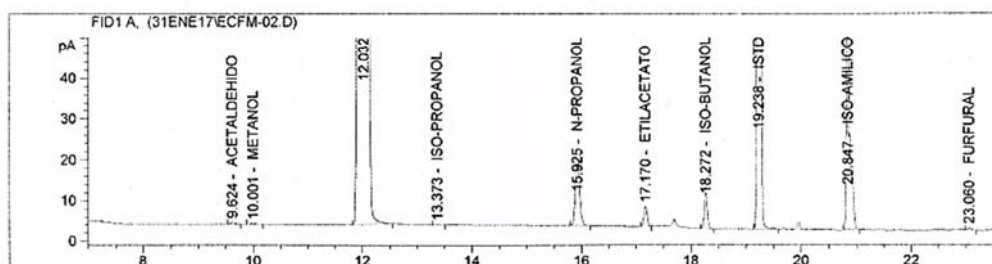
Anexo S. Análisis de las muestras de alcohol en los destilados

Data File D:\DATOS\31ENE17\ECFM-02.D

Sample Name: ECFM-02

MUESTRA ECFM-02-270117 LUIS MIGUEL SAAVEDRA MUESTRA EX
TERNA DESTILADO DE CACAO GRADO 62.48%V/V

Injection Date : 1/31/2017 11:52:01 AM Seq. Line : 1
Sample Name : ECFM-02 Location : Vial 101
Acq. Operator : AGM Inj : 1
Acq. Instrument : GC-EASA Inj Volume : 1 µl
Acq. Method : D:\METODOS\CDUAL15.M
Last changed : 9/23/2016 12:50:57 PM by AGM
Analysis Method : D:\METODOS\FRONT15.M
Last changed : 9/13/2016 11:13:10 AM by AGM
METODO PARA FRONT 2015



Internal Standard Report

Sorted By : Retention Time
Calib. Data Modified : 9/26/2015 5:10:03 PM
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Sample ISTD Information:

ISTD #	ISTD Amount [mg%ccAA]	Name
1	1.00000	ISTD

Signal 1: FID1 A,

RetTime [min]	Sig	Type	Area [pA*s]	Amt/Area ratio	Amount [mg%ccAA]	Grp	Name
9.624	1	BP	2.56927	3832.94957	6.46933	1	ACETALDEHIDO
10.001	1	BP	1.21711	8685.18179	6.94427	2	METANOL
13.111	1		-	-	-	3	ACETONA
13.373	1	BP	3.25355e-1	5807.09954	1.24118	4	ISO-PROPANOL
15.925	1	BB	92.23148	4833.11062	292.83521	4	N-PROPANOL
17.170	1	BV	19.69502	6721.69769	86.96666	5	ETILACETATO
18.272	1	VP	34.21396	4020.87852	90.37362	4	ISO-BUTANOL
19.238	1	BB +I	1522.23816	1.00000	1.00000		ISTD
20.847	1	PB	237.48999	3917.06928	611.11643	4	ISO-AMILICO
21.496	1		-	-	-	4	N-AMILICO
23.060	1	PB	1.79084	6117.25101	7.19665	6	FURFURAL

Totals without ISTD(s) : 1103.14335

Results obtained with enhanced integrator!

Group summary :

Group	Use	Area	Amount	Group Name
-------	-----	------	--------	------------

GC-EASA 1/31/2017 2:28:55 PM AGM

Page 1 of 2

```

Data File D:\DATOS\31ENE17\ECFM-02.D
MUESTRA ECFM-02-270117 LUIS MIGUEL SAAVEDRA MUESTRA EX
TERNA DESTILADO DE CACAO GRADO 62.48%V/V
Sample Name: ECFM-02

=====
Injection Date : 1/31/2017 11:52:01 AM      Seq. Line : 1
Sample Name    : ECFM-02                  Location  : Vial 101
Acq. Operator  : AGM                      Inj       : 1
Acq. Instrument : GC-EASA                  Inj Volume: 1 µl
Acq. Method    : D:\METODOS\CDUAL15.M
Last changed   : 9/23/2016 12:50:57 PM by AGM
Analysis Method : D:\METODOS\FRONT15.M
Last changed   : 9/13/2016 11:13:10 AM by AGM
METODO PARA FRONT 2015
=====

  ID      [pA*s]      [mg%ccAA]
-----|-----|-----|-----|
  1         2.56927      6.46933  ACETALDEHIDO
  2         1.21711      6.94427  METANOL
  3         0.00000      0.00000  ACETONA
  4        364.26078    995.56643  ALCOHOLES SUPERIORES
  5        19.69502     86.96666  ETILACETATO
  6         1.79084      7.19665  FURFURAL

2 Warnings or Errors :
Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)
Warning : Calibrated compound(s) not found

=====
*** End of Report ***

```

Figura S.1. Análisis cromatográfico del destilado de la columna de destilación simple.

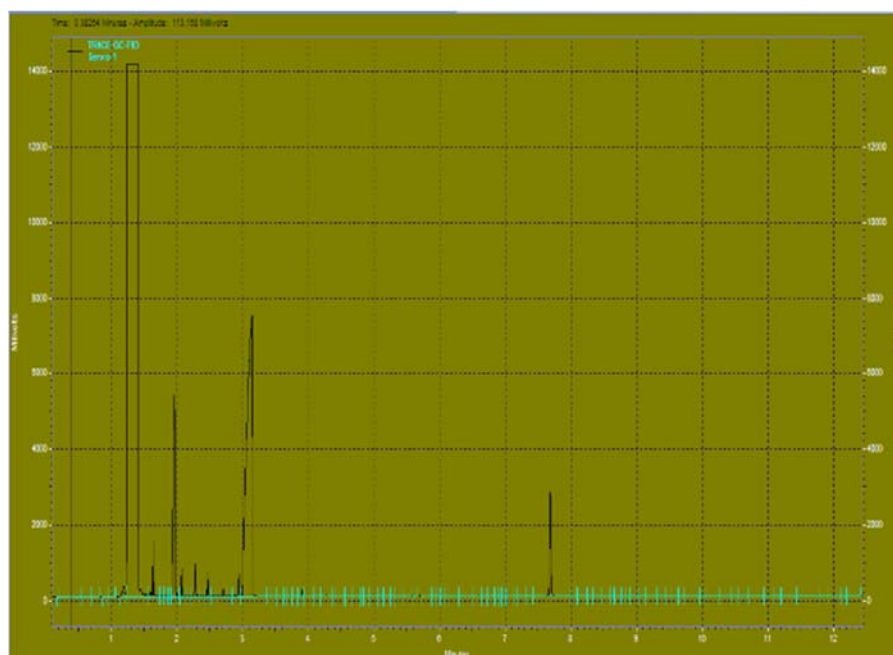


Figura S.2. Cromatograma del destilado de la columna de destilación extractiva.

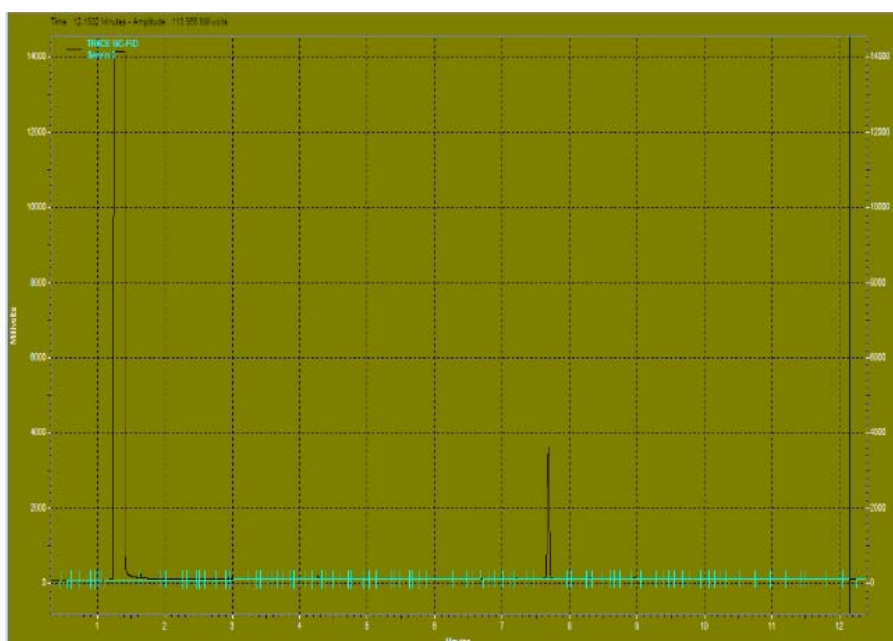


Figura S.3. Cromatograma de la corriente de salida del tamiz molecular.

Anexo T. Determinación del método de discretización

Aspen Custom Modeler proporciona dos clases bien conocidas de métodos de discretización para aproximar derivadas parciales e integrales: diferencias finitas sobre cuadrículas uniformes y colocación ortogonal sobre elementos finitos (OCFE) (Aspentech, 2004). Los métodos difieren en el orden y tipo de aproximación utilizada (Tabla T.1). Siendo el método predeterminado “BFD1”.

Tabla T.1. Lista de métodos de discretización.

<i>Métodos</i>	<i>Orden</i>	<i>Tipo</i>
BFD1	Primer orden	Diferencia finita hacia atrás
BFD2	Segundo orden	Diferencia finita hacia atrás
OCFE2	Segundo Orden	Colocación ortogonal en elementos finitos
OCFE3	Tercer Orden	Colocación ortogonal en elementos finitos
OCFE4	Cuarto orden	Colocación ortogonal en elementos finitos
CFD2	Segundo Orden	Diferencia finita central
CFD4	Cuarto Orden	Diferencia finita central
FFD1	Primer Orden	Diferencia finita hacia adelante
FFD2	Segundo Orden	Diferencia finita hacia adelante
UBFD4	Cuarto Orden	Diferencia finita sesgada a favor

Tabla T.2. Resumen de Variables obtenidas en el Método BFD2

Tiempo [h]	Etanol [g/L]	Sustrato [g/L]	Biomasa [g/L]	Producción Etanol [g L ⁻¹ h ⁻¹]	Consumo de Sustrato [g L ⁻¹ h ⁻¹]	Crecimiento celular [g L ⁻¹ h ⁻¹]
0	0	231.49	0.41	0.29	4.10E-06	0.106
1	0.48	228.63	0.53	0.36	5.26E-06	0.132
2	1.08	224.98	0.67	0.45	6.74E-06	0.163
3	1.82	220.44	0.85	0.56	8.55E-06	0.198
4	2.71	214.95	1.07	0.67	1.07E-05	0.234
5	3.74	208.43	1.32	0.80	1.32E-05	0.270
6	4.91	200.91	1.61	0.92	1.61E-05	0.302
7	6.20	192.44	1.92	1.03	1.92E-05	0.328
8	7.57	183.17	2.26	1.12	2.26E-05	0.344
9	8.98	173.31	2.60	1.19	2.60E-05	0.350
10	10.39	163.09	2.95	1.23	2.95E-05	0.345
11	11.78	152.76	3.28	1.24	3.28E-05	0.331
12	13.08	142.56	3.60	1.22	3.60E-05	0.310
13	14.29	132.68	3.89	1.19	3.89E-05	0.284
14	15.39	123.27	4.16	1.13	4.16E-05	0.255
15	16.37	114.41	4.40	1.07	4.40E-05	0.227
16	17.26	106.18	4.62	1.00	4.62E-05	0.200
17	18.02	98.57	4.80	0.93	4.80E-05	0.175
18	18.70	91.58	4.97	0.86	4.97E-05	0.152
19	19.28	85.18	5.11	0.79	5.11E-05	0.132
20	19.79	79.32	5.23	0.73	5.23E-05	0.115
21	20.23	73.97	5.34	0.67	5.34E-05	0.010
22	20.62	69.07	5.44	0.62	5.44E-05	0.087
23	20.95	64.59	5.52	0.57	5.52E-05	0.076
24	21.24	60.48	5.59	0.52	5.59E-05	0.066
25	21.50	56.69	5.65	0.49	5.65E-05	0.058
26	21.72	53.21	5.70	0.45	5.70E-05	0.051
27	21.92	49.99	5.75	0.42	5.75E-05	0.045
28	22.09	47.00	5.79	0.39	5.79E-05	0.040
29	22.25	44.24	5.83	0.36	5.83E-05	0.035
30	22.39	41.66	5.87	0.34	5.87E-05	0.031
31	22.51	39.26	5.89	0.32	5.89E-05	0.028
32	22.62	37.01	5.92	0.30	5.92E-05	0.025
33	22.72	34.91	5.95	0.28	5.95E-05	0.023
34	22.81	32.95	5.97	0.26	5.97E-05	0.020
35	22.89	31.10	5.99	0.25	5.99E-05	0.018
36	22.96	29.36	6.00	0.24	6.00E-05	0.017

Anexo U. Simulación mediante Aspen Plus

U.1. Inicio de la simulación

El primer paso para proceder a utilizar el software de simulación Aspen Plus® es encontrar los componentes que van a participar en el proceso, incluyendo reactantes, productos y de servicios. Para ello, luego de crear un archivo nuevo, dirigirse a la sección *Properties* (Figura U.1-1) y seleccionar *Components* (Figura U.1-2). A continuación, se busca los componentes a incluir en el proceso con ayuda del botón *Find* que aparece en la parte inferior (Figura U.1-3). Es posible cambiar el nombre de cada componente en la celda de *Component ID* con el objetivo de identificarlos más fácilmente a lo largo del proceso. Usar el botón *Next* (Figura U.1-4) para continuar al siguiente paso.

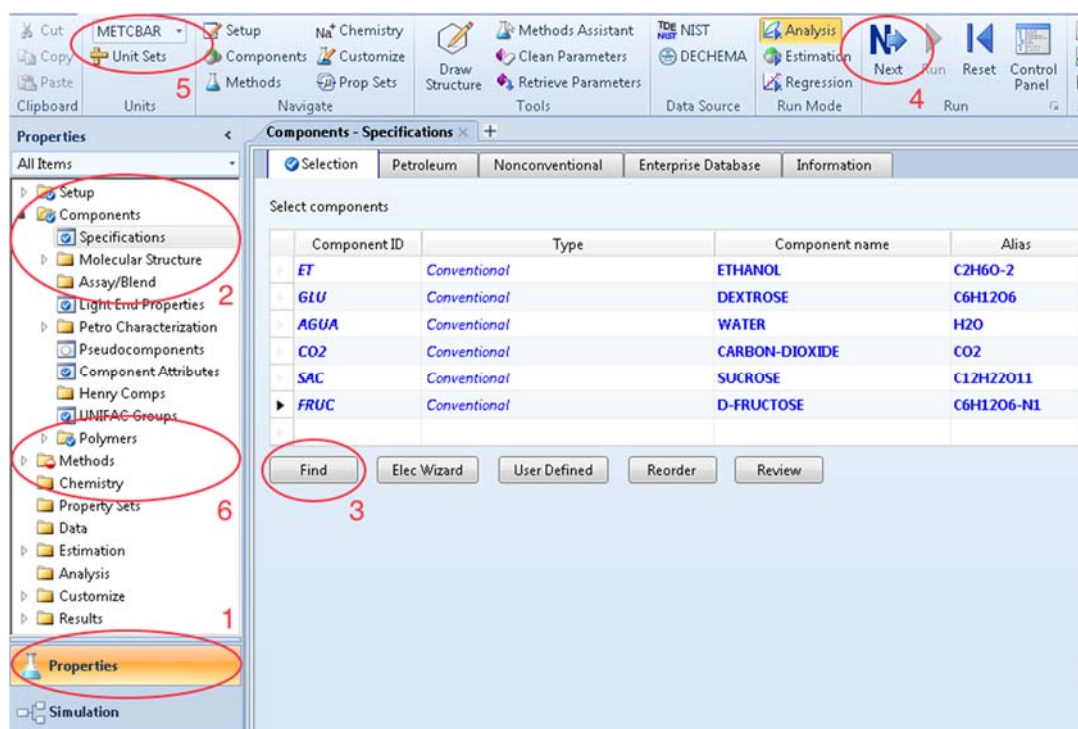


Figura U.1. Primeros pasos para iniciar el proceso de simulación



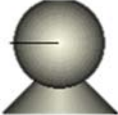


U.1.2. Selección de unidades

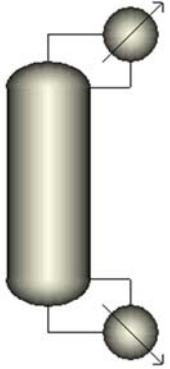

Con el simulador de procesos Aspen Plus® es posible elegir entre diferentes sistemas de unidades. Para este proceso se optó por el sistema de unidades METBAR para comparar de manera más práctica los resultados con otras investigaciones.

U.1.3. División del proceso en módulos y modelos

En esta etapa se eligen los modelos más apropiados del simulador Aspen Plus® para representar a las operaciones unitarias. La selección de modelos se muestra en la siguiente tabla:

Tabla U.1. Definición de modelos que representen a las operaciones unitarias.

<i>Operación Unitaria</i>	<i>Modelo</i>	
Intercambiador de calor	HEATER	
Mezclador	MIXER	
Bomba	PUMP	
Fermentador	RBATCH	
Absorbedor	RADFRAC	

Separador de CO₂, columna de destilación y rectificación, columna de destilación extractiva	RADFRAC	
Tamices moleculares	LIQ_BED	

Para acceder a los diferentes modelos, dirigirse a la sección *Simulation* en Aspen Plus® (Figura U.2) y navegar en la *Model Palette*. Aquí encontrará los modelos distribuidos por grupos como: Mezcladores/Separadores, Intercambiadores, Columnas, Reactores, etc.



Figura U.2. Model Palette.

U.2. Estructuración y especificación de las condiciones de operación

U.2.1. Fermentación

Para configurar las reacciones químicas, por ejemplo, la inversión de la sacarosa (R-1) y la fermentación de la glucosa (R-2), primero dirigirse a la pestaña *Reactions* (Figura U.3) y se configura una nueva de tipo *Power Law* (Figura U.4). A continuación, se selecciona los componentes reactantes y los productos como se indica en la Figura U.5 para R-1 y Figura U.6 para R-2 donde se ingresan los coeficientes estequiométricos de la reacción en la columna *Coefficient* (donde un número negativo se usa para los reactantes y uno positivo para productos). El orden de la reacción en la columna *Exponent*.

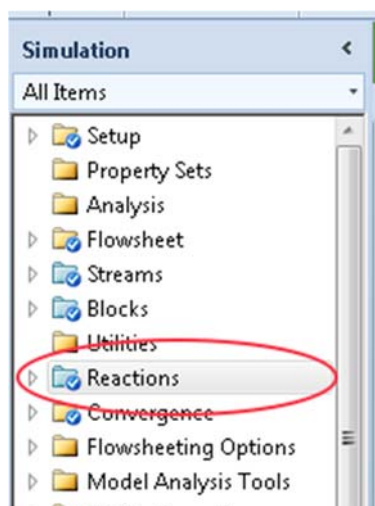


Figura U.3. Configuración de una nueva reacción.



Figura U.4. Configurar tipo de reacción.

Reaction No. 1 Reaction type Kinetic

Component	Coefficient	Exponent
SUCRO-01	-1	
WA	-1	

Component	Coefficient	Exponent
DEXTR-01	1	
D-FRU-01	1	

Close

Figura U.5. Edición de la reacción de inversión de la sacarosa.

Reaction No. 1 Reaction type Kinetic

Component	Coefficient	Exponent
DEXTR-01	-1	0.2882

Component	Coefficient	Exponent
ET	2	
CARBO-01	2	

Close

Figura U.6. Edición de la reacción de fermentación de glucosa.

Luego se configura la cinética de la reacción dirigiéndose a la pestaña *Kinetic* (Figura U.7 para R-1 y Figura U.8 para R-2). En esta sección se especifica que la fase de la reacción se va a dar en fase líquida, que la expresión cinética está en función del volumen del reactor, la constante cinética y que la base de cálculo es concentración en masa (g/100 mL).

1) SUCRO-01 + WA --> DEXTR-01 + D-FRU-01

Reacting phase Liquid Rate basis Reac (vol)

Power Law kinetic expression

If To is specified Kinetic factor $=k(T/T_o)^n e^{-(E/R)[1/T-1/T_o]}$

If To is not specified Kinetic factor $=kT^n e^{-E/RT}$

k 9.796e+13

n 0

E 133.9 kJ/mol

To C

[Ci] basis Molality

Edit Reactions

Solids

Figura U.7. Configuración de la cinética de la inversión de la sacarosa.

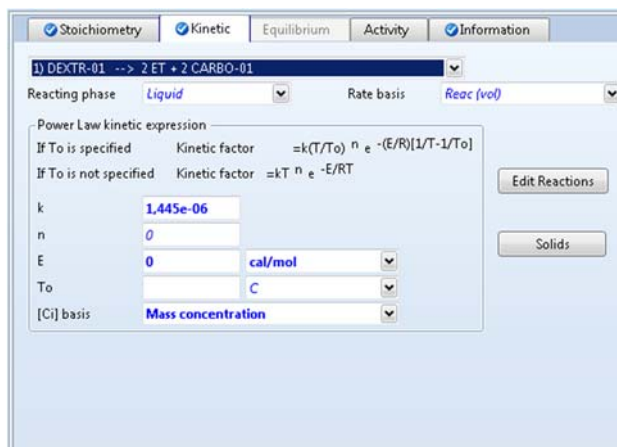


Figura U.8. Configuración de la cinética de la fermentación de la glucosa.

U.2.2. Recuperación de etanol

En este caso, se va a usar Aspen Plus® como herramienta para diseñar la columna de absorción, ya que no se cuenta con todas las especificaciones del proceso. En primer lugar, se debe elegir el módulo ABSORBER dentro del conjunto de columnas de tipo RADFRAC o rigurosas y se instala las corrientes de entrada y salida (Figura U.9).

Una vez seleccionada la columna de absorción es necesario indicar al *software* que el modelo va a funcionar como un Absorbedor. Para ello, hay que dirigirse al menú de la izquierda y seleccionar la carpeta *Blocks*, elegir el módulo correspondiente al absorbedor (AB-101) y dentro de la carpeta *Convergence* y seleccionar la opción *Convergence*. Finalmente, dirigirse a la pestaña *Advanced* y en *Absorber* elegir *Yes* (Figura U.10).

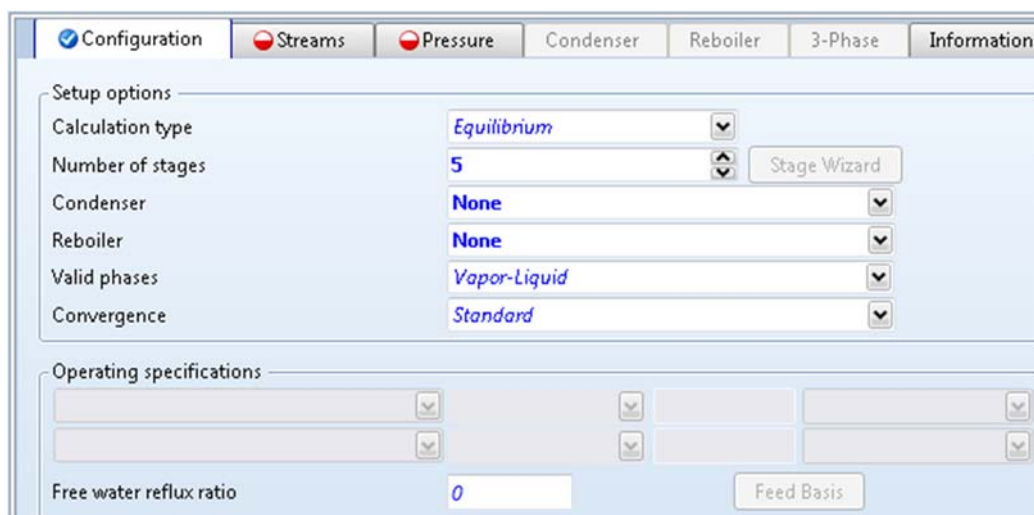


Figura U.9. Configuración de la columna de absorción AB-101.

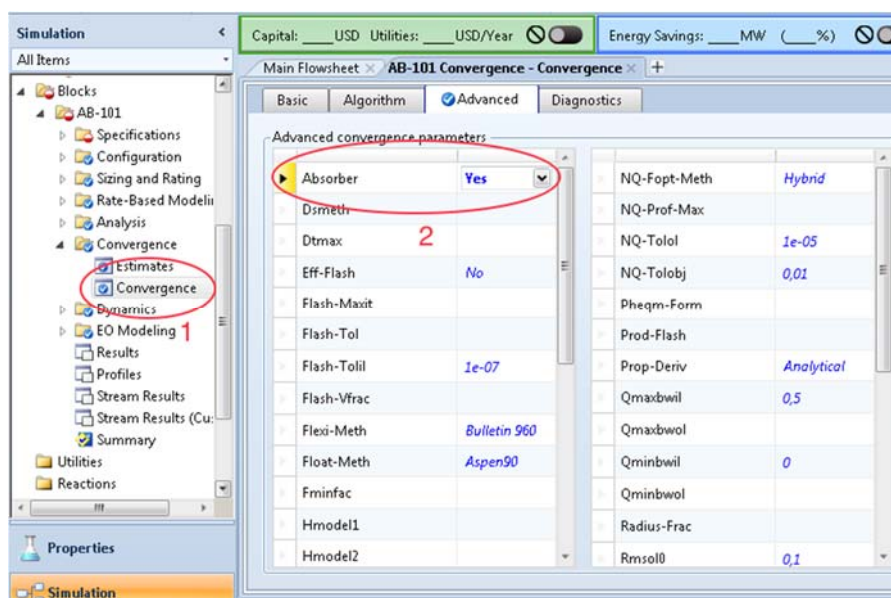


Figura U.10. Selección del modelo de la columna (absorbedor).

Luego se dirige a *Streams* para configurar la ubicación y naturaleza de las corrientes de entrada, es decir, VENT entrará por el último plato en fase vapor y WA entrará por el primer plato en fase líquida (Figura U.11).

Feed streams		
Name	Stage	Convention
▶ VENT	5	Vapor
▶ WA	1	Liquid

Product streams			
Name	Stage	Phase	Basis
▶ VAP	1	Vapor	Mole
▶ SS	5	Liquid	Mole

Figura U.11. Especificación de las corrientes de entrada para la columna de absorción AB-101.

Por último, se define el perfil de presiones de la columna, teniendo en el primer plato la presión atmosférica y sin caída de presión (Figura U.12).

View: **Top / Bottom**

Top stage / Condenser pressure
 Stage 1 / Condenser pressure: **1** atm

Stage 2 pressure (optional)
☒ Stage 2 pressure: bar
☐ Condenser pressure drop: bar

Pressure drop for rest of column (optional)
☒ Stage pressure drop: psi
☐ Column pressure drop: bar

Figura U.12. Configuración de perfil de presiones para columna de absorción AB-101.

Con esta configuración, la columna solo logra recuperar el 18 % del etanol. Por tanto, se procede a establecer una Especificación de Diseño para ajustar de forma precisa la variable necesaria, a fin de lograr la recuperación de etanol requerida. En este caso, la variable a ajustar será el flujo másico de agua.

U.2.3. Especificación de diseño

Primero, dirigirse a la carpeta *Specifications* y luego, a *Design Specification* dentro de la carpeta del modelo y crear una nueva Especificación con *New* (Figura U.13).

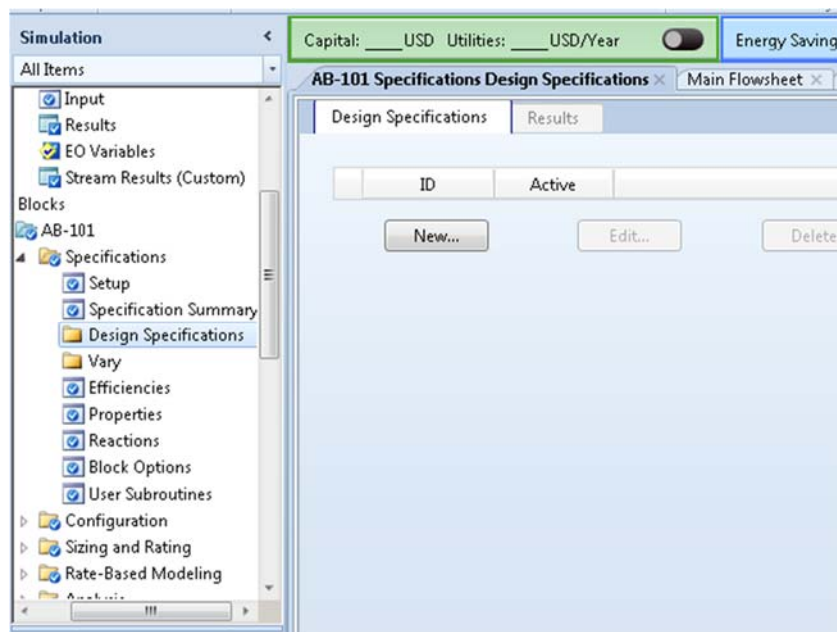


Figura U.13. Generar una nueva especificación de diseño.

Ahora, escribir un nombre para este ajuste y seleccionar el tipo de diseño que se requiere establecer, es decir, una Recuperación másica del 98 % (Figura U.14).

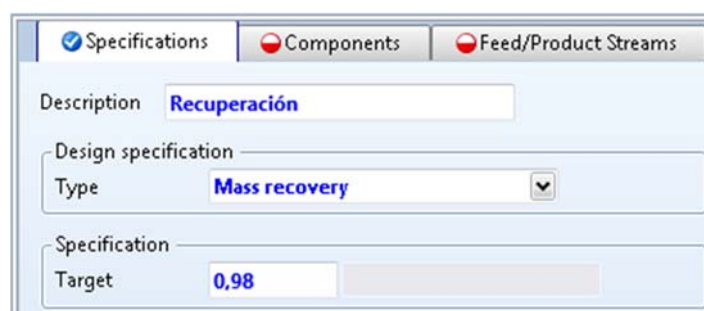


Figura U.14. Nombre, tipo y objetivo de la especificación de diseño.

En la pestaña *Components* seleccionar el compuesto a recuperarse (Figura U.15).

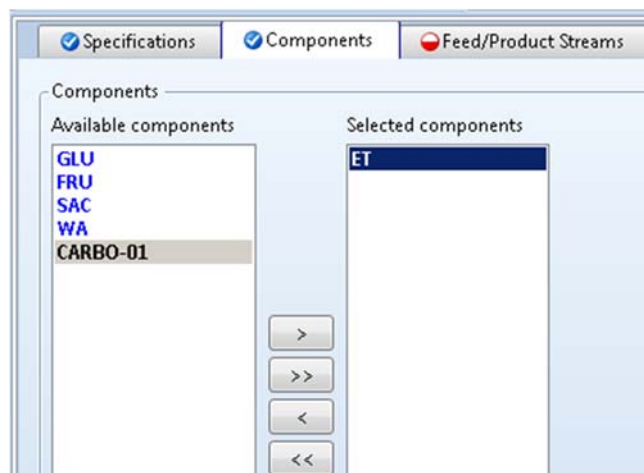


Figura U.15. Elección del componente objetivo.

Luego, en la pestaña *Feed/Product Streams* seleccionar en qué corriente se va a recuperar el compuesto (*Product streams*) y de qué corrientes se va a tomar (*Feed streams*) (Figura U.16).

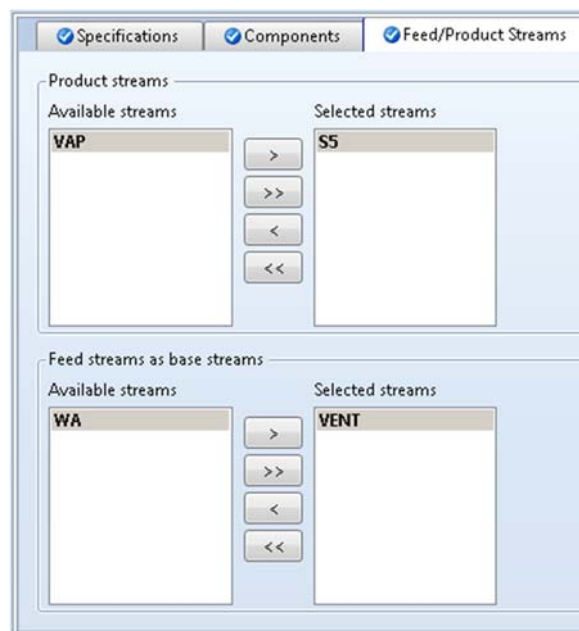


Figura U.16. Configuración de corrientes de alimentación y producto.

Posteriormente, dirigirse a la carpeta *Vary* y crear una nueva variable a ajustar (Figura U.17).

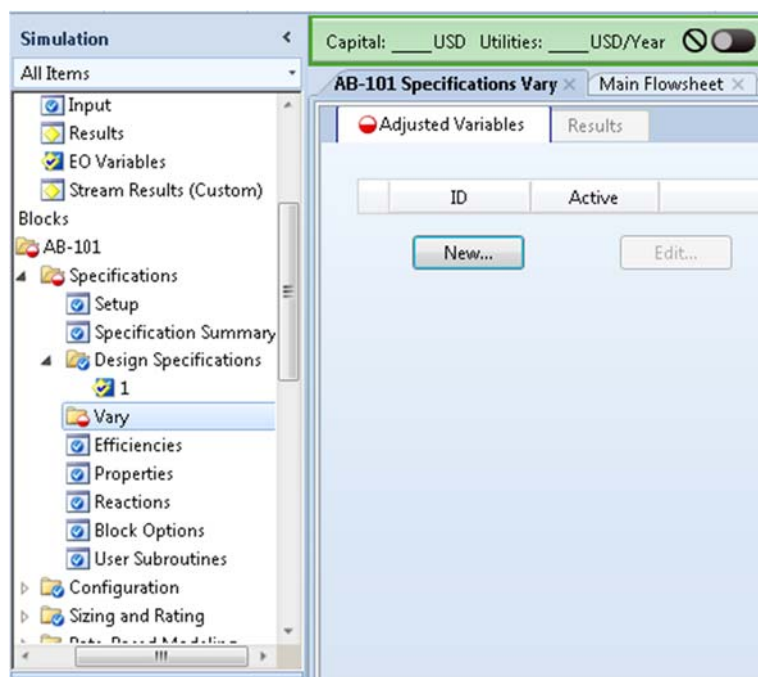


Figura U.17. Configuración de nueva variable para ajustar.

La variable de interés para este caso es el flujo de alimentación o *Feed rate* de la corriente con agua (WA). A continuación, se establecen los valores límites en kmol/h entre los cuales se va a hacer la iteración (Figura U.18) y hacer correr la simulación.

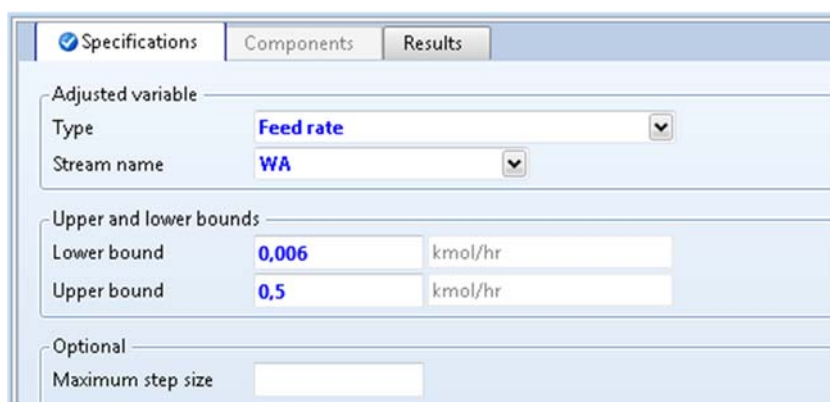
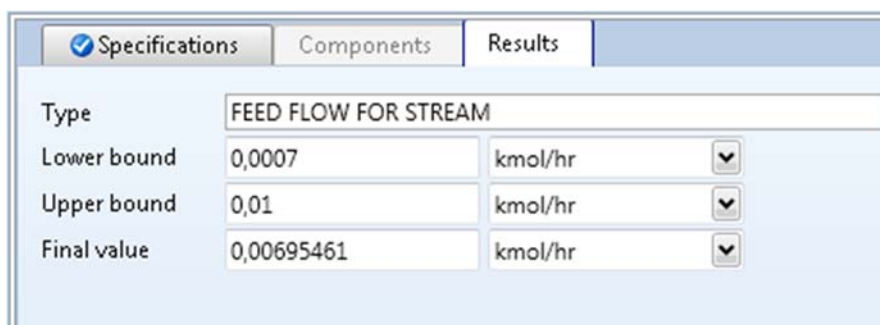


Figura U.18. Configuración de tipo de variable y límites.

Una vez haya corrido sin problema la simulación, ir a la pestaña *Results* y observar el nuevo resultado (Figura U.19).

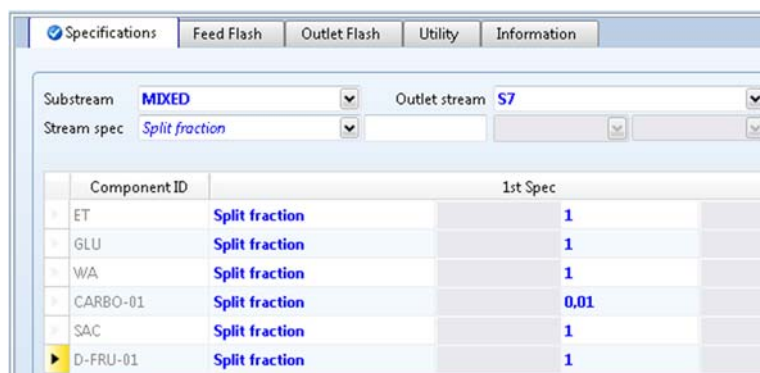


Type	Value	Unit
Lower bound	0,0007	kmol/hr
Upper bound	0,01	kmol/hr
Final value	0,00695461	kmol/hr

Figura U.19. Resultados de la especificación de diseño.

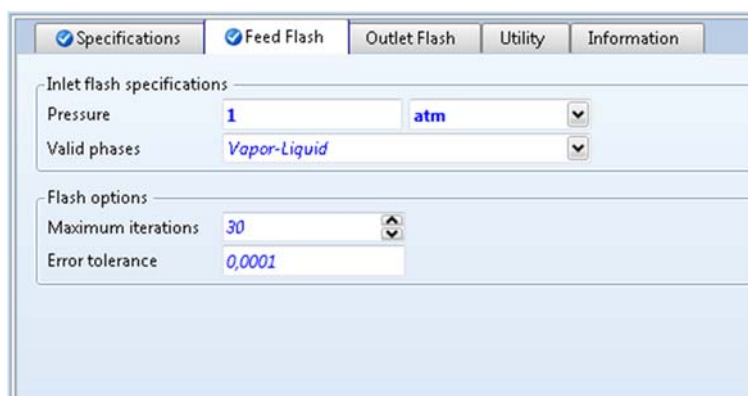
U.2.4. Destilación y Rectificación

El diseño de las operaciones de destilación y rectificación se realizó tal como se muestra en las Figuras U.20 - U.24.



Component ID	Split fraction	1st Spec
ET	Split fraction	1
GLU	Split fraction	1
WA	Split fraction	1
CARBO-01	Split fraction	0,01
SAC	Split fraction	1
D-FRU-01	Split fraction	1

Figura U.20. Especificación de fracción de separación de cada componente.



Parameter	Value	Unit
Pressure	1	atm
Valid phases	Vapor-Liquid	
Maximum iterations	30	
Error tolerance	0,0001	

Figura U.21. Especificación de presión de trabajo del separador S-101.

Specifications Calculation Options Convergence Information

Column specifications

Number of stages

Reflux ratio: -1.35

Key component recoveries

Light key

Comp: ET

Recov: 0.98

Heavy key

Comp: WA

Recov: 0.05

Pressure

Condenser: 15 psia

Reboiler: 15 psia

Condenser specifications

Total condenser

Partial condenser with all vapor distillate

Partial condenser with vapor and liquid distillate

Distillate vapor fraction: 0

Figura U.22. Configuración de la columna de destilación con el modelo DSTWU.

Configuration Streams Pressure Condenser Reboiler 3-Phase Informa

Setup options

Calculation type: Equilibrium

Number of stages: 11

Condenser: Total

Reboiler: Kettle

Valid phases: Vapor-Liquid

Convergence: Standard

Operating specifications

Distillate rate: 10,108 kg/hr (Mass)

Reflux ratio: 0.001 (Mole)

Free water reflux ratio: 0

Feed Basis

Figura U.23. Configuración de columna de destilación T-101.

Configuration Streams Pressure Condenser

Feed streams

Name	Stage	Convention
S9	6	Above-Stage

Figura U.24. Especificación de etapa de alimentación para columna T-101.

Finalmente, se establece el perfil de presiones. Ya se había encontrado que para esta separación se necesita 15 psia de presión en el condensador. Mientras que, por reglas heurísticas para columnas de destilación se estableció un valor de 0.1 psi de caída de presión en cada plato.

Configuration Streams Pressure Condenser

View: Top / Bottom

Top stage / Condenser pressure

Stage 1 / Condenser pressure: 15 psia

Stage 2 pressure (optional)

☒ Stage 2 pressure: bar

☐ Condenser pressure drop: bar

Pressure drop for rest of column (optional)

☒ Stage pressure drop: 0.1 psi

☐ Column pressure drop: bar

Figura U.25. Configuración de perfil de presiones para columna T-101.

Configuration Streams Pressure Condenser Reboiler 3-Phase Information

Setup options

Calculation type: Equilibrium

Number of stages: 29 [Stage Wizard]

Condenser: Total

Reboiler: Kettle

Valid phases: Vapor-Liquid

Convergence: Standard

Operating specifications

Distillate rate: 5.03 kg/hr (Mass)

Reflux ratio: 1.3593 (Mole)

Free water reflux ratio: 0 [Feed Basis]

Figura U.26. Configuración de la columna de rectificación T-102.

Para destilación es necesario modificar el proceso de cálculo que viene por defecto en el programa. Para lograr esto, dirigirse a la columna de la izquierda (Figura U.27), ubicar la carpeta del modelo T-102, abrir *Convergence* y elegir el ítem *Convergence* y cambiar el número de iteraciones máximas a 200 de la pestaña *Basic*. Además, se ha añadido una Especificación de diseño que modifique el reflujo de destilado para alcanzar la pureza deseada.

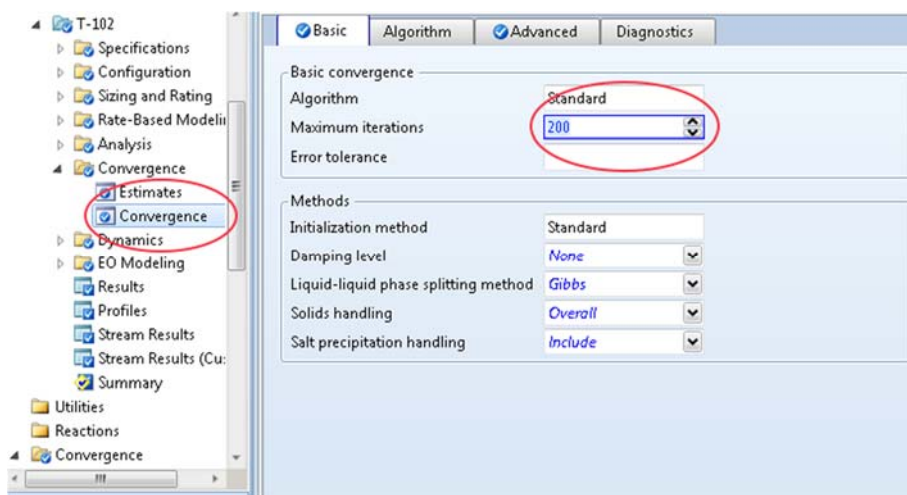


Figura U.27. Configuración del número de iteraciones para convergencia de columna T-102.

U.2.5. Destilación extractiva

Para esta operación, en la sección *Convergence*, elegir la opción *Custom* (Personalizado), ítem que se especificará más adelante (Figura U.28).

Configuration window for distillation column T-103. The 'Configuration' tab is selected. The 'Setup options' section shows: Calculation type: Equilibrium, Number of stages: 4, Condenser: Total, Reboiler: Kettle, Valid phases: Vapor-Liquid, Convergence: Custom. The 'Operating specifications' section shows: Distillate rate: 4,5 kg/hr, Reflux ratio: 2, Free water reflux ratio: 0.

Figura U.28. Configuración de columna de la destilación extractiva T-103.

La corriente de alimentación con la solución alcohólica se sitúa en la segunda etapa (3.^a para Aspen Plus®) y la del solvente, en la primera etapa (2.^a para Aspen Plus®), ver Figura U.29.

Streams configuration window for distillation column T-103. The 'Streams' tab is selected. The 'Feed streams' table shows: S13 at Stage 3, Above-Stage; S16 at Stage 2, Above-Stage. The 'Product streams' table shows: S17 at Stage 1, Vapor, Mole; S18 at Stage 4, Liquid, Mole.

Figura U.29. Configuración de etapas de alimentación para la torre T-103.

Completar con la configuración del perfil de presiones de forma similar a las columnas anteriores (Figura U.30).

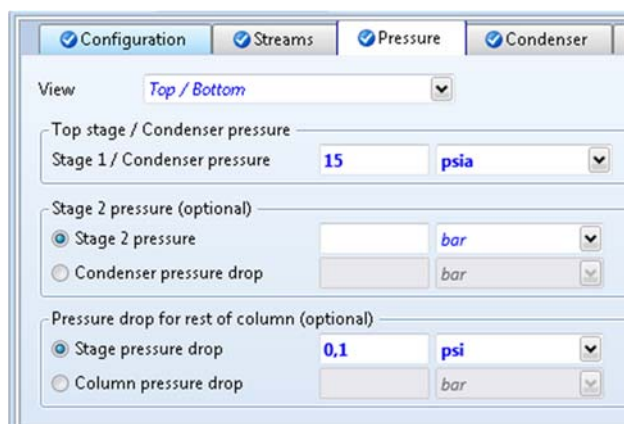


Figura U.30. Configuración del perfil de presiones para columna T-103.

Antes de correr la simulación, es necesario cambiar el algoritmo de convergencia al de Newton, el cual se recomienda para columnas de separación de dos líquidos en su punto azeotrópico. Además, colocar un número de iteraciones de 200, dirigiéndose a la sección *Convergence* de la columna de destilación T-103 (Figura U.31).

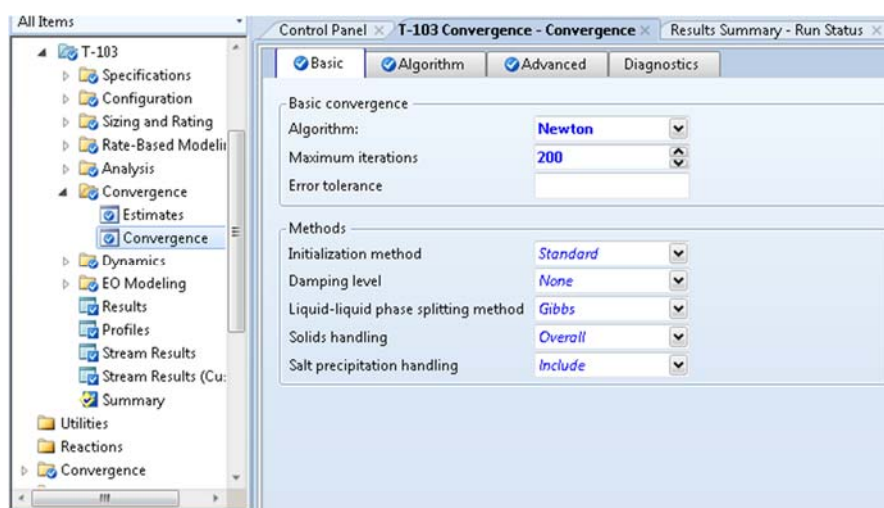


Figura U.31. Configuración de método de convergencia para columna T-103.

Para configurar la columna T-104 se siguió una configuración similar a las torres anteriores, como se observa en Figura U.32 y Figura U.33.

Figura U.32. Configuración para columna de recuperación T-104.

Feed streams		
Name	Stage	Convention
S18	1	Above-Stage

Product streams			
Name	Stage	Phase	Basis
REC-SOLV	4	Liquid	Mole
WATER	1	Vapor	Mole

Figura U.33. Configuración de etapa de alimentación para columna T-104.

U.2.6. Tamices moleculares

En primer lugar, en la ventana de Aspen Adsorption® se observa el menú contextual llamado *Exploring - Simulation* en la parte izquierda Figura U.34.

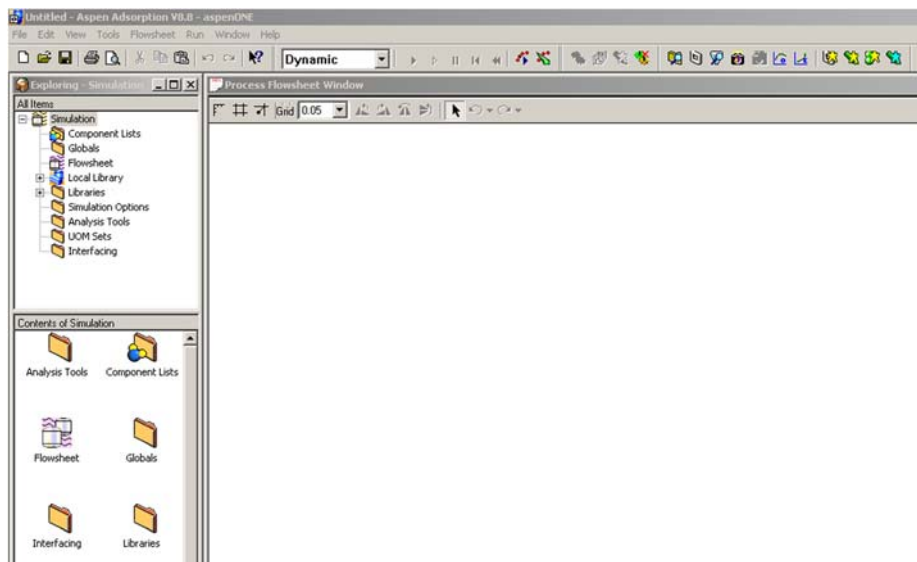


Figura U.34. Entorno de simulación de Aspen Adsorption®.

En *Exploring – Simulation* dirigirse a la carpeta *Component List* (dentro de *Simulation*), hacer clic en *Add Component List* para agregar el componente, como se ve en la Figura U.35. A continuación, se procede a configurar las propiedades físicas de los componentes como se muestra en la Figura U.36 y se procede a importar la lista de componentes (Figura U.37).

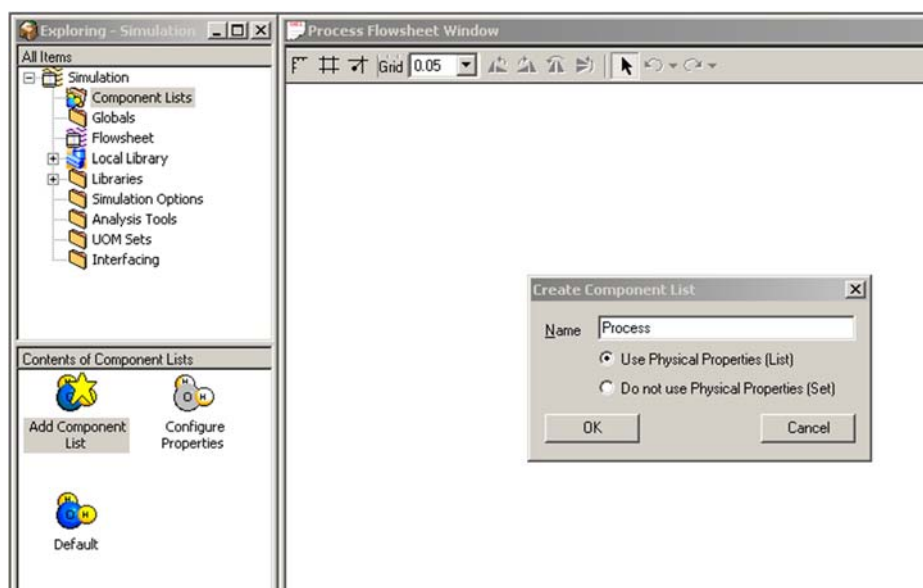


Figura U.35. Creación de una nueva lista de componentes.



Figura U.36. Configuración de propiedades físicas de los componentes.

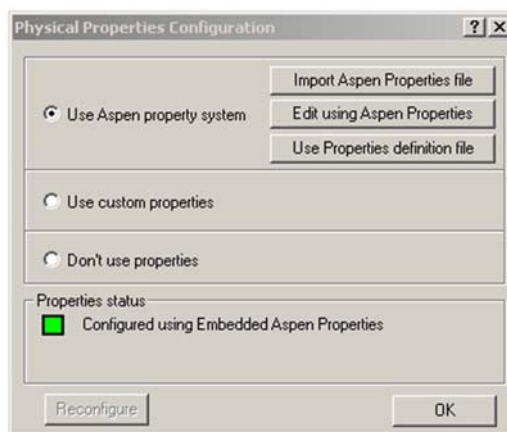


Figura U.37. Importación de lista de componentes.

Luego, aparece la siguiente ventana (Figura U.38) y se mueven los componentes disponibles a la columna de la derecha usando el botón ">". Clic en *Ok*.

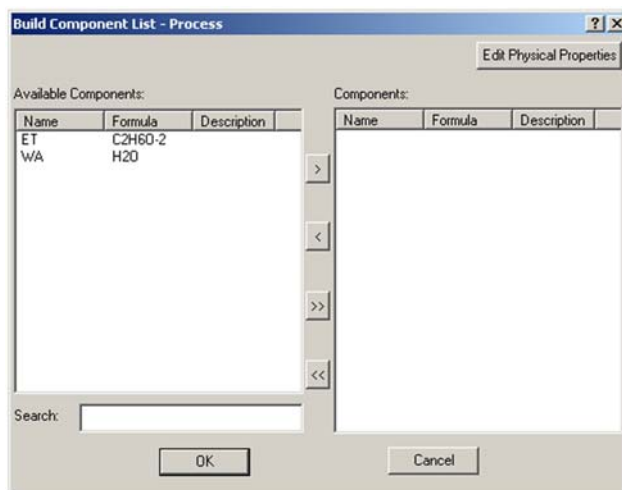


Figura U.38. Selección de componentes.

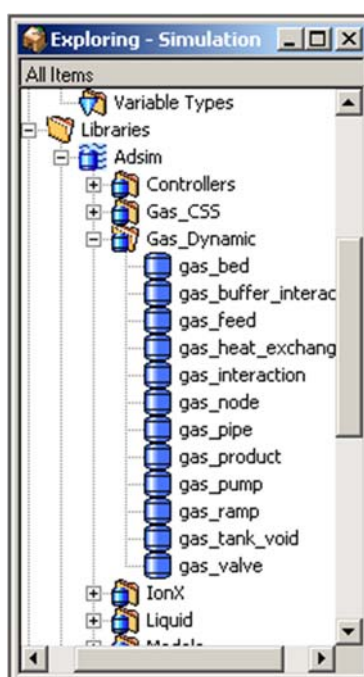


Figura U.39. Selección del modelo en Aspen Adsorption®.

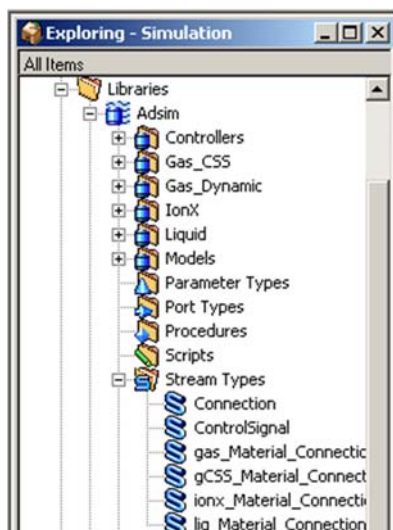


Figura U.40. Selección del tipo de corriente para unir los modelos.

B2.AllVariables Table			
	Value	Spec	Units
Avg_Composition_Fwd("ET")	0,984825	Free	kmol/kmol
Avg_Composition_Fwd("VVA")	0,015175	Free	kmol/kmol
Avg_Composition_Rev("ET")	0,0	Free	kmol/kmol
Avg_Composition_Rev("VVA")	0,0	Free	kmol/kmol
ComponentList	Molecularsieves		
F	0,104	Fixed	kmol/hr
H_Fwd	-231,623	Free	MJ/kmol
H_Rev	-231,623	Free	MJ/kmol
Model_Type	Reversible Pressu		
P	1,02	Fixed	atm
Process_Out.ComponentList	Molecularsieves		
Process_Out.F	2,88889e-005	Free	kmol/s
Process_Out.H	-231,623	Free	MJ/kmol
Process_Out.H1	-231,623	Free	MJ/kmol
Process_Out.P	1,03351	Free	bar
Process_Out.P1	1,03351	Free	bar
Process_Out.T	347,84	Free	K
Process_Out.T1	347,84	Free	K
Process_Out.Y1("ET")	0,9872	Free	kmol/kmol
Process_Out.Y1("VVA")	0,0128	Free	kmol/kmol
Process_Out.Y("ET")	0,9872	Free	kmol/kmol
Process_Out.Y("VVA")	0,0128	Free	kmol/kmol
Process_Out_H1_GJ	-0,231623	Free	GJ/kmol
Process_Out_T1_C	74,69	Free	C
T_Fwd	74,69	Fixed	C
T_Rev	347,84	Free	K
Total_Component_Fwd("ET")	2,18856	Initial	kmol
Total_Component_Fwd("VVA")	0,0337232	Initial	kmol
Total_Component_Rev("ET")	0,0	Initial	kmol
Total_Component_Rev("VVA")	0,0	Initial	kmol
Total_Energy_Fwd	-1531,96	Initial	MJ
Total_Energy_Rev	0,0	Initial	MJ
Total_Material_Fwd	2,22228	Initial	kmol
Total_Material_Rev	0,0	Initial	kmol
UserNotes			
Y_Fwd("ET")	0,9872	Fixed	kmol/kmol
Y_Fwd("VVA")	0,0128	Fixed	kmol/kmol

Figura U.41. Configuración de corriente de entrada S17.

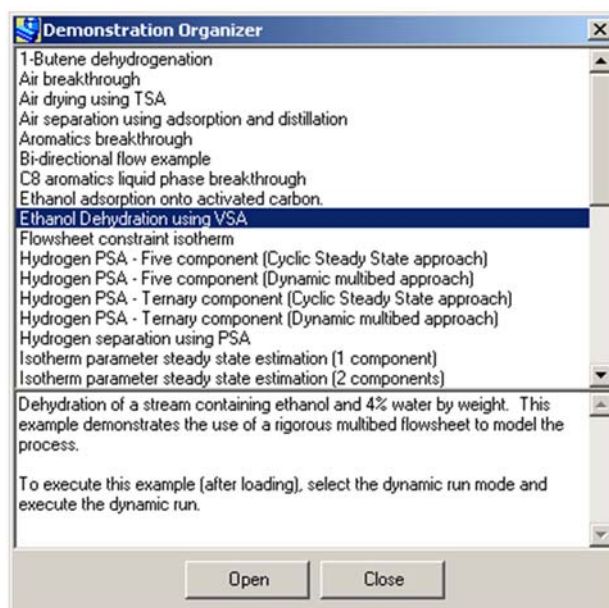


Figura U.42. Lista de plantillas demostrativas de Aspen Adsorption®.

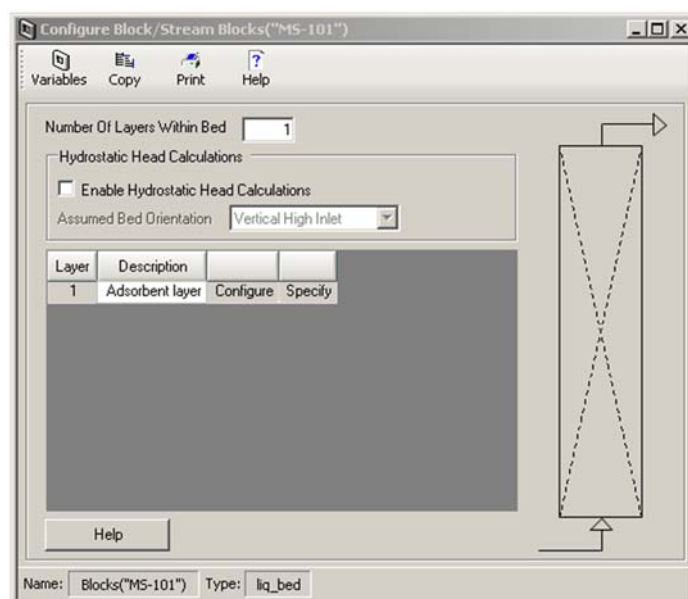
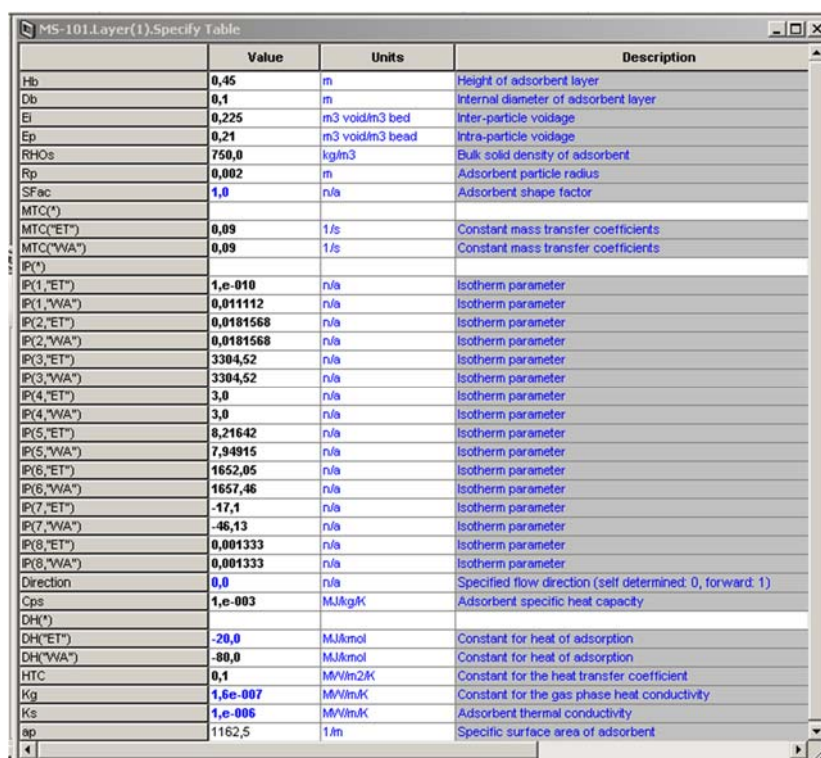


Figura U.43. Configuración del lecho de adsorción MS-101.



	Value	Units	Description
Hb	0,45	m	Height of adsorbent layer
Db	0,1	m	Internal diameter of adsorbent layer
Ei	0,225	m3 void/m3 bed	Inter-particle voidage
Ep	0,21	m3 void/m3 bead	Intra-particle voidage
RHOs	750,0	kg/m3	Bulk solid density of adsorbent
Rp	0,002	m	Adsorbent particle radius
SFac	1,0	n/a	Adsorbent shape factor
MTC(*)			
MTC("ET")	0,09	1/s	Constant mass transfer coefficients
MTC("WA")	0,09	1/s	Constant mass transfer coefficients
IP(*)			
IP(1,"ET")	1,e-010	n/a	Isotherm parameter
IP(1,"WA")	0,011112	n/a	Isotherm parameter
IP(2,"ET")	0,0181568	n/a	Isotherm parameter
IP(2,"WA")	0,0181568	n/a	Isotherm parameter
IP(3,"ET")	3304,52	n/a	Isotherm parameter
IP(3,"WA")	3304,52	n/a	Isotherm parameter
IP(4,"ET")	3,0	n/a	Isotherm parameter
IP(4,"WA")	3,0	n/a	Isotherm parameter
IP(5,"ET")	8,21642	n/a	Isotherm parameter
IP(5,"WA")	7,94915	n/a	Isotherm parameter
IP(6,"ET")	1652,05	n/a	Isotherm parameter
IP(6,"WA")	1657,46	n/a	Isotherm parameter
IP(7,"ET")	-17,1	n/a	Isotherm parameter
IP(7,"WA")	-46,13	n/a	Isotherm parameter
IP(8,"ET")	0,001333	n/a	Isotherm parameter
IP(8,"WA")	0,001333	n/a	Isotherm parameter
Direction	0,0		Specified flow direction (self determined: 0, forward: 1)
Cps	1,e-003	MJ/kgK	Adsorbent specific heat capacity
DH(*)			
DH("ET")	-20,0	MJ/mol	Constant for heat of adsorption
DH("WA")	-80,0	MJ/mol	Constant for heat of adsorption
HTC	0,1	MW/m2K	Constant for the heat transfer coefficient
kg	1,6e-007	MW/mK	Constant for the gas phase heat conductivity
ks	1,e-006	MW/mK	Adsorbent thermal conductivity
ap	1162,5	1/m	Specific surface area of adsorbent

Figura U.44. Parámetros para configuración de lecho de adsorción MS-101.

U.3. Análisis de Costes

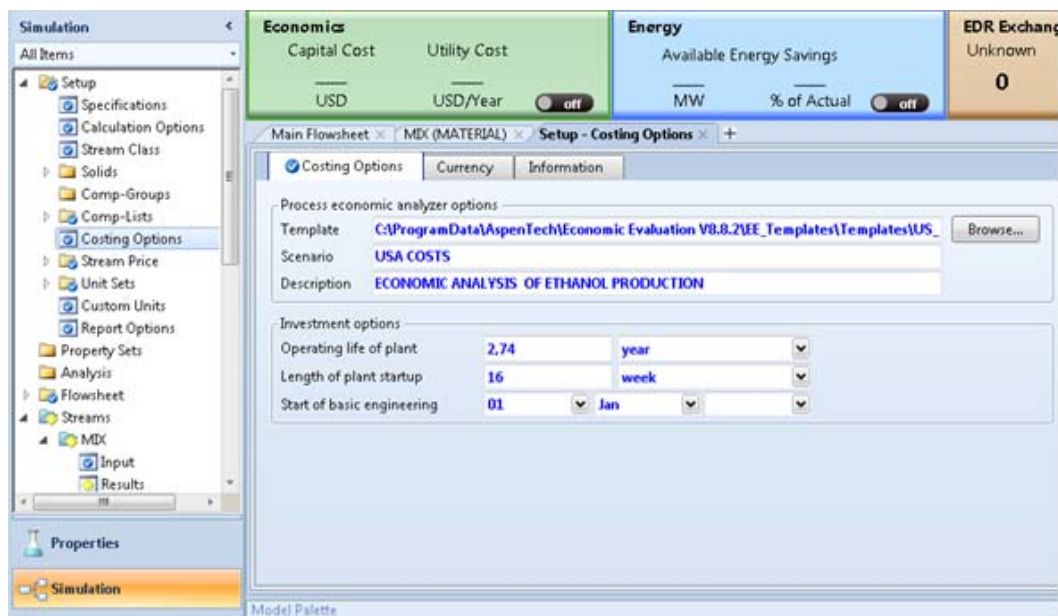
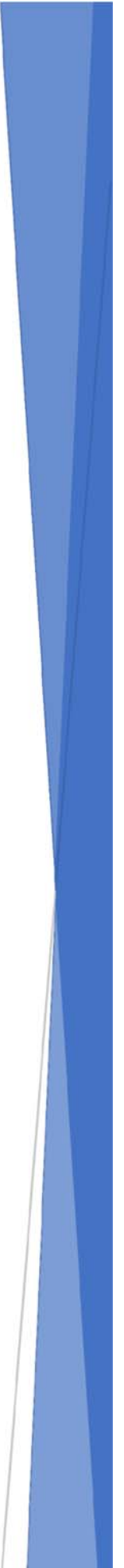


Figura U.45. Análisis económico en Aspen Plus®.

Bibliografía



7. Bibliografía

- Aarden, F. (2001). *Adsorption on heterogeneous porous materials: equilibria and kinetics*. [Technische Universiteit Eindhoven.].
<https://doi.org/https://doi.org/10.6100/IR545176>
- Acorsi, R. L., De Giovanni, M. Y. G., Andrade, C. M. G., & Olivo, J. E. (2022). Modeling and Simulation of Batch Sugarcane Alcoholic Fermentation Using the Metabolic Model. *Fermentation*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/fermentation8020082>
- Agblevor, F. A., Hames, B. R., Schell, D., & Chum, H. L. (2007). Analysis of biomass sugars using a novel HPLC method. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 136(3), 309–326. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-9028-4>
- Agrocalidad. (2012). *Buenas prácticas agrícolas para cacao resolución técnica N°0183*.
- Albarracín, K. G., Jaramillo, L. I., & Albuja, M. (2015). Obtención de Bioetanol Anhidro a Partir de Paja (Stipa ichu). *Revista Politécnica*, 36(1).
- Al-Malah, K. I. (2016). Aspen Process Economic Analyzer (APEA). In *Aspen Plus®* (pp. 523–564). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781119293644.ch17>
- Almas, S. (2014). Biofuel. *Journal of Civil Engineering and Environmental Technology*, 1(5), 91–95.
- Amiri, M. J., Khozaei, M., & Gil, A. (2019). Modification of the Thomas model for predicting unsymmetrical breakthrough curves using an adaptive neural-based fuzzy inference system. *Journal of Water and Health*, 17(1), 25–36.
<https://doi.org/10.2166/wh.2019.210>
- Amorim, H. V., Lopes, M. L., de Castro Oliveira, J. V., Buckeridge, M. S., & Goldman, G. H. (2011). Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. *Applied*

- Microbiology and Biotechnology*, 91(5), 1267–1275.
<https://doi.org/10.1007/s00253-011-3437-6>
- ANECACAO. (2016). Exportación Ecuatoriana de Cacao - 2015. *Monthly*, 6.
- Anvoh, K. Y. B., Bi, A. Z., & Gnakri, D. (2009). Production and characterization of juice from mucilage of cocoa beans and its transformation into marmalade. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8(2), 129–133. <https://doi.org/10.3923/pjn.2009.129.133>
- Ardhana, M. M., & Fleet, G. H. (2003). The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1–2), 87–99. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00081-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00081-3)
- Arévalo, V., Rodríguez, M. A., Hernández, M. A., & Valdez, V. (2004). Propuesta de un método económico para la cuantificación de alcohol etílico. *Bioquímica*, 29(1), 126.
- Ariyajaroenwong, P., Laopaiboon, P., Salakkam, A., Srinophakun, P., & Laopaiboon, L. (2016). Kinetic models for batch and continuous ethanol fermentation from sweet sorghum juice by yeast immobilized on sweet sorghum stalks. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 66, 210–216.
<https://doi.org/10.1016/j.jtice.2016.06.023>
- Aspen Technology Inc. (2010). Introduction to Aspen Adsorption. In *AspenTech*.
- Aspen Tecnology. (2018). *Aspen Plus User Guide*. 99–101.
- Aspentech. (2004). *User Models Who Should Read this Guide*.
- Aspentech. (2005). *Aspen Custom Modeler 2004.1 Modeling Language Reference Guide*. 139.
- Balladares, C., Chóez-Guaranda, I., García, J., Sosa, D., Pérez, S., González, J. E., Viteri, R., Barragán, A., Quijano-Avilés, M., & Manzano, P. (2016). Physicochemical characterization of Theobroma cacao L. sweatings in Ecuadorian coast. *Emirates*

Journal of Food and Agriculture, 28(10), 741–745.

<https://doi.org/10.9755/ejfa.2016-02-187>

Beena, J., Jesy, E., & Nedumpara, R. (2014). Lyophilization/Freeze Drying - A review.

World Journal of Pharmaceutical Research, 3(3), 5041–5048.

Benyahia, K., Benyounes, H., & Shen, W. (2014). Energy evaluation of ethanol

dehydration with glycol mixture as entrainer. *Chemical Engineering and*

Technology, 37(6), 987–994. <https://doi.org/10.1002/ceat.201300872>

Benz, G. (2011). Bioreactor Design for Chemical Engineers -

BioreactorDesignForChEs.pdf. *CEP Magazine*, August, 21–26.

Berbegal, C., Khomenko, I., Russo, P., Spano, G., Fragasso, M., Biasioli, F., & Capozzi,

V. (2020). PTR-ToF-MS for the online monitoring of alcoholic fermentation in

wine: Assessment of VOCs variability associated with different combinations of

saccharomyces/non-saccharomyces as a case-study. *Fermentation*, 6(2).

<https://doi.org/10.3390/FERMENTATION6020055>

Berthomieu, C., & Hienerwadel, R. (2009). Fourier transform infrared (FTIR)

spectroscopy. *Photosynthesis Research*, 101(2–3), 157–170.

<https://doi.org/10.1007/s11120-009-9439-x>

Cardona, C. A., Sánchez, Ó. J., Montoya, M. I., & Quintero, J. A. (2005). Simulación de

los procesos de obtención de etanol a partir de caña de azúcar y maíz. *Scientia et*

Technica, 187–192.

Carvalho, F. P., Duarte, W. F., Dias, D. R., Piccoli, R. H., & Schwan, R. F. (2015).

Interação de *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactococcus lactis* na fermentação e

qualidade da cachaça artesanal. *Acta Scientiarum - Agronomy*, 37(1), 51–60.

<https://doi.org/10.4025/actasciagron.v37i1.18397>

Castelain, S. (2013). Tequila: Guía sobre levaduras y fermentación para la industria

tequilera. *Fermentis*.

- CFN. (2018). Ficha Sectorial: Cacao y Chocolate GDGE-Subg. de análisis de información. *Reporte de La Corporación Financiera Nacional*, 30.
- Chávez, E., & Leandro, M. (2021). Muestreo de suelo, hojas y almendras para análisis de cadmio en cultivos de cacao. In *Caja de herramientas para la privención y mitigación de la contaminación de cadmio en la cadena de Cacao-Ecuador*. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (MAGAP).
- Chen, X. (2015). Modeling of experimental adsorption isotherm data. *Information (Switzerland)*, 6(1), 14–22. <https://doi.org/10.3390/info6010014>
- Chowdhury, S., & Saha, P. Das. (2013). Artificial neural network (ANN) modeling of adsorption of methylene blue by NaOH-modified rice husk in a fixed-bed column system. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(2), 1050–1058. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-0912-2>
- CNP. (2017). *Plan Nacional de Desarrollo 2017-2021*.
- Cooney, C. L. (1983). Bioreactors: Design and Operation. *Science*, 219(4585), 728–733. <https://doi.org/10.1126/science.219.4585.728>
- Corning. (1976). *Manual Destillation Equipment*.
- Creed, J., Brockhoff, C., & Martin, T. D. (1994). Method 200.8 Determination of Trace Elements in Waters and Wastes by Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry Environmental Monitoring Systems Laboratory Office of Research and Development U. *US Environmental Protection Agency*, 4, 1–57.
- Criscuoli, A. (2013). Azeotropic Distillation. In *Encyclopedia of Membranes* (pp. 1–2). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-40872-4_40-3
- Cury, K., Aguas, Y., Martínez, A., Olivero, R., & Chams, 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>

- Cysewski, G. R., & Wilke, C. R. (1978). Process design and economic studies of alternative fermentation methods for the production of ethanol. *Biotechnology and Bioengineering*, 20(9), 1421–1444. <https://doi.org/10.1002/bit.260200908>
- Datta, A., Hossain, A., & Roy, S. (2019). An overview on biofuels and their advantages and disadvantages. *Asian Journal of Chemistry*, 31(8), 1851–1858. <https://doi.org/10.14233/ajchem.2019.22098>
- De la Cruz, J., Vargas, M., & Del Angel, O. (2009). CACAO: Operaciones Poscosecha. *Instituto Tecnológico de Veracruz*, 1–78.
- Demirbas, A. (2008). Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. *Energy Conversion and Management*, 49(8), 2106–2116. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2008.02.020>
- Dlangamandla, N., Ntwampe, S. K. O., Angadam, J. O., Chidi, B. S., & Mewa-Ngongang, M. (2019). Kinetic parameters of *saccharomyces cerevisiae* alcohols production using *nepenthes mirabilis* pod digestive fluids-mixed agro-waste hydrolysates. *Fermentation*, 5(1). <https://doi.org/10.3390/fermentation5010010>
- Dodić, J., Vučurović, D., Dodić, S., Grahovac, J., Popov, S., & Nedeljković, N. (2012). Kinetic modelling of batch ethanol production from sugar beet raw juice. *Applied Energy*, 99, 192–197. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.05.016>
- Donati, G., & Paludetto, R. (1997). Scale up of chemical reactors: from pilots to plants. In *Catalysis Today* 34 (pp. 483–533).
- Eby, J. M., & Peretti, S. W. (2015). Characterization, performance, and applications of a yeast surface display-based biocatalyst. *RSC Advances*, 5(25), 19166–19175. <https://doi.org/10.1039/C4RA16304D>
- Ehiomogue, P., Ahuchaogu, I. I., & AHANEKU, I. E. (2021). Review of Adsorption Isotherms Models. *Acta Technica Corviniensis-Bulletin of Engineering*, 14(4).

- Elika. (2009). Fichas sustancias indeseables alimentación animal. *Fundación Vasca Para La Seguridad Agroalimentaria*, 1, pags 11. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2008-0213-01>
- EPA. (1971). *Method 352.1: Nitrogen, Nitrate (Colorimetric, Brucine) by Spectrophotometer*. 5.
- EPA. (1974). EPA Method 415.1: Total organic carbon (combustion or oxidation). *EPA Test Method*, 3.
- Erique, G. (2017). *Viabilidad económica del reemplazo de la gasolina*. Escuela Politécnica Nacional. Ecuador.
- ESIN. (2014). *Atlas bioenergético de la República de Ecuador*.
- Faizal, A. M., & Kutty, S. R. M. (2014). Modelling of Adams-Bohart and Yoon-Nelson on the removal of oil from water using microwave incinerated rice husk ash (MIRHA). *Applied Mechanics and Materials*, 625(September), 788–791. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMM.625.788>
- Farias, D., De Andrade, R. R., & Maugeri-Filho, F. (2014). Kinetic modeling of ethanol production by *Scheffersomyces stipitis* from xylose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(1), 361–379. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0546-y>
- Ferreira da Silva, L., Silva Eustacio, R. da, Fraguas Neto, M. R., de Souza Silva, C., Mendes, M. F., & Siqueira Pereira, C. de S. (2017). Simulation of the Extractive Distillation Process of Ethanol-Water- Propylene Glycol System. *Journal of Thermodynamics & Catalysis*, 08(03). <https://doi.org/10.4172/2157-7544.1000191>
- Ferreira, M. M., Del, M., Schwab, C., Gerard, L. M., Davies, C. V., Cristina, M., Arteaga, C., & Leal, A. S. (2014). Nutritional requirements of a *Saccharomyces cerevisiae* starter culture used in the elaboration of wine from orange. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 34, 38–42.

- García, F. (2018). *Política Energética y NDCs en América Latina y el Caribe. Evaluación de las políticas actuales de desarrollo energético de la región, como contribución al cumplimiento de los compromisos en materia de cambio climático.*
- García, F. (2019). Efecto del cambio climático en la eficiencia de las centrales termoeléctricas. *Revista de Energía de Latinoamérica y El Caribe*, 3(1), 11–20.
- Garzón, S., & Hernández, C. (2016). *Estudio comparativo para la producción de etanol entre Saccharomyces cerevisiae silvestre, Saccharomyces cerevisiae ATCC 9763 y Candida utilis ATCC 9950.* Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia.
- Ge, X. M., & Bai, F. W. (2006). Intrinsic kinetics of continuous growth and ethanol production of a flocculating fusant yeast strain SPSC01. *Journal of Biotechnology*, 124(2), 363–372. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.12.029>
- Gerbaud, V., Rodriguez-Donis, I., Hegely, L., Lang, P., Denes, F., & You, X. Q. (2019). Review of extractive distillation. Process design, operation, optimization and control. *Chemical Engineering Research and Design*, 141, 229–271. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2018.09.020>
- Giampietro, M., & Mayumi, K. (2009). *The Biofuel Delusion: The fallacy of large scale agro-biofuels production.* Earthscan Research Edition.
- Gil, I. D., García, L. C., & Rodríguez, G. (2014). Simulation of ethanol extractive distillation with mixed glycols as separating agent. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 31(1), 259–270. <https://doi.org/10.1590/S0104-66322014000100024>
- Guella, F., Aldoori, H., & Benyounes, H. (2018). *Extractive Distillation of Ethanol-Water Using Ionic Liquids as Entrainers.* November. <https://doi.org/10.33422/8rest.2018.11.48>

- Gupta, A., & Verma, J. P. (2015). Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41, 550–567. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.08.032>
- Hartanto, D., Handayani, P. A., Sutrisno, A., Anugrahani, V. W., Mustain, A., & Khoiroh, I. (2019). Isopropyl Alcohol Purification through Extractive Distillation using Glycerol as an Entrainer: Technical Performances Simulation and Design. *Jurnal Bahan Alam Terbarukan*, 8(2), 133–143. <https://doi.org/10.15294/jbat.v8i2.23477>
- Hashimoto, A., Takada, S., Motonaga, Y., Nakanishi, K., & Kameoka, T. (2001). Spectroscopic Determination of Acid and Sugar Content in Fruit Juice. *IFAC Proceedings Volumes*, 34(28), 211–216. [https://doi.org/10.1016/s1474-6670\(17\)32850-1](https://doi.org/10.1016/s1474-6670(17)32850-1)
- Heller, D., & Einfalt, D. (2022). Reproducibility of Fruit Spirit Distillation Processes. *Beverages*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/beverages8020020>
- Hong, D., Lee, G., Jung, N. C., & Jeon, M. (2013). Fast automated yeast cell counting algorithm using bright-field and fluorescence microscopic images. *Biological Procedures Online*, 15(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1480-9222-15-13>
- Höök, M., & Tang, X. (2013). Depletion of fossil fuels and anthropogenic climate change-A review. *Energy Policy*, 52, 797–809. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2012.10.046>
- Howlett, P., & Pudney, P. (2006). *Advances in Industrial Control*.
- Humbird, D., Davis, R., Tao, L., Kinchin, C., Hsu, D., Aden, A., Schoen, P., Lukas, J., Olthof, B., Worley, M., Sexton, D., & Dudgeon, D. (2011). Process Design and Economics for Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol: Dilute-Acid Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Corn Stover. *National Renewable Energy Laboratory, May*, 1–147. <https://doi.org/10.2172/1107470>

- Hunpinyo, P., Narataruksa, P., Tungkamani, S., Pana-Supphamassadu, K., & Chollacoop, N. (2013). Evaluation of Techno-economic feasibility Biomass-to-energy by Using ASPEN Plus®: A Case Study of Thailand. *Energy Procedia*, 42, 640–649.
<https://doi.org/10.1016/j.egypro.2013.11.066>
- IEA. (2018). *World Energy Balances. Overview*.
- IEA. (2019a). The future of fuel: The future of hydrogen. *Fuel Cells Bulletin*, 2019(1), 12–15. [https://doi.org/10.1016/S1464-2859\(12\)70027-5](https://doi.org/10.1016/S1464-2859(12)70027-5)
- IEA. (2019b). World Energy Outlook 2019. *World Energy Outlook 2019*, 1.
- Igbokwe, V. C., Ezugworie, F. N., Onwosi, C. O., Aliyu, G. O., & Obi, C. J. (2022). Biochemical biorefinery: A low-cost and non-waste concept for promoting sustainable circular bioeconomy. *Journal of Environmental Management*, 305(March 2021), 114333. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.114333>
- INEN. (1983). NTE INEN 1087: Bebidas gaseosas. *Determinación del pH*. 4–9.
- INEN. (2002). NTE INEN 2 322; Bebidas Alcoholicas. Cerveza. *Determinación De Alcohol*.
- INEN. (2008). Jugos, pulpas, concentrados néctares, bebidas de frutas y vegetales. Requisitos. In *Norma Técnica Ecuatoriana 2337:2008*.
- INEN. (2012). NTE INEN 13: Leche. Determinación de la acidez titulable. *Instituto Ecuatoriano de Normalización*, 3, 1–7.
- INEN. (2013a). Carne y productos cárnicos. Método para la determinación de zinc, cobre, plomo, estaño y arsénico por espectrometría de absorción atómica. *Norma Técnica Ecuatoriana Instituto Ecuatoriano de Normalización 2682, I*, 15.
- INEN. (2013b). NTE INEN-ISO 750:2013: Productos vegetales y de frutas - Determinación de la acidez titulable (IDT). 1998, 1–5.

- loelovich, M. (2017). *Short Overview of Methods for Calculation of Combustion Heat*. April. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.16303.94884>
- Jaywant, S. A., Singh, H., & Arif, K. M. (2022). Sensors and Instruments for Brix Measurement: A Review. *Sensors*, 22(6), 1–20. <https://doi.org/10.3390/s22062290>
- Jiménez, F., & Bonilla, M. del R. (2012). *Aprovechamiento de mucílago y maguey de cacao (Theobroma cacao) fino de aroma para la elaboración de mermelada*. Universidad Estatal de Bolívar.
- Jin, H., Liu, R., & He, Y. (2012). Kinetics of Batch Fermentations for Ethanol Production with Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* Growing on Sweet Sorghum Stalk Juice. *Procedia Environmental Sciences*, 12, 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2012.01.258>
- Kadow, D., Niemenak, N., Rohn, S., & Lieberei, R. (2015). Fermentation-like incubation of cocoa seeds (*Theobroma cacao* L.) - Reconstruction and guidance of the fermentation process. *LWT - Food Science and Technology*, 62(1), 357–361. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.015>
- Kallis, M., Sideris, K., Kopsahelis, N., Bosnea, L., Kourkoutas, Y., Terpou, A., & Kanellaki, M. (2019). Pistacia terebinthus resin as yeast immobilization support for alcoholic fermentation. *Foods*, 8(4), 1–17. <https://doi.org/10.3390/foods8040127>
- Kalvatchev, Z., Garzaro, D., & Guerra Cedezzo, F. (1998). *Theobroma cacao* L.: Un nuevo enfoque para nutrición y salud. *Revista Agroalimentaria*, 4(6), 23–25.
- Kamal al-Malah, I. M. (2017). Chemical Engineering Applications. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53, Issue 9).

- Karakashev, S. I., & Grozdanova, M. V. (2012). Foams and antifoams. *Advances in Colloid and Interface Science*, 176–177(April), 1–17.
<https://doi.org/10.1016/j.cis.2012.04.001>
- Katzen, R., & Madson, P. W. (2009). Chapter 18 Ethanol distillation: the fundamentals. *The Alcohol Textbook: A Reference for the Beverage, Fuel and Industrial Alcohol Industries*, 269–288.
- Kaur, I., & Sharma, A. D. (2021). Bioreactor: Design, Functions and Fermentation innovations. *Research & Reviews in Biotechnology & Biosciences Journal*, 8(2), 116–125.
- Khongsay, N., Laopaiboon, L., Jaisil, P., & Laopaiboon, P. (2012). Optimization of agitation and aeration for very high gravity ethanol fermentation from sweet sorghum juice by *saccharomyces cerevisiae* using an orthogonal array design. *Energies*, 5(3), 561–576. <https://doi.org/10.3390/en5030561>
- Kita, Y., Tokuoka, S. M., Oda, Y., & Shimizu, T. (2022). TRACES: A Lightweight Browser for Liquid Chromatography–Multiple Reaction Monitoring–Mass Spectrometry Chromatograms. *Metabolites*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/metabo12040354>
- Kovačević, M. (2015). *Morphological and physiological characteristics of the yeast Saccharomyces cerevisiae cells differing in the life span*. 87.
- Laksmono, J. A., Pangesti, U. A., Sudibandriyo, M., Haryono, A., & Saputra, A. H. (2018). Adsorption capacity study of ethanol-water mixture for zeolite, activated carbon, and polyvinyl alcohol. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 105(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/105/1/012025>
- Lara, J., Tejada, C., Villabona, Á., Arrieta, A., & Granados Conde, C. (2016). Adsorción de plomo y cadmio en sistema continuo de lecho fijo sobre residuos de cacao / Adsorption of lead and cadmium in continuous of fixed bed on cocoa waste / Adsorção de chumbo e cádmio no sistema de leito fixo contínua relativa aos resíduos de cacau. *Revista ION*, 29(2), 113.

- Lauzurique, Y., Zumalacárregui de Cárdenas, L., Pérez Ones, O., & Curbelo Rodríguez, A. (2016). Simulación de la destilación extractiva para la obtención de etanol anhidro empleando glicoles. *Ciencia, Docencia y Tecnología*, 27(53), 362–383.
- Lee, C. G., Kim, J. H., Kang, J. K., Kim, S. B., Park, S. J., Lee, S. H., & Choi, J. W. (2015). Comparative analysis of fixed-bed sorption models using phosphate breakthrough curves in slag filter media. *Desalination and Water Treatment*, 55(7), 1795–1805. <https://doi.org/10.1080/19443994.2014.930698>
- Lee, J. S., Park, E. H., Kim, J. W., Yeo, S. H., & Kim, M. D. (2013). Growth and fermentation characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* NK28 isolated from kiwi fruit. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(9), 1253–1259. <https://doi.org/10.4014/jmb.1307.07050>
- Lee, R. A., & Lavoie, J. M. (2013). From first- to third-generation biofuels: Challenges of producing a commodity from a biomass of increasing complexity. *Animal Frontiers*, 3(2), 6–11. <https://doi.org/10.2527/af.2013-0010>
- León, G. (2018). *Desarrollo de una Herramienta Libre para la Simulación Rigurosa de Columnas de Destilación en Estado Estacionario* (Issue Ingeniería Química). Los Andes.
- Leotesco, R. M. (2019). CAPEX y OPEX : la gestión de las inversiones empresariales. *Técnica Contable y Financiera*, 1(16), 1–13.
- Li, T., Chen, X. Bin, Chen, J. C., Wu, Q., & Chen, G. Q. (2014). Open and continuous fermentation: Products, conditions and bioprocess economy. *Biotechnology Journal*, 9(12), 1503–1511. <https://doi.org/10.1002/biot.201400084>
- Liu, S. (2017). *Bioprocess Engineering*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2015-0-04891-2>

- Loviso, C. L., & Libkind, D. (2019). Synthesis and regulation of flavor compounds derived from brewing yeast: fusel alcohols. *Revista Argentina de Microbiología*, 51(4), 386–397. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.08.006>
- Lwanga, S., & Lemeshow, S. (1991). *Sample Size Determination in Health Studies*. World Health Organization.
- Maicas, S. (2020). The Role of Yeasts in Fermentation Processes. *Microorganisms*, 8(8), 1142. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081142>
- Mairhofer, J., & Gross, J. (2017). Modeling of interfacial properties of multicomponent systems using density gradient theory and PCP-SAFT. *Fluid Phase Equilibria*, 439, 31–42. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2017.02.009>
- Martínez, J. A., & Montoya, N. J. (2013). Preliminary analysis of the feasibility to obtain bioethanol from the organic fraction of municipal solid waste. *Producción + Limpia*, 8(2), 72–84.
- Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S.-I., & Lee, Y. C. (2005). Carbohydrate analysis by a phenol–sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry*, 339(1), 69–72. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.12.001>
- McCabe, W., Smith, J., & Harriott, P. (2007). Operaciones Unitarias en Ingeniería Química. In *Operaciones unitarias ingeniería química* (7th ed., Vol. 53, Issue 9).
- Mihul, G., & Ashish, K. (2019). Simulation of ethanol production process using aspen plus and optimization based on response surface methodology. *Research Journal of Chemistry and Environment*, 23(4), 81–89.
- Mofijur, M., Masjuki, H. H., Kalam, M. A., Ashrafur Rahman, S. M., & Mahmudul, H. M. (2015). Energy scenario and biofuel policies and targets in ASEAN countries. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 46, 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.02.020>

- Mostacedo, B., & Fredericksen, T. (2000). *Manual de Métodos Básicos de Muestreo y Análisis en Ecología Vegetal*. BOLFOR.
- Muslim Altufaily, M. A., AL-Mansori, N. J., & Manthoor AL-Qaraghulee, A. F. (2019). Mathematical Modeling of Fixed-Bed Columns for the Adsorption of Methylene Blue on to Fired Clay Pot. *International Journal of ChemTech Research*, 12(02), 70–80. <https://doi.org/10.20902/ijctr.2019.120210>
- Naik, S. N., Goud, V. V., Rout, P. K., & Dalai, A. K. (2010). Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 578–597. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.003>
- Noriega-Medrano, L. J., Vega-Estrada, J., Ortega-López, J., Ruiz-Medrano, R., Cristiani-Urbina, E., & Montes-Horcasitas, M. del C. (2016). Alternative non-chromatographic method for alcohols determination in *Clostridium acetobutylicum* fermentations. *Journal of Microbiological Methods*, 126, 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.05.001>
- Nuanpeng, S., Laopaiboon, L., Srinophakun, P., Klanrit, P., Jaisil, P., & Laopaiboon, P. (2011). Ethanol production from sweet sorghum juice under very high gravity conditions: Batch, repeated-batch and scale up fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, 14(1), 1–12. <https://doi.org/10.2225/vol14-issue1-fulltext-2>
- Obaid, S. A. (2020). Langmuir, Freundlich and Tamkin Adsorption Isotherms and Kinetics for the Removal Aartichoke Tournefortii Straw from Agricultural Waste. *Journal of Physics: Conference Series*, 1664(1), 0–9. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1664/1/012011>
- Okpokwasili, G. C., & Nweke, C. O. (2005). *Okpokwasili e Nkweke 2005.pdf*. 5(4), 305–317.
- Olade. (2021). *Panorama energético de América Latina y el Caribe* (T. Castillo, F. García, T. Rivadeneira, K. Segura, & M. Yujato, Eds.; Issue July). Indigo Express.

- Omitola, O. B., Abonyi, M. N., Akpomie, K. G., & Dawodu, F. A. (2022). Adams-Bohart, Yoon-Nelson, and Thomas modeling of the fix-bed continuous column adsorption of amoxicillin onto silver nanoparticle-maize leaf composite. *Applied Water Science*, 12(5), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13201-022-01624-4>
- Onuki, S., Koziel, J. A., Van Leeuwen, J., Jenks, W. S., Greweii, D., & Cai, L. (2008). Ethanol production, purification, and analysis techniques: A review. *American Society of Agricultural and Biological Engineers Annual International Meeting 2008, ASABE 2008*, 12, 7210–7221. <https://doi.org/10.13031/2013.25186>
- Ortega, G. C. (2013). Adsorción por lote y en una columna de lecho fijo del colorante B39 sobre carbón activado granular. *Prospectiva*, 11(1), 66. <https://doi.org/10.15665/rp.v11i1.28>
- Oyelami, S., & Adeboye, B. (2019). Design of an Ethanol Distillation Plant. *Journal of Scientific and Engineering Research*, 5(5)(October), 299–306.
- Pahari, S., Dorneles de Mello, M., Shah, M. S., Josephson, T. R., Ren, L., Nguyen, H. G. T., Van Zee, R. D., Tsapatsis, M., & Siepmann, J. I. (2022). Ethanol and Water Adsorption in Conventional and Hierarchical All-Silica MFI Zeolites. *ACS Physical Chemistry Au*, 2(2), 79–88. <https://doi.org/10.1021/acspyschemau.1c00026>
- Pal, Y., Raja, A., & Gopalakrishnan, K. (2020). Theoretical and experimental heat of combustion analysis of paraffin-based fuels as preburn characterization for hybrid rocket. *Journal of Aerospace Technology and Management*, 12(1), 1–18. <https://doi.org/10.5028/jatm.v12.1180>
- Parr Instrument Company. (2007). Introduction to Bomb Calorimetry. *Parr Instrument Company*, 483, 1–11.
- Pauzi, S., Ahmad, N., Yahya, M. F., & Arifin, M. A. (2018). The Effects of Antifoam Agent on Dead End Filtration Process. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 358(1). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/358/1/012038>

Petroecuador. (2018). *Informe Estadístico*.

Petroecuador. (2020). *Informe estadístico*.

Phukoetphim, N., Salakkam, A., Laopaiboon, P., & Laopaiboon, L. (2017). Kinetic models for batch ethanol production from sweet sorghum juice under normal and high gravity fermentations: Logistic and modified Gompertz models. *Journal of Biotechnology*, 243, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.12.012>

Pulyaeva, V. N., Kharitonova, N. A., & Kharitonova, E. N. (2020). Advantages and Disadvantages of the Production and Using of Liquid Biofuels. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 976(1). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/976/1/012031>

Ramos, F. D., Díaz, M. S., & Villar, M. A. (2016). Biocombustibles. *Universidad Nacional Del Sur-Conicet*, 25(147), 69–73.

Rashid, M. A. M., Rahman, M., Mahmud, A. O., Morshed, A. S. M., Haque, M. M., & Hossain, M. M. (2022). UV-Vis Spectrophotometer as an Alternative Technique for the Determination of Hydroquinone in Vinyl Acetate Monomer. *Photochem*, 2(2), 435–447. <https://doi.org/10.3390/photochem2020030>

Ribas, M., Hurtado, R., Domenech, F., Sabadi, R., & Garrido, N. (2010). A software for simulation of fermentation processes. *Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol.*, 27(January), 1–12.

Richelle, A. (2014). *Modelling, Optimization and Control of Yeast Fermentation Processes in Food Industry* [École polytechnique de Bruxelles Université libre de Bruxelles]. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.36071.14248>

Rodrigo, M., & Zulkarnaen, D. (2022). Mathematical Models for Population Growth with Variable Carrying Capacity: Analytical Solutions. *AppliedMath*, 2(3), 466–479. <https://doi.org/10.3390/appliedmath2030027>

- Romero Cortes, T., Cuervo-Parra, J. A., José Robles-Olvera, V., Rangel Cortes, E., & López Pérez, P. A. (2018). Experimental and Kinetic Production of Ethanol Using Mucilage Juice Residues from Cocoa Processing. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, 16(11). <https://doi.org/10.1515/ijcre-2017-0262>
- Saini, J. K., Saini, R., & Tewari, L. (2015). Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *3 Biotech*, 5(4), 337–353. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0246-5>
- Santo, E. F. do E., de Lima, L. K. F., Torres, A. P. C., de Oliveira, G., & Ponsano, E. H. G. (2013). Comparison between freeze and spray drying to obtain powder *Rubrivivax gelatinosus* biomass. *Food Science and Technology*, 33(1), 47–51. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612013005000008>
- Santos, D. I., Correia, M. J. N., Mateus, M. M., Saraiva, J. A., Vicente, A. A., & Moldão, M. (2019). Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy as a possible rapid tool to evaluate abiotic stress effects on pineapple by-products. *Applied Sciences (Switzerland)*, 9(19). <https://doi.org/10.3390/app9194141>
- Sanz Martínez, A. (2019). *Nuevas configuraciones de reactor para valorización energética conjunta de biogás e hidrógeno renovable*. Universidad de Zaragoza.
- Sarath Yadav, E., Indiran, T., Nayak, D., Aditya Kumar, C., & Selvakumar, M. (2019). Simulation study of distillation column using Aspen plus. *Materials Today: Proceedings*, 48(October), 330–337. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.07.609>
- 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>
- Saura, G., García, R., Otero, M., Martínez-Valdivieso, J., Bello, D., & Pérez, I. (2009). Experiencias en la producción de etanol a partir de jugos de caña mezclados.

- Parte I. Materias Primas. *ICIDCA: Sobre Los Derivados de La Caña de Azúcar*, 43(2), 42–46.
- Schiappacasse, E. A. (2013). Biorreactor para la producción de alimentos. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53, Issue 9).
- Schumacher, B. (2002). Methods for the Determination of Total Organic Carbon (TOC) in Soils and Sediments. In *EPA* (Vol. 32, Issue April).
- Se, K. W., Wahab, R. A., Syed Yaacob, S. N., & Ghoshal, S. K. (2019). Detection techniques for adulterants in honey: Challenges and recent trends. *Journal of Food Composition and Analysis*, 80(February), 16–32.
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.04.001>
- Seader, J., Henley, E., & Roper, K. (2006). Separation Process Principles. *Damascus University Publications*. (Vol. 1999, Issue December).
- Seguí, L., Alfranca, O., & Moeller, G. (2014). Metodología para el análisis técnico-económico de los sistemas de regeneración y reutilización de las aguas residuales. *Tecnología y Ciencias Del Agua*, 10(6), 01–24.
- Shahi, Z., & Khajeh Mehrizi, M. (2021). *Biofuel Production Technologies, Comparing the Biofuels and Fossil Fuels*. March, 1–27. https://doi.org/10.1007/978-981-33-4615-4_1
- Sharma, R., Garg, P., Kumar, P., Bhatia, S. K., & Kulshrestha, S. (2020). Microbial fermentation and its role in quality improvement of fermented foods. *Fermentation*, 6(4), 1–20. <https://doi.org/10.3390/fermentation6040106>
- Silva, A. C., Monforte, A. R., Teixeira, C. S., Martins, R., Fairbairn, S., & Bauer, F. F. (2014). Monitoring alcoholic fermentation: An untargeted approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(28), 6784–6793.
<https://doi.org/10.1021/jf502082z>

- Simkin, L., & Dibb, S. (2011). Segmenting the energy market: Problems and successes. *Marketing Intelligence & Planning*, 29(6), 580–592.
<https://doi.org/10.1108/02634501111166094>
- Singh, S. (2002). Refractive Index Measurement and its Applications. *Physica Scripta*, 65(2), 167–180. <https://doi.org/10.1238/physica.regular.065a00167>
- Slavić, G., Trgo, M., Rušić, D., Perić, J., & Medvidović, N. V. (2009). Application of the Yoon-Nelson Model and the Reactor Theory for Packed Beds on Zinc Uptake on. *Proceedings of the 3rd Croatian-Slovenian Symposium on Zeolites*, 85–88.
- Sobočan, G., & Glavič, P. (2000). Optimization of ethanol fermentation process design. *Applied Thermal Engineering*, 20(6), 529–543.
[https://doi.org/10.1016/S1359-4311\(99\)00042-3](https://doi.org/10.1016/S1359-4311(99)00042-3)
- Spaho, N. (2017). Distillation Techniques in the Fruit Spirits Production. *Distillation - Innovative Applications and Modeling*, August, 2008–2009.
<https://doi.org/10.5772/66774>
- Sultana, S., Jamil, N. M., Saleh, E. A. M., Yousuf, A., & Faizal, C. K. M. (2017). A mathematical model for ethanol fermentation from oil palm trunk sap using *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Physics: Conference Series*, 890(1).
<https://doi.org/10.1088/1742-6596/890/1/012050>
- Sunshine, I., & Nenad, R. (1953). Modification of Winnick's Method for Rapid Determination of Ethyl Alcohol in Biological Fluids. *Analytical Chemistry*, 25(4), 653–655. <https://doi.org/10.1021/ac60076a036>
- Tathe, A., Nikalje, A. P. G., & Ghodke, M. (2011). *Biocatalysis: A Brief Review*. *Asian Journal of Research in Chemistry*. 4(1), 1355.
- Tayyab, M., Noman, A., Islam, W., Waheed, S., Arafat, Y., Ali, F., Zaynab, M., Lin, S., Zhang, H., & Lin, W. (2018). Bioethanol production from lignocellulosic biomass by environment-friendly pretreatment methods: A review. *Applied Ecology and*

- Environmental Research*, 16(1), 225–249.
https://doi.org/10.15666/aeer/1601_225249
- Tazdaït, D., Abdi, N., Grib, H., Lounici, H., Pauss, A., & Mameri, N. (2013). Comparison of different models of substrate inhibition in aerobic batch biodegradation of malathion. *Turkish Journal of Engineering and Environmental Sciences*, 37(3), 221–230. <https://doi.org/10.3906/muh-1211-7>
- Thangprompan, P., Thanapimmetha, A., Saisriyoot, M., Laopaiboon, L., & Srinophakun, P. (2013). Production of ethanol from sweet sorghum juice using VHG technology: A simulation case study. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171(2), 294–314. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0365-1>
- Tiscione, N. B., Alford, I., Yeatman, D. T., & Shan, X. (2011). Ethanol analysis by headspace gas chromatography with simultaneous flame-ionization and mass spectrometry detection. *Journal of Analytical Toxicology*, 35(7), 501–511. <https://doi.org/10.1093/anatox/35.7.501>
- Torres, A. P., Oliveira, F. A. R., Silva, C. L. M., & Fortuna, S. P. (1994). The influence of pH on the kinetics of acid hydrolysis of sucrose. *Journal of Food Process Engineering*, 17(2), 191–208. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.1994.tb00335.x>
- Tzouanas, V., Morano, L. D., Pham, H., Khatiwada, A., & Lopez, J. (2020). Bioreactor design, automation and optimization - A multidisciplinary approach. *ASEE Annual Conference and Exposition, Conference Proceedings, 2020-June*. <https://doi.org/10.18260/1-2--33951>
- Udeye, V., Mopoung, S., Vorasingha, A., & Amornsakchai, P. (2009). Ethanol heterogeneous azeotropic distillation design and construction. *International Journal of Physical Sciences*, 4(3), 101–106.

- Vallejo, C., Díaz, R., Morales, W., Soria, R., Baren, C., & Vera, J. (2010). Use of cocoa mucilage, national and trinitarian type, in obtaining jelly. *Revista ESPAMCIENCIA*, 7(1), 51–58.
- Vásquez, Z. S., de Carvalho Neto, D. P., Pereira, G. V. M., Vandenberghe, L. P. S., de Oliveira, P. Z., Tiburcio, P. B., Rogez, H. L. G., Góes Neto, A., & Soccol, C. R. (2019). Biotechnological approaches for cocoa waste management: A review. *Waste Management*, 90, 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.04.030>
- Viesturs, D., & Melece, L. (2014). Advantages and disadvantages of biofuels: Observations in Latvia. *Engineering for Rural Development*, 13(January), 210–215.
- Vlaev, S. D., Pavlova, K., Rusinova-Videva, S., Georgieva, K., & Georgiev, D. (2016). Agitation effects and kinetic constants of exoglucomannan production by Antarctic yeast strain in a stirred tank bioreactor. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 30(4), 393–400. <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2015.2276>
- Vogel, H. C., & Todaro, C. (2014). *Fermentation and Biochemical Engineering Handbook*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2011-0-05779-4>
- Walker, G. M., & Stewart, G. G. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages. *Beverages*, 2(4), 1–12. <https://doi.org/10.3390/beverages2040030>
- Wang, Q., Yu, L., Liu, Y., Lin, L., Lu, R., Zhu, J., He, L., & Lu, Z. (2017). Methods for the detection and determination of nitrite and nitrate: A review. *Talanta*, 165, 709–720. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.12.044>
- Wang, Z., Li, Y., Guo, P., & Meng, W. (2016). Analyzing the Adaption of Different Adsorption Models for Describing the Shale Gas Adsorption Law. *Chemical Engineering and Technology*, 39(10), 1921–1932. <https://doi.org/10.1002/ceat.201500617>

- Wheals, A. (1999). Fuel ethanol after 25 years. *Trends in Biotechnology*, 17(12), 482–487. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(99\)01384-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(99)01384-0)
- Widmer, W. (2010). An improved method for analysis of biomass sugars and galacturonic acid by anion exchange chromatography. *Biotechnology Letters*, 32(3), 435–438. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-0162-7>
- Yamamoto, T., Kim, Y. H., Kim, B. C., Endo, A., Thongprachan, N., & Ohmori, T. (2012). Adsorption characteristics of zeolites for dehydration of ethanol: Evaluation of diffusivity of water in porous structure. *Chemical Engineering Journal*, 181–182, 443–448. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.11.110>
- Yan, X. F., Fan, X. R., Wang, Q., & Shen, Y. (2017). An adsorption isotherm model for adsorption performance of silver-loaded activated carbon. *Thermal Science*, 21(4), 1645–1649. <https://doi.org/10.2298/TSCI151202048Y>
- Yang, R. (2004). Adsorbents: Fundamentals and applications. In *Physics* (Vol. 677, Issue 1). John Wiley & Sons, Inc.
- Zamora, T., Prado, A., Capataz, J., Barrera, B., & Peña, J. (2014). Demostraciones prácticas de los retos y oportunidades de la producción de bioetanol de primera y segunda generación a partir de cultivos tropicales. *Educación Química*, 25(2), 122–127. [https://doi.org/10.1016/S0187-893X\(14\)70534-8](https://doi.org/10.1016/S0187-893X(14)70534-8)
- Zhang, L., Yang, B., & Zhang, W. (2015). Vapor-Liquid Equilibrium of Water + Ethanol + Glycerol: Experimental Measurement and Modeling for Ethanol Dehydration by Extractive Distillation. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 60(6), 1892–1899. <https://doi.org/10.1021/acs.jced.5b00116>