

Simulación y modelado de un proceso de producción de etanol por fermentación de los azúcares obtenidos de la cáscara de cacao empleando la levadura *Kluyveromyces marxianus* (DSM 5418).

Paula Andrea Galvis Gómez

Laura Isabel Salgar Duran

Trabajo de grado para optar al título de Ingeniero Químico

Director:

Daniel Ricardo Molina Velasco

Ph.D. en Química

Codirector:

Luis Guillermo Rueda Serrano

MSc. en Ingeniería Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas

Escuela de Ingeniería Química

Bucaramanga

2021

**DEDICATORIA**

A Dios padre que está en los cielos por permitirme cumplir una meta más en mi vida, sin él nada  
somos.

A mis padres Ivan Salgar y Lidia Duran por todo el apoyo incondicional, consejos y el esfuerzo  
realizado para permitirme sacar esta carrera adelante, este triunfo es de ustedes.

A mis hermanos por estar siempre y permitirme ser un ejemplo para ustedes.

A mis abuelas por sus oraciones y consejos, mil gracias.

A mis tíos y primos por abrirme las puertas de su casa, y apoyarme en este proceso.

A mis directores de trabajo de grado por la oportunidad y la confianza de permitirnos desarrollar  
este proyecto.

A la universidad industrial de Santander (Alma mater), por permitirme ser Ingeniero químico  
UIS.

Gracias.

**Laura Isabel Salgar Duran**

**DEDICATORIA**

A Dios y la virgen María por el don de la inteligencia y entendimiento ya que gracias a su guía  
fue posible culminar esta etapa.

A mis padres Luis Alejandro Galvis y Sandra Gómez por patrocinar mis sueños y ser mi  
principal apoyo. De ellos me llevo el amor por el trabajo y dedicación en todo lo que hago.

A mi abuela materna Lilia Velandia (QEPD) porque con su ejemplo me enseñó a ser una mujer  
compasiva y luchadora.

A mi querido novio Julian Franco quien estuvo presente en todo momento dando voz de aliento  
para poder terminar este proyecto de la mejor manera.

A mi compañera de tesis y amiga Laura Salgar, quien sin querer queriendo se convirtió en una  
amiga muy especial.

**Paula Andrea Galvis Gómez.**

**AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Industrial de Santander por habernos acogido en los laboratorios sede  
Guatiguara.

Al Director de proyecto Daniel Molina por su entrega y acompañamiento durante todas las  
etapas del proyecto.

Al Codirector Luis Guillermo Rueda por guiarnos y brindarnos de su conocimiento durante todo  
el desarrollo del proyecto.

Al Sistema General de Regalías y la planta Nextcoa por darnos la oportunidad de ser partícipes  
del proyecto.

A los integrantes del laboratorio 404 por su disposición y colaboración durante la fase de  
experimentación del proyecto.

**Tabla de contenido**

	<b>Pág.</b>
Introducción.....	12
1 Estado del Arte.....	14
1.1 Generalidades de la obtención de licor de azúcares.....	14
1.1.1 Fuente de carbono.....	14
1.1.2 Licor de azúcares.....	15
1.2 Generalidades del proceso de producción de etanol.....	16
1.2.1 Microorganismo.....	16
1.2.2 Cinética de fermentación.....	16
1.3 Generalidades de la deshidratación de etanol.....	20
2 Objetivos.....	22
2.1 Objetivo General.....	22
2.2 Objetivos Específicos.....	22
3 Metodología.....	23
3.1 Primera etapa – Cinética de reacción.....	24
3.1.1 Obtención de datos experimentales.....	24
3.1.2 Tratamiento de datos experimentales.....	24

3.1.3 Selección del modelo cinético de crecimiento celular .....	26
3.1.4 Ajuste de parámetros cinéticos .....	29
3.2 Segunda etapa – Simulación de fermentación .....	29
3.2.1 Condiciones de operación del reactor .....	30
3.2.2 Reacción global de fermentación.....	30
3.2.3 Modelo de propiedades termodinámicas .....	31
3.3 Tercera etapa- Simulación de la deshidratación de etanol.....	31
3.4 Variación de la concentración inicial de glucosa a la entrada del reactor .....	32
4 Resultados y Análisis.....	33
4.1 Comportamiento del proceso fermentativo.....	33
4.2 Selección del modelo cinético .....	35
4.3 Simulación del fermentador.....	38
4.4 Simulación del proceso de destilación y deshidratación de etanol .....	39
4.5 Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de etanol .....	40
5 Conclusiones .....	41
6 Recomendaciones .....	42
Referencias bibliográficas.....	43
Apéndices.....	46

## Lista de figuras

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Etapas del desarrollo del proyecto.....	23
<b>Figura 2.</b> Comportamiento cinético de la biomasa (A), sustrato(B) y producto(C) en función del tiempo .....	34
<b>Figura 3.</b> Modelo de Andrew ajustado para datos de biomasa (A), sustrato(B) y producto(C) ...	36
<b>Figura 4.</b> Esquema (flowsheet) del proceso de producción de etanol a partir de la cáscara de la mazorca de cacao .....	38

**Lista de tablas**

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1</b> Composición química y azúcares presentes de la cáscara de cacao. ....	14
<b>Tabla 2</b> Modelos cinéticos libres de inhibición por sustrato o producto .....	17
<b>Tabla 3</b> Modelos cinéticos con inhibición por sustrato .....	18
<b>Tabla 4</b> Modelos cinéticos con inhibición por producto .....	19
<b>Tabla 5.</b> Diluciones de solución madre de inóculo de levadura en fase de crecimiento exponencial. ....	25
<b>Tabla 6.</b> Modelos cinéticos de crecimiento celular.....	27
<b>Tabla 7</b> Condiciones de operación.....	30
<b>Tabla 8.</b> Variación del flujo inicial de glucosa .....	33
<b>Tabla 9.</b> Errores de ajuste para los modelos cinéticos. ....	35
<b>Tabla 10.</b> Parámetros cinéticos optimizados.....	37
<b>Tabla 11.</b> Datos de la fermentación a diferentes concentraciones de glucosa .....	40

## Lista de apéndices

	<b>Pág.</b>
<b>Apéndice A.</b> Proceso de inoculación del microorganismo. ....	46
<b>Apéndice B.</b> Datos experimentales de biomasa, sustrato y producto.....	47
<b>Apéndice C.</b> Curva de calibración para la cuantificación de biomasa.....	48
<b>Apéndice D.</b> Datos de parámetros cinéticos.....	49
<b>Apéndice E.</b> Descripción de las principales corrientes del proceso de fermentación y deshidratación de etanol.....	50
<b>Apéndice F.</b> Diagrama de flujo del proceso de fermentación y deshidratación de etanol.....	51

## Resumen

**Título:** Simulación y modelado de un proceso de producción de etanol por fermentación de los azúcares obtenidos de la cáscara de cacao empleando la levadura *Kluyveromyces marxianus* (DSM 5418)\*.

**Autores:** Paula Andrea Galvis Gómez y Laura Isabel Salgar Duran\*\*

**Palabras Clave:** Fermentación de azúcares, cáscara de la mazorca de cacao, *Kluyveromyces marxianus* DSM5418, modelo cinético, simulación, deshidratación.

### Descripción:

El objetivo principal fue la simulación y modelado de un proceso de producción de bioetanol a partir de los azúcares obtenidos de la cáscara de cacao empleando la levadura *Kluyveromyces marxianus* DSM5418. Para ello se llevó a cabo la evaluación y ajuste de diferentes modelos cinéticos a fin de determinar el comportamiento del crecimiento de la biomasa, consumo de sustrato y producción de producto. El resultado de ajuste de los modelos evaluados mostró que el modelo cinético de Andrew con inhibición por sustrato fue el mejor con un coeficiente de determinación  $R^2$  para biomasa, sustrato y producto de 0.940, 0.976 y 0.990, respectivamente. Posteriormente, se realizó la simulación del proceso de fermentación y deshidratación por adsorción con tamices moleculares. En la fermentación se utilizó glucosa de 4.2 kg/m<sup>3</sup> con un flujo de entrada de glucosa de 1.94 kg/h obteniendo al final del proceso un flujo de etanol anhidro de 0.9351 kg/h, con una pureza del 99.91% p/p. Adicionalmente, se evaluaron diferentes concentraciones de glucosa (4.2, 7.5, 13.05, 15.82, 18.6 Kg/m<sup>3</sup>) de ingreso al reactor y a 13,05 kg/m<sup>3</sup> mostró los mejores resultados con un rendimiento máximo de 50,90%, con conversión de 99.53% y un flujo másico de bioetanol de 3.0641 kg/h a la salida del reactor.

\*Trabajo de grado

\*\* Facultad de ingenierías fisicoquímicas. Escuela de ingeniería química. Director: Daniel Ricardo Molina Velasco PhD. en Química. Codirector: Luis Guillermo Rueda Serrano MSc. en Ingeniería Química.

### Abstract

**Título:** Simulation and modeling of a process for the production of ethanol by fermentation of the sugars obtained from the cocoa shell using the yeast *Kluyveromyces marxianus* (DSM 5418)\*.

**Authors:** Paula Andrea Galvis Gómez y Laura Isabel Salgar Duran\*\*

**Key words:** sugar fermentation, cocoa pod husk, *Kluyveromyces marxianus* DSM5418, kinetic models, simulation, deshydration.

#### Description:

The main objective was the simulation and modeling of a bioethanol production process from the sugars obtained from the cocoa shell using the yeast *Kluyveromyces marxianus* DSM5418. For this, the evaluation and adjustment of different kinetic models were carried out in order to determine the behavior of biomass growth, substrate consumption and product production. The result of fitting the evaluated models showed that Andrew's kinetic model with inhibition by substrate was the best with a coefficient of determination  $R^2$  for biomass, substrate and product of 0.940, 0.976 and 0.990, respectively.

Subsequently, the simulation of the fermentation and dehydration process by adsorption with molecular sieves was carried out. In the fermentation, glucose of 4.2 kg/m<sup>3</sup> was used with a glucose input flow of 1.94 kg/h, obtaining at the end of the process an anhydrous ethanol flow of 0.935 kg/h, with a purity of 99.91% w/w. Additionally, different concentrations of glucose (4.2, 7.5, 13.05, 15.82, 18.6 kg/m<sup>3</sup>) entering the reactor were evaluated and the concentration of 13.05 kg/m<sup>3</sup> showed the best results with a maximum yield of 50.90%, conversion of 99.53% and a bioethanol mass flow of 3.064 kg/h at the reactor outlet.

\*Trabajo de grado

\*\*Facultad de ingenierías fisicoquímicas. Escuela de ingeniería química. Director: Daniel Ricardo Molina Velasco PhD. en Química. Codirector: Luis Guillermo Rueda Serrano MSc. en Ingeniería Química

## Introducción

En la actualidad la producción de biocombustibles a partir de residuos agrícolas ha tomado un interés creciente debido a la escasez de los combustibles fósiles, además del impacto en el calentamiento global ocasionado por la generación de los gases de efecto invernadero emitidos en los procesos de combustión. Los combustibles de primera generación surgen como alternativa ante la preocupación medio ambiental, sin embargo, la implementación de estos ha ocasionado un incremento en el precio de la materia prima, las cuales hacen parte de la alimentación diaria del ser humano. Por otro lado, los combustibles de segunda generación utilizan como materia prima la biomasa lignocelulósica de los desechos agroindustriales, los cuales al no ser comestibles poseen un bajo costo, una disponibilidad alta y no afectan el precio de la materia prima consumida por el ser humano (Rueda, 2009).

En Santander de la mazorca del cacao se aprovecha sólo en un 10%p (la semilla del fruto), dejando el 90%p del fruto como residuo agrícola contaminante, de los cuales el 75%p está dada por la cáscara de la mazorca del cacao (CMC) (Barazarte et al., 2008). Esta cáscara es una biomasa lignocelulósica que al no ser tratada, causa problemas de contaminación por la lentitud de su proceso de degradación (Suarez, 2019); sin embargo, gracias a su alto contenido de carbono (Rodríguez, 2018), puede ser aprovechada para la obtención de productos de mayor valor, tales como: alimento para animales, pectinas comerciales y/o Bioetanol (Barazarte et al., 2008).

La producción de bioetanol a partir de biomazas lignocelulósicas ha presentado un interés creciente como método de biorremediación (Oyetuji, 2015), gracias a que puede ser empleado como biocombustible y contribuye a reducir la emisión de gases ( $\text{CO}_2$ – CO) (Balat et al., 2008). Esta producción se lleva a cabo por medio de fermentación a partir de jarabes de azúcares simples

obtenidos de la biomasa, empleando levaduras (*Kluyveromyces marxianus* DSM-5418). Generalmente, la levadura empleada para este proceso es la *Saccharomyces cerevisiae*; sin embargo, la *Kluyveromyces marxianus* (DSM-5418) ha presentado ventajas como: producir grandes niveles de bioetanol y soportar altas temperaturas (Diaz et al. ,2017).

Estos procesos de fermentación se describen por medio de modelos matemáticos y cinéticos, los cuales permiten obtener parámetros como la velocidad específica de crecimiento, rendimientos y concentraciones finales de sustrato y producto (Ibañez y Morales, 2009)(Barragan, 2014). Dichos parámetros permiten describir la fermentación y controlar su producción a fin de evaluar la factibilidad de los procesos llevados a escala industrial. Actualmente, no se cuentan con estudios de cinética de fermentación donde utilicen como levadura la *Kluyveromyces marxianus* (DSM-5418), ni la cáscara de la mazorca de cacao como materia prima, ya que la mayoría de los procesos se enfocan en utilizar la *Saccharomyces cerevisiae* con materias primas como la caña de azúcar y la cascarilla del arroz.

Por lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo simular y modelar un proceso de producción de etanol por fermentación de los azúcares obtenidos de la cáscara de cacao, empleando la levadura *Kluyveromyces marxianus* (DSM 5418).

## 1 Estado del Arte

### 1.1 Generalidades de la obtención de licor de azúcares

#### 1.1.1 Fuente de carbono

La cáscara de la mazorca de cacao (CMC) se destaca en la explotación cacaotera por ser uno de los residuos desechados con mayor porcentaje (66-75%)(Carreño y Rojas, 2014). A causa de esta cantidad de residuos, se ha propuesto aprovechar la cáscara de la mazorca de cacao como materia prima para la producción de bioetanol, ya que esta posee una matriz lignocelulósica, compuesta por celulosa, hemicelulosa y lignina (Rodríguez, 2018). Este residuo se caracteriza por ser rico en agua, fibra dietaría, lípidos, macronutrientes, micronutrientes, compuestos bioactivos como los polifenoles y azúcares (ver tabla 1) (Carreño y Rojas, 2014).

**Tabla 1.**

*Composición química y azúcares presentes de la cáscara de cacao .*

Composición	Cantidad (%)
<b>Celulosa</b>	19.7 - 26.1
<b>Hemicelulosa</b>	8.7 - 12.8
<b>lignina</b>	14 - 28
<b>Contenido de polifenoles</b>	4.6 – 6.9

<b>Glucosa</b>	15.7
<b>Arabinosa</b>	8.7
<b>Galactosa</b>	3.9
<b>Xilosa</b>	2.08
<b>Ramnosa</b>	0.17

Nota. Tomado de Valorisation strategies for cocoa pod husk and its fractions, por Lu F, Rodriguez-Garcia J, Van Damme I, et al, 2018.

### 1.1.2 *Licor de azúcares*

Para la producción de biocombustibles por fermentación, a partir de biomasa lignocelulósica, se requiere de pretratamiento de la materia prima para liberar las moléculas de los azúcares que forman las cadenas de los polímeros de celulosa y hemicelulosa. Esto se puede hacer por procesos químicos, físicos y biológicos, en donde se destaca el proceso de hidrólisis enzimática (Gonzalez, 2007). Este es un proceso en el que enzimas como lacasas y celulasas actúan para la fragmentación de azúcares simples (hexosas y pentosas) a partir de un sustrato insoluble (celulosa) (Gonzalez, 2007).

## 1.2 Generalidades del proceso de producción de etanol

### 1.2.1 *Microorganismo*

La *Kluyveromyces marxianus* (DSM 5418) es una levadura que ha sido empleada actualmente para la producción de bioetanol como alternativa a la familia de levaduras de *Saccharomyces*. La *Saccharomyces cerevisiae* se ha utilizado en procesos de fermentación ya que tiene la capacidad de tolerar altos niveles de concentración de etanol (Villada et al. ,2017); sin embargo, la *Kluyveromyces marxianus* (DSM 5418) ha sido empleada gracias al gran número de ventajas que presenta, tales como: i) producir grandes niveles de bioetanol, ii) soportar altos niveles de temperatura (37-40°C) y iii) asimilar una gran variedad de fuentes de carbono (como la lactosa encontradas en lactosueros o la xilosa y arabinosa encontradas en jarabes de azúcares provenientes de biomasa lignocelulósicas) (Diaz et al. ,2017)(Villada et al. ,2017). Además, se ha encontrado que la levadura *Kluyveromyces marxianus* (DSM 5418) presenta mayor velocidad de crecimiento respecto a la *Saccharomyces cerevisiae* y se ha implementado en procesos de aprovechamiento de biomasa lignocelulósica (Plaza et al. ,2017).

### 1.2.2 *Cinética de fermentación.*

Los modelos matemáticos son utilizados en los procesos de fermentación, ya que gracias a ellos es posible conocer el comportamiento del proceso, reducir costos en el diseño experimental y realizar escalas de procedimientos hechos en laboratorio (Calderon, 2017). Estos modelos operan sobre dos suposiciones que se deben hacer al momento de su implementación: i) La primera es la

distribución uniforme, en la que se tiene en cuenta que los microorganismos y células poseen una composición fija y simple (no estructurados); ii) La segunda es la no segregación, en la cual se especifica que el comportamiento celular se aproxima a la de una sola célula promedio (no segregados).

Los modelos cinéticos no estructurados no segregados son utilizados con frecuencia por su simplicidad matemática, además, estos modelos tienen la capacidad de representar una gran cantidad de reacciones biológicas (Calderon, 2017). Dentro de los modelos no estructurados y no segregados se encuentran:

**1.2.2.1 Modelos con cinética libre de inhibición por sustrato o producto.** Estos modelos toman en consideración que el crecimiento del microorganismo dependerá únicamente de la concentración de la biomasa. Las ecuaciones que describen este tipo de cinética determinan los parámetros  $K_S$  y  $\mu_{max}$  a partir de datos experimentales obtenidos, donde  $K_S$  es la constante de afinidad de sustrato en unidades de  $(g/L^{-1})$  y  $\mu_{max}$  es la velocidad máxima a la cual el microorganismo crece, obtenidos en unidades de  $(h^{-1})$ . Los modelos más utilizados se encuentran en la tabla 2.

**Tabla 2.**

*Modelos cinéticos libres de inhibición por sustrato o producto*

Nombre	Ecuación
<b>Monod</b>	$\mu_X: \mu_{max} \cdot \left( \frac{S}{S + K_S} \right)$
<b>Teissier</b>	$\mu_X: \mu_{max} \cdot \left( 1 - e^{\left( \frac{-S}{K_S} \right)} \right)$

<b>Moser</b>	$\mu_X: \mu_{max} \cdot \left( \frac{S^n}{S^n + K_S} \right)$
<b>Contois</b>	$\mu_X: \mu_{max} \cdot \left( \frac{S}{S + K_S X} \right)$

Nota. Tomado de determinación de los parámetros cinéticos en la fermentación ácido-láctica mediante un enfoque termodinámico, por GallegosC. Published online 2020.

**1.2.2.2 Modelos con cinética limitada por inhibición de sustrato.** Se considera que la velocidad de crecimiento del microorganismo dependerá únicamente de la concentración del sustrato. En estas ecuaciones se consideran parámetros adicionales como,  $K_{i,s}$  y  $S_{max}$  en unidades de  $(g/L^{-1})$  las cuales representan, constante de inhibición por sustrato y la concentración de sustrato a la cual el microorganismo ya no crece, respectivamente.

**Tabla 3.**

*Modelos cinéticos con inhibición por sustrato*

Nombre	Ecuación
<b>Andrews and Noa</b>	$\mu_X: \mu_{max} \cdot \left( \frac{S}{1 + \frac{K_{i,s}}{S} + \frac{S}{K_S}} \right)$
<b>Aiba</b>	$\mu_X: \mu_X: \mu_{max} \cdot \left( \frac{S}{S + K_S} \right) \exp \left( -\frac{S}{K_{i,s}} \right)$
<b>Luong</b>	$\mu_X: \mu_{max} \cdot \left( \frac{S}{S + K_S} \right) \left( 1 - \frac{S}{S_{max}} \right)$

Nota. Tomado de determinación de los parámetros cinéticos en la fermentación ácido-láctica mediante un enfoque termodinámico, por GallegosC. Published online 2020.

**1.2.2.3 Modelos con cinética limitada por inhibición de producto.** en estos modelos se describe la relación que tiene el crecimiento del microorganismo respecto a la inhibición por parte de las concentraciones de producto. Los parámetros a tener en cuenta son, la constante de inhibición por producto  $K_{p.i}$  ( $\text{g/L}^{-1}$ ) y la concentración de producto a la cual el microorganismo ya no crece  $P_{max}$  ( $\text{g/L}^{-1}$ ).

**Tabla 4.**

*Modelos cinéticos con inhibición por producto*

Nombre	Ecuación
<b>Dagley and Hishelwood</b>	$\mu_x: \mu_{max} \cdot \left( \frac{S}{S + K_s} \right) (1 - K_{p.i})$
<b>Jerusalimsky</b>	$\mu_x: \mu_{max} \cdot \left( \frac{S}{S + K_s} \right) \left( \frac{K_{p.i}}{K_{p.i} + P} \right)$
<b>Ghose y Tyagi</b>	$\mu_x: \mu_{max} \cdot \left( \frac{S}{S + K_s} \right) \left( 1 - \frac{P}{P_{max}} \right)$
<b>Levenspiel</b>	$\mu_x: \mu_{max} \cdot \left( \frac{S}{S + K_s} \right) \left( 1 - \frac{P}{P_{max}} \right)^n$
<b>Pinelli et al.</b>	$\mu_x: \mu_{max} \cdot \left( \frac{S}{S + K_s} \right) \exp \left( - \frac{P}{P_{max}} \right)$

Nota. Tomado de determinación de los parámetros cinéticos en la fermentación ácido-láctica mediante un enfoque termodinámico, por GallegosC. Published online 2020.

### 1.3 Generalidades de la deshidratación de etanol

En la actualidad el uso de etanol como combustible (Ley 693 de 2001), ha sido una solución ecológica para disminuir el impacto ambiental generado por los combustibles derivados del petróleo. Una de las etapas más importantes en la producción de etanol, es su proceso de separación. Este proceso se desarrolla en dos etapas: i) destilación y ii) deshidratación; las cuales permiten obtener concentraciones de etanol entre 90 y 99% de pureza.

La etapa de destilación se encarga de aumentar la concentración de la corriente que se obtiene como producto del fermentador. Esta corriente se compone de agua, trazas de azúcares no fermentados y etanol menor al 10% de concentración. La destilación está conformada principalmente por torres fraccionadoras y rectificadoras, las cuales aumentan la purificación del etanol por debajo de la concentración azeotrópica (95%). La corriente proveniente de la destilación entra al proceso de deshidratación. Entre los procesos más utilizados de deshidratación se observa la destilación azeotrópica, la destilación extractiva, la destilación al vacío, la pervaporación y la adsorción con tamices moleculares (Uyazan et al. ,2004)(Valdeon et al. ,2018).

La deshidratación de etanol por adsorción del agua con tamices moleculares ofrece ventajas sobre las demás técnicas mencionadas como: diseño simple del proceso, alta eficiencia, independencia del uso de productos químicos adicionales y bajos costos de energía. Desde un punto de vista energético, el requerimiento de energía por metro cúbico de etanol producido es hasta 70 veces menor en los tamices moleculares comparado con las demás técnicas. Por lo anterior, la técnica de tamices moleculares predomina tanto en la parte operacional como en la ambiental y económica (Uyazan et al. ,2004)(Valdeon et al. ,2018).

El proceso de separación por tamices moleculares que opera en fase vapor generalmente cuenta con dos lechos. En un primer lecho se lleva a cabo la deshidratación haciendo pasar vapores de etanol por los tamices, después de cierto tiempo (16 minutos), cuando el lecho de deshidratación entra en saturación (70% con agua) (Uyazan et al. ,2004)(Patil, 2016), se pasa a la etapa de regeneración (segundo lecho) donde se retira el agua que ha sido absorbida previamente mediante la recirculación del etanol anhidro (15% y 40%)

## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivo General

Simular y modelar un proceso de producción de etanol por fermentación de los azúcares obtenidos de la cáscara de cacao, empleando la levadura *Kluyveromyces marxianus* (DSM 5418).

### 2.2 Objetivos Específicos

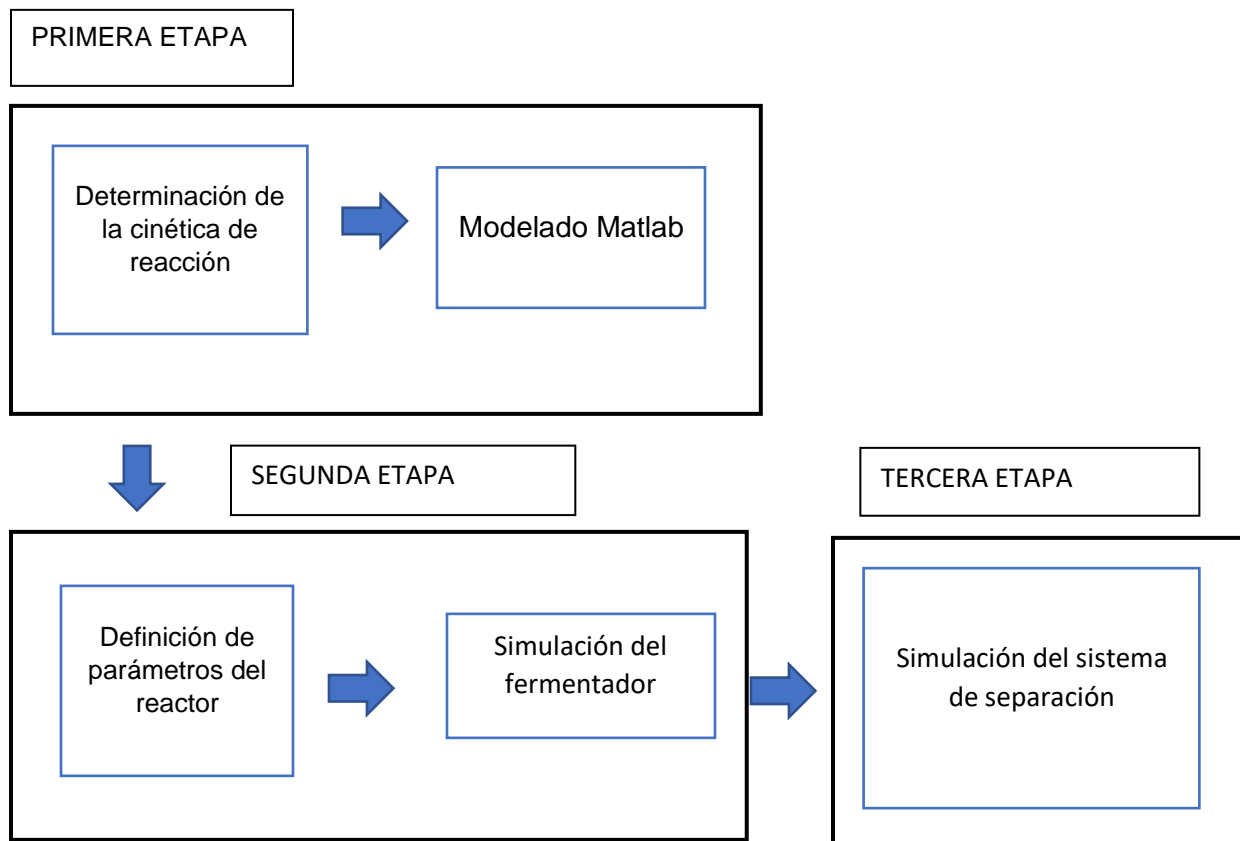
- Evaluar los modelos cinéticos de crecimiento celular para la obtención de etanol por fermentación de un jarabe de azúcares obtenido de la cáscara de cacao, utilizando la levadura *kluyveromyces marxianus* (DSM 5418).
- Simular el proceso de fermentación de un jarabe de azúcares hasta etanol a escala piloto.
- Simular el proceso de deshidratación de etanol por adsorción con tamices moleculares.

### 3 Metodología

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en tres etapas fundamentales. 1<sup>er</sup>) se determinó la cinética de reacción a partir del desarrollo de un algoritmo en Matlab, utilizando datos experimentales del proceso de fermentación; 2<sup>da</sup>) se llevó a cabo la simulación del reactor empleado en el proceso de obtención de etanol; 3<sup>era</sup>) En la etapa final se simuló el proceso de deshidratación de etanol por medio de la técnica de tamices moleculares.

**Figura 1.**

*Etapas del desarrollo del proyecto*



### 3.1 Primera etapa – Cinética de reacción

Para determinar los parámetros cinéticos del proceso de fermentación para la obtención de etanol, se tuvo en cuenta cuatro aspectos importantes como 1) obtención de datos experimentales 2) tratamiento de datos experimentales, 3) selección del modelo cinético de crecimiento celular y 4) ajuste de parámetros cinéticos utilizando Matlab.

#### 3.1.1 *Obtención de datos experimentales*

Para la obtención de los datos experimentales se desarrollaron fermentaciones de escala laboratorio utilizando dos reactores con capacidad de 120 ml c/u, los cuales se llenaron con el 60% de su capacidad con jarabe de azúcares, se inocularon los reactores con un 10% del preinóculo a una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/ml (ver anexo A). Posteriormente se llevaron a incubación en un agitador orbital a condiciones de 37°C, 55 rpm durante 8 horas. Se hizo seguimiento al consumo de azúcares reductores (DNS), producción de etanol (espectrofotometría por oxidación de dicromato de potasio) y crecimiento de biomasa (recuento en placa) (Castellanos, 2020). Estos datos se pueden encontrar en el anexo B.

#### 3.1.2 *Tratamiento de datos experimentales*

Los datos de crecimiento del microorganismo fueron reportados en unidades de cel/ml, por lo tanto, fue necesario realizar una curva de calibración (ver anexo C) para la conversión de las

unidades a gramos/ml. Se realizaron 9 diluciones a partir de una solución madre de inóculo de levadura en fase de crecimiento exponencial con una concentración inicial de  $3,68 \times 10^8$  cel/ml.

**Tabla 5.**

*Diluciones de solución madre de inóculo de levadura en fase de crecimiento exponencial*

Dilución (%)	Solución madre(ml)	Volumen czapeck(ml)	Volumen total de la dilución (ml)
100	51	0	51
80	35	8,75	43,75
60	27,75	9,25	37
40	21	10,5	31,5
20	15,5	15,5	31
10	15	15	30
5	14	14	28
2,5	12	12	24
1,25	8	8	16

Para la cuantificación del microorganismo se llevaron a cabo los métodos de peso seco y recuento en cámara descritos a continuación.

**3.1.2.1 Método de peso seco.** Para determinar peso seco, se tomaron 5ml de cada dilución (por triplicado) y se llevaron a centrifugar por 10 minutos a 9000rpm y 5°C. Una vez precipitada la levadura, se retiró el sobrenadante y se realizaron dos lavados con solución salina al 0,9%, cada una seguida de centrifugación (igual condiciones). Finalmente, la levadura precipitada se llevó a secado en horno a 65°C por 24 horas[20].

$$\text{peso seco} \left( \frac{g}{ml} \right) = \frac{(\text{peso del tubo+muestras seca})-(\text{peso inicial del tubo})}{\text{volumen de la muestra (5ml)}} \quad \text{Ecuación 1}$$

**3.1.2.2 Método de recuento en cámara.** De cada una de las 9 diluciones reportadas en la tabla 1 se tomaron 10 µl de muestra y se resuspendieron en 990 µl de solución salina, se agregó una alícuota en la cámara de Neubauer para hacer conteo de levadura haciendo uso del microscopio. El resultado obtenido se multiplicó por el factor de dilución (100) y por el factor de la cámara (10000) para conocer la concentración real de la levadura.

$$\left( \frac{\text{células}}{ml} \right) = \text{Número de células} * 100 * 10000 \quad \text{Ecuación 2}$$

### 3.1.3 Selección del modelo cinético de crecimiento celular

Para la selección del modelo cinético se evaluaron los modelos descritos en la tabla 6, organizados de la siguiente manera: del 1 al 3 modelos libres de inhibición, del 4 al 5 modelos con inhibición por sustrato y del 6 al 8 modelos con inhibición por producto. Los cuales fueron

implementados en los balances de crecimiento de biomasa, consumo de sustrato y generación de producto descritos por las ecuaciones 3, 4 y 5 respectivamente.

**Tabla 6.**

*Modelos cinéticos de crecimiento celular*

Tipo de modelo	AUTOR	MODELO
<b>Libre de inhibición</b>	1.Monod	$\mu_X:\mu_{max} \cdot \left(\frac{S}{S + K_S}\right)$
	2.Contois	$\mu_X:\mu_{max} \cdot \left(\frac{S}{S + K_S X}\right)$
	3.Tessier	$\mu_X:\mu_{max} \cdot \left(1 - e^{\left(\frac{-S}{K_S}\right)}\right)$
<b>Inhibición por sustrato</b>	4.Andrews and Noa	$\mu_X:\mu_{max} \cdot \left(\frac{S}{1 + \frac{K_{i,s}}{S} + \frac{S}{K_S}}\right)$
	5.Aiba	$\mu_X:\mu_X:\mu_{max} \cdot \left(\frac{S}{S + K_S}\right) \exp\left(-\frac{S}{K_{i,s}}\right)$
<b>Inhibición por producto</b>	6.Jerusalimsky	$\mu_X:\mu_{max} \cdot \left(\frac{S}{S + K_S}\right) \left(\frac{K_{p,i}}{K_{p,i} + P}\right)$
	7.Ghose y Tyagi	$\mu_X:\mu_{max} \cdot \left(\frac{S}{S + K_S}\right) \left(1 - \frac{P}{P_{max}}\right)$
	8.Pinelli et al.	$\mu_X:\mu_{max} \cdot \left(\frac{S}{S + K_S}\right) \exp\left(-\frac{P}{P_{max}}\right)$

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad \text{Ecuación 3}$$

$$\frac{ds}{dt} = \left( \frac{\mu}{Y_{x/s}} + \frac{q_p}{Y_{p/x}} + m_s \right) \cdot X \quad \text{Ecuación 4}$$

$$\frac{dp}{dt} = \left( \mu \cdot Y_{p/x} + m_p \right) \cdot X \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde  $X$  es la concentración de biomasa,  $S$  la concentración de sustrato,  $P$  es la concentración de producto,  $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento en unidades de ( $\text{h}^{-1}$ );  $Y_{x/s}$  y  $Y_{p/x}$  son los rendimientos teóricos biomasa-sustrato y producto-biomasa respectivamente, en unidades de (masa/masa) y  $q_p$  representa la velocidad específica de formación de producto. Los parámetros  $m_s$  y  $m_p$  son las constantes de mantenimiento celular y la constante específica de formación de producto, respectivamente.

El criterio de selección del modelo cinético se basó en el valor del coeficiente de determinación  $R^2$  y el error relativo  $\epsilon$ , descritos en la ecuación 6 y 7 respectivamente.

$$R^2: 1 - \frac{\sum(\text{valor experimental} - \text{valor teorico})^2}{\sum(\text{valor experimental} - \text{media de los valores experimentales})^2} \quad \text{Ecuación 6}$$

$$\epsilon: \frac{\text{valor experimental} - \text{valor teorico}}{\text{valor experimental}} \quad \text{Ecuación 7}$$

### 3.1.4 Ajuste de parámetros cinéticos

Los parámetros  $\mu$ ,  $Y_{x/s}$ ,  $Y_{p/x}$ ,  $K_s$ ,  $m_s$  y  $m_p$  se optimizaron empleando la función `fminsearch`, el cual buscó el máximo del coeficiente de determinación  $R^2$  y el mínimo del error relativo  $\epsilon$ , para los datos experimentales y los datos calculados. Los datos calculados se obtuvieron integrando las ecuaciones 3, 4 y 5 mediante el uso del método de Runge-Kutta de cuarto orden, utilizando la función `ODE45`. La optimización e integración se llevaron a cabo utilizando el software Matlab versión R2020a.

## 3.2 Segunda etapa – Simulación de fermentación

La producción de bioetanol a partir de la *Kluyveromyces marxianus* (DSM 5418) se llevó a cabo utilizando el software Aspen Hysys V8.8. El flujo inicial de ingreso al fermentador fue calculado proyectando la cantidad de residuos de cáscara de mazorca de cacao proveniente de una de las etapas de procesamiento de cacao en la planta NEXTCOA perteneciente a la Universidad Industrial de Santander. Estos residuos se estimaron en 1,66 t/día de cáscara de mazorca de cacao, la cual por medio de hidrólisis enzimática con una relación sólido-líquido de 1,5 de cáscara:10 de medio (Castellanos, 2020) y alcanzando un posible rendimiento de 28 mg de glucosa/g de cáscara de cacao puede llegar a liberar 0,04648 t/día de glucosa. Por lo anterior, el flujo inicial de ingreso al reactor es de 1,94 kg/h de glucosa junto con 462,91kg/h de agua.

### 3.2.1 Condiciones de operación del reactor

**Tabla 7.**

*Condiciones de operación*

Condiciones	Valor	Unidades
Temperatura	37	°C
Presión	1	atm
Factor de seguridad	0,8	%
Flujo inicial	465	kg/h

El ajuste del volumen del reactor se calculó teniendo en cuenta el flujo inicial de ingreso y un factor de seguridad de 0,8.

### 3.2.2 Reacción global de fermentación

Con el fin de simplificar la simulación, se tuvo en cuenta una reacción general en la que se describe la transformación de glucosa en etanol y dióxido de carbono.



La conversión de la ecuación 8 se obtuvo con base en los datos experimentales mediante la siguiente ecuación (Leidinger, 1997):

$$X : \frac{\text{Sustrato consumido } (C_6H_{12}O_6)}{\text{Sustrato total } (C_6H_{12}O_6)}$$

**Ecuación 9**

### 3.2.3 *Modelo de propiedades termodinámicas*

Para la selección del modelo de propiedades termodinámicas se tuvo en cuenta tres consideraciones como, manejo de mezclas líquido-líquido, presión de operación menor a 10 bar y los componentes involucrados en el proceso poseen características de polaridad. Por lo anterior, se escogió el modelo NRTL (Non Random Two Liquid) para calcular las propiedades termodinámicas del proceso (Carlson, 1996)(Amin et al. ,2013).

### 3.3 Tercera etapa- Simulación de la deshidratación de etanol

Para la purificación del etanol obtenido del reactor, se utiliza un destilador flash con el fin de separar el CO<sub>2</sub> producido en la fermentación. La corriente de tope del separador se lleva a una torre de lavado empleando agua como solvente en la que se retiran las trazas de etanol presente en la corriente de CO<sub>2</sub>. Esta torre opera a una temperatura de 25°C y presión de 1 atm. El CO<sub>2</sub> es retirado por venteo mientras que la corriente compuesta por agua y etanol se mezcla con la corriente líquida proveniente del reactor, esta mezcla ingresa a una torre de absorción en la cual se retira el agua y las vinazas por el fondo, en la corriente de tope se retira CO<sub>2</sub>, agua y un poco de etanol y por una corriente lateral sale una solución de etanol-agua la cual es alimentada al sistema de destilación.

La destilación se lleva a cabo mediante dos torres. La primera es la torre fraccionadora en la cual se obtiene una solución de etanol al 37% m/m como destilado (Rueda, 2009) esta corriente es ingresada a una torre rectificadora con el fin de aumentar la concentración de etanol entre el 80% y 90% de pureza (Rueda, 2009). La corriente de fondo es agua que puede ser reutilizada en el proceso y el destilado que sale por el tope de la torre se envía al sistema de deshidratación.

El proceso de deshidratación se lleva a cabo mediante dos unidades con tamices moleculares. En la primera ingresa el destilado como vapor sobrecalentado procedente de la torre rectificadora, allí las moléculas de agua quedan retenidas en los poros de los tamices mientras que las moléculas de etanol circulan libremente. La corriente de vapor obtenida tiene una pureza del 99,8% de etanol, la cual es la requerida para poder utilizarse como combustible (Ley 693 de 2001). En la segunda unidad de tamices se lleva a cabo el proceso de regeneración mediante una corriente de vapor del 32% (Rueda, 2009) de etanol que arrastra el agua retenida en el tamiz. Esta corriente de agua se recircula a la torre rectificadora.

### **3.4 Variación de la concentración inicial de glucosa a la entrada del reactor**

Según lo observado en el laboratorio, las concentraciones de glucosa varían dependiendo del proceso que se le realiza a la cáscara de la mazorca de cacao (CMC) antes de la hidrólisis enzimática (pretratamientos). Por lo anterior, se realiza un análisis de como se ve afectada la producción de etanol (corriente de salida del fermentador) respecto a un incremento en la concentración inicial de glucosa y el rendimiento (flujo etanol/ flujo inicial de glucosa) de la fermentación variando la concentración de glucosa en un rango de 4,2 a 18,6 kg/m<sup>3</sup> (A partir de

posibles rendimientos obtenidos de una serie de pretratamientos realizados a la CMC) manteniendo constante el flujo de agua que ingresa al reactor.

**Tabla 8.**

*Variación del flujo inicial de glucosa*

Concentración glucosa(kg/m <sup>3</sup> )	Flujo másico inicial de glucosa (kg/h)
4,2	1,937
7,5	3,458
13,05	6,017
15,82	7,297
18,6	8,576

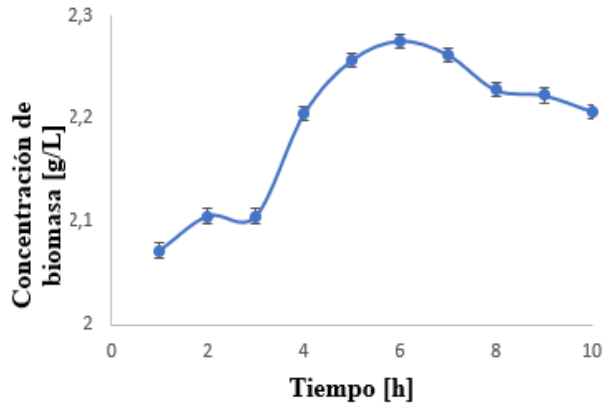
## 4 Resultados y Análisis

### 4.1 Comportamiento del proceso fermentativo

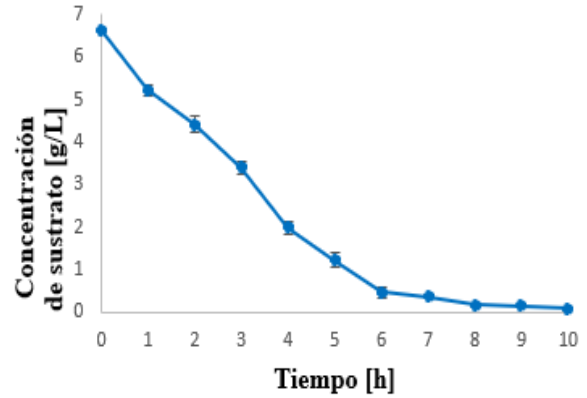
Con base en los datos experimentales se obtuvieron tres gráficas en las cuales se puede evidenciar el comportamiento de la biomasa, sustrato y productos respecto al tiempo.

Figura 2.

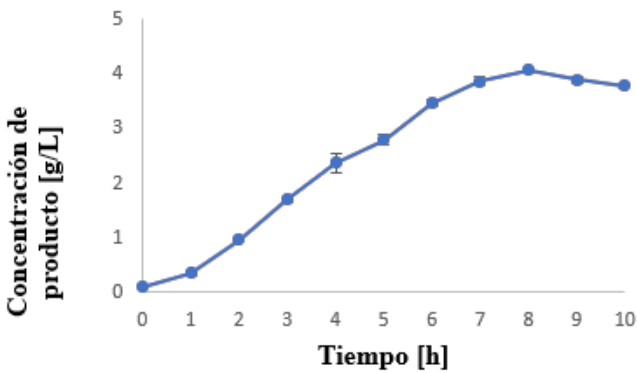
*Comportamiento cinético de la biomasa (A), sustrato(B) y producto(C) en función del tiempo*



A



B



C

En la figura 2A se observa el comportamiento de la biomasa la cual tiene su fase exponencial entre la hora 0 y la hora 5. La figura 2B muestra el consumo del sustrato a medida que el tiempo de fermentación avanza, esto se debe a la afinidad que presenta la glucosa con el microorganismo. En la figura 2C se puede evidenciar que la máxima concentración de etanol se

da a la hora 8, después de esta hora dicha concentración se estabiliza ya que no hay disponibilidad de glucosa.

Para el ajuste del modelo y la optimización de los parámetros cinéticos se tomaron los datos de la fase exponencial desde la hora cero hasta la hora 7 (Martínez, 2013).

#### 4.2 Selección del modelo cinético

Se evaluaron los modelos cinéticos descritos en la tabla 6 y para cada uno de ellos se obtuvieron los valores de coeficiente de determinación  $R^2$  y error relativo utilizando las ecuaciones 6 y 7 respectivamente.

**Tabla 9.**

*Errores de ajuste para los modelos cinéticos.*

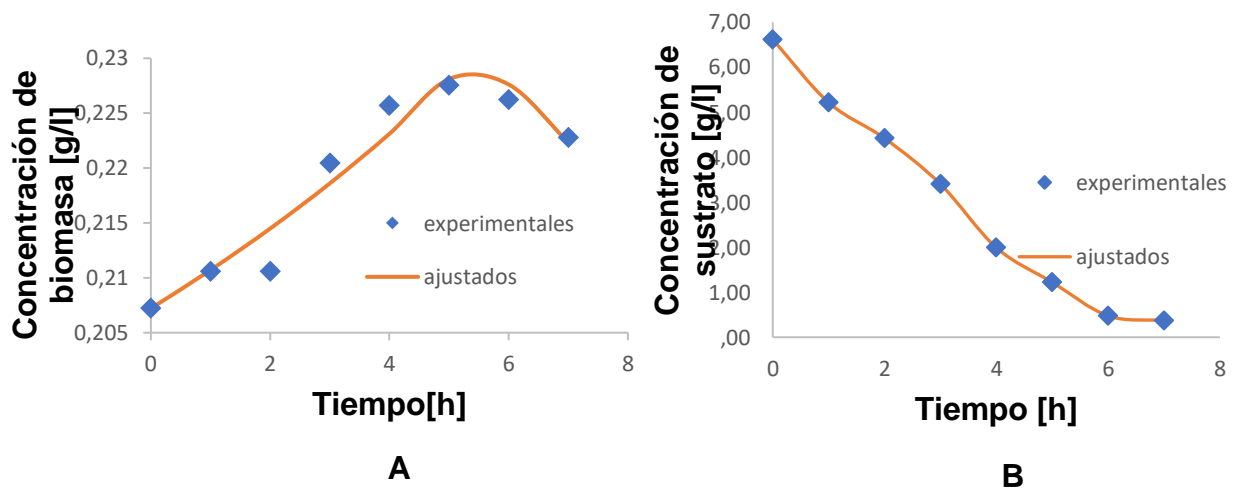
	$R^2$			ER		
	Biomasa	Sustrato	Producto	Biomasa	Sustrato	Producto
Monod	0,933	0,979	0,990	0,010	2,532	0,903
Teissier	0,926	0,982	0,988	0,007	2,350	1,072
Contois	0,829	0,958	0,977	0,007	1,379	0,012
Andrew	0,940	0,976	0,990	0,006	2,523	0,896
Aiba	0,931	0,965	0,990	0,004	2,565	0,905
Herusalimsky	0,913	0,983	0,973	0,001	2,068	0,734
Ghose y Thiagy	0,871	0,988	0,989	0,017	1,679	0,890
Pinelli	0,913	0,962	0,990	0,038	2,315	0,787

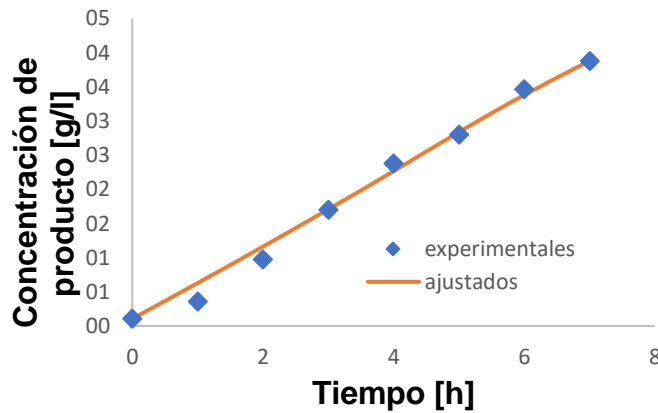
Inicialmente se realizó una selección de los modelos con respecto al tipo de inhibición teniendo en cuenta el  $R^2$  y el ER junto con el ajuste de los parámetros cinéticos (ver anexo D). Los modelos cinéticos que obtuvieron mejores resultados fueron: Monod para modelo sin inhibición, Andrew para inhibición por sustrato y Pinelli para inhibición por producto.

El modelo cinético de Monod presentó un ajuste prometedor con un coeficiente de determinación cercano a uno (0.933, 0.979, 0.990) y un error relativo próximo a cero (0.0103, 2.532, 0.903). Sin embargo, el modelo cinético de Andrew con inhibición por sustrato expuso un mejor ajuste con mejores resultados en los errores de coeficiente de determinación (0.940, 0.936, 0.990) y error relativo (0.006, 2,523, 0.896). Estos ajustes se presentan en la figura 3.

**Figura 3.**

*Modelo de Andrew ajustado para datos de biomasa (A), sustrato(B) y producto(C)*





### C

En los perfiles de biomasa y producto se observa un comportamiento creciente a medida que el tiempo avanza esto se debe a que efectivamente la producción de etanol está relacionada con el crecimiento microbiano, mientras que el perfil de sustrato presenta un comportamiento en descenso ya que a mayor tiempo menor disponibilidad del mismo.

Los parámetros cinéticos  $\mu$ ,  $Y_{x/s}$ ,  $Y_{p/x}$ ,  $K_s$ ,  $K_{i,s}$ ,  $m_s$  y  $m_p$  fueron ajustados empleando el modelo cinético de Andrew (ver tabla 10)

**Tabla 10.**

*Parámetros cinéticos optimizados*

Parámetros cinéticos optimizados						
$\mu[h^{-1}]$	$Y_{x/s}$	$Y_{p/x}$	$K_s[g/l]$	$K_{i,s}[g/l]$	$m_s[g/g*h]$	$m_p[g/g*h]$
<b>0,024</b>	0,007	9,345	0,033	14,182	3,053	2,351

El parámetro  $Y_{x/s}$  al presentar un valor bajo explica el rápido consumo de la fuente de carbono, esto se debe a que la afinidad que presenta el microorganismo con el sustrato es alta, por lo que se evidencia un valor de  $K_s$  bajo.

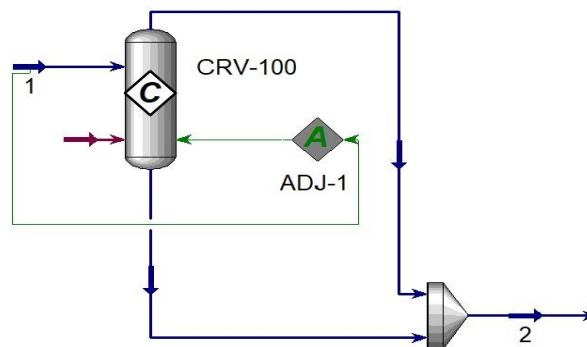
Respecto a los valores de  $Y_{p/x}$  y  $\mu$  se puede deducir que el consumo de sustrato tiene una mayor inclinación hacia la producción del producto que al crecimiento celular del microorganismo ya que el valor de la velocidad específica de crecimiento es muy pequeño y a su vez el rendimiento  $Y_{p/x}$  es alto.

### 4.3 Simulación del fermentador

El diagrama de flujo del proceso de fermentación generado mediante el programa Aspen Hysys V8.8 se presenta en la figura 4, donde es posible visualizar las corrientes involucradas en el proceso de fermentación para la obtención de etanol.

#### Figura 4.

*Esquema (flowsheet) del proceso de producción de etanol a partir de la cáscara de la mazorca de cacao*



El reactor CVR-100 opera a una temperatura de 37°C con una presión de 101,3 kPa y un volumen de 1,59 m<sup>3</sup>. La corriente obtenida del proceso fermentativo está compuesta por 0,934 kg/h de etanol, 462,9 kg/h de agua, 0,892 kg/h de CO<sub>2</sub> y un flujo de glucosa no fermentada de 0,109 kg/h a la cual se debe realizar un proceso de purificación y deshidratación. En esta etapa del

proceso de fermentación en necesario un requerimiento energético de -9943 kJ/h para mantener el funcionamiento isotérmico del reactor.

#### **4.4 Simulación del proceso de destilación y deshidratación de etanol**

El proceso de purificación de la corriente obtenida del fermentador comienza en el destilador flash del cual sale por la corriente del fondo un caudal másico de 464,5 kg/h con pureza de 0,2% p/p de etanol, esta corriente se mezcla con la corriente 4 proveniente del fondo de la torre de lavado y se lleva a la torre de absorción la cual opera a 101,3 kPa. De la torre de absorción se obtiene una corriente lateral con un caudal másico de 200 kg/h y pureza de 20% p/p de etanol. Esta corriente pasa a la torre fraccionadora de donde se obtiene por el fondo una corriente con pureza de 52,66% p/p de etanol, la cual posteriormente ingresa a la torre rectificadora para obtener un destilado con 92,80% p/p de etanol. Por último, la corriente 11 ingresa al tamiz molecular con el fin de retirar el agua presente y obtener la corriente de salida 12 con una pureza de 99,91% p/p de etanol. Las demás corrientes principales, así como el diagrama de flujo del proceso de deshidratación se pueden encontrar en el anexo E y anexo F respectivamente.

#### 4.5 Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de etanol

**Tabla 11.**

*Datos de la fermentación a diferentes concentraciones de glucosa*

Flujo másico glucosa [kg/h]	Flujo másico agua [kg/h]	% Conversión	Flujo másico Etanol salida reactor[kg/h]	%Rendimiento global fermentación
<b>1,94</b>	462,9	94,74	0,936	48,26
<b>3,458</b>	462,9	95,74	1,693	48,96
<b>6,011</b>	462,9	99,53	3,063	50,90
<b>7,297</b>	462,9	98,06	3,659	50,15
<b>8,576</b>	462,9	96,85	4,248	49,53

Se observó que a medida que se aumenta el valor de glucosa inicial se obtiene un incremento del flujo másico de etanol a la salida del reactor, sin embargo, el % de conversión y rendimiento global arroja un valor máximo en una concentración glucosa de  $13,05 \text{ kg/m}^3$  con un flujo másico de glucosa de  $6,01175 \text{ kg/h}$  y un flujo másico de agua de  $462,9 \text{ kg/h}$ . De acuerdo con la tabla 11 se puede concluir que, si bien un aumento en la cantidad de glucosa por agua agregada permite aumentar el flujo másico de etanol, el rendimiento global y la conversión disminuyen con valores superiores a la relación a concentraciones de glucosa mayores a  $13,05 \text{ kg/m}^3$ .

## 5 Conclusiones

Al hacer el ajuste de los modelos cinéticos se observó que el modelo cinético de Monod y Andrew pueden hacer una descripción del proceso, sin embargo, el modelo cinético de Andrew presentó un mejor ajuste respecto a los datos obtenidos experimentalmente ya que fue el modelo con mayor valor del coeficiente de determinación (0.94033, 0.97639, 0.99072) y menor valor del error relativo (0.006307, 2.5233, 0.89653).

Por medio del software de simulación se logró encontrar que:

- para un flujo de 1,94 kg/h de glucosa y 462,91 kg/h de agua a la entrada del reactor se obtuvo un flujo de 0,9363 kg/h con una pureza de 0,2% de etanol a la salida del reactor.
- A partir del flujo a la salida del fermentador se llevó a cabo el proceso de destilación y deshidratación en el cual se obtuvo un flujo de etanol de 0,9351 kg/h con una pureza del 99,91%.
- Mediante el aumento de la concentración inicial de glucosa (4,2 a 18,6) kg/m<sup>3</sup> se observó que si bien la concentración de etanol a la salida del reactor aumenta (2,02 a 9,2) kg/m<sup>3</sup>, el rendimiento global del proceso disminuye, pasando por un máximo de 50,90% a 49,53%.

## 6 Recomendaciones

Se sugiere realizar un análisis económico con el fin de evaluar la rentabilidad de proceso llevado a escala industrial.

Corroborar a nivel de laboratorio los flujos de etanol obtenidos a partir de las concentraciones iniciales planteadas en este trabajo.

Se recomienda realizar un sistema de recuperación de agua con el fin de optimizar el proceso de producción de etanol.

**Referencias bibliográficas**

- Rueda, F. (2009). Diseño conceptual de dos esquemas de producción de etanol combustible de segunda generación a partir del bagazo de caña de azúcar. *Published online*, 1-29.
- Barazarte , H., Sangronis, E., Unai, E. (2008). La cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L: Una posible fuente comercial de pectinas. *Arch Latinoam Nutr*, 58(1):64-70.
- Suarez, S.(2019). Producción de polihidroxicarboxilatos a partir de residuos de la fermentación del cacao usando *Bacillus megaterium* b2. *J Chem Inf Mode*, 53(9):1689-1699. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Lu, F., Rodriguez. J., Van Damme, I., et al.(2018). Valorisation strategies for cocoa pod husk and its fractions. *Curr Opin Green Sustain Chem*, 14:80-88. doi:10.1016/j.cogsc.2018.07.007
- Oyetuji S.(2015). Original Research Article Optimization of Bioethanol production from Cocoa (*Theobroma cacao* ). *Bean Shell*, 4(4):506-514.
- Balat, M., Balat, H., Öz, C.(2007). Progress in bioethanol processing. *Prog Energy Combust Sci*. 34(5):551-573. doi:10.1016/j.peccs.2007.11.001
- Serrat-Díaz, Manuel., Vallejo-Vidal, Juan A., Ageitos-Martínez, José M., Llauredó-Mauri, Gabriel., Urdaneta-Laffita, Imilci., & G. Villa T.(2017). Influence of the Culture Conditions on the Growth and Cell Wall Content in a Flocculent Strain of *Kluyveromyces marxianus*. *Rev Cuba Química*, 29(1):89-102.
- Ibañez, D., Morales, H.(2009). Diseño y fermentación de un simulador aerobio para producir etanol a partir de jarabe de glucosa usando levaduras nativas. *Published online*, 15-30.
- Barragan, R.(2014). Simulación y análisis exergético del proceso de producción dual azúcar etanol

caso colombiano. *Published online*, 8-14.

Carreño, O., Rojas, L.(2014). Determinación y ajuste de parámetros cinéticos de la extracción de polifenoles totales a partir de la cáscara de cacao. *Implement Sci*, 39(1):1-15. doi:10.4324/9781315853178

Gonzalez, A.(2007). Hidrólisis enzimática de bagazo de caña;cinética y diseño preliminar de reactores. *Published online*, (235).

Diniz, R., Villada J., Alvim, M., et al.(2017) Transcriptome analysis of the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 under ethanol stress. *Appl Microbiol Biotechnol*, 101(18):6969-6980. doi:10.1007/s00253-017-8432-0

Arellano-Plaza, M., Noriega-Cisneros, R., Clemente-Guerrero, M., et al.(2017), Fermentative capacity of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* after oxidative stress. *J Inst Brew*, 123(4):519-526. doi:10.1002/jib.451

Calderon, F.(2017). Ajuste de un modelo cinético para el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* en la fermentación de un sustrato complejo. *Published online*, 7(1), 5-13.

Gallegos C.(2020). Determinación de los parámetros cinéticos en la fermentación ácido-láctica mediante un enfoque termodinámico. caso de estudio: *Lactobacillus delbrueckii*. *Published online* . <https://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/20712>

Uyazán, A., Gil, I., Aguilar, J., Rodríguez, G., Caicedo, L.(2004). Deshidratación del etanol. *Ing e Investig*, (56):49-59.

Daniel, I., Valdeón, H., Dra, T., Paula, I., Araujo, Z.(2018) Tucumán SM De. Universidad Tecnológica Nacional Facultad Regional Tucumán Escuela de Posgrado Tecnologías de deshidratación de bioetanol Trabajo Final Integrador para optar al Grado Académico. *Published online*, 1-22.

Patil, N.(2016). Molecular Sieve Dehydration: a Major Development in the Field of Ethanol Dehydration To Produce Fuel Ethanol. *Asian J Sci Technol*, 07(June):2897-2902.

Castellanos, Yarileny.(2020). Evaluación del efecto de enzimas lignocelulolíticas de origen fúngico sobre la cáscara de mazorca de cacao en la producción de jarabes fermentables. *Universidad Industrial de Santander, Facultad de salud, Escuela e Microbiología*, 15-20.

- Sánchez, J.(2012). Determinación de biomasa. Laboratorio de Biotecnología de Productos Agroindustriales. *Univ Nac Trujillo-Perú*. Published online, 8-12.
- Leidinger, O.(1997). *Procesos Industriales*. Fondo Edit. (Pontificia Universidad Católica del Perú, ed.), 25-32.
- Carlson, E.(1996). Succeeding at Simulation. *Chem Eng Prog*, (October):35-46. <http://www.cchem.berkeley.edu/cbe150b/docs/VLE/Guidelines.pdf>
- Amin, M., Al-Hossain, M., Sarker, M.(2013). Simulation of Ethanol Production by Fermentation of Molasses. *J Eng*, 1(4):69-73. <http://www.worldsciencepublisher.org/journals/index.php/JOE/article/view/1263>
- Martinez, R., Prada, M.(2013). Optimización y ajuste de parámetros cinéticos para la fermentación acetona-butanol-etanol (ABE) a partir de jarabes de almidón de yuca empleando *Clostridium acetobutylicum*. *Universidad Industrial de Santander*, 26-28.

## Apéndices

### Apéndice A.

*Proceso de inoculación del microorganismo.*

Se realizó inoculación de la *Kluyveromyces Marxianus* (DSM5418) de la siguiente manera:

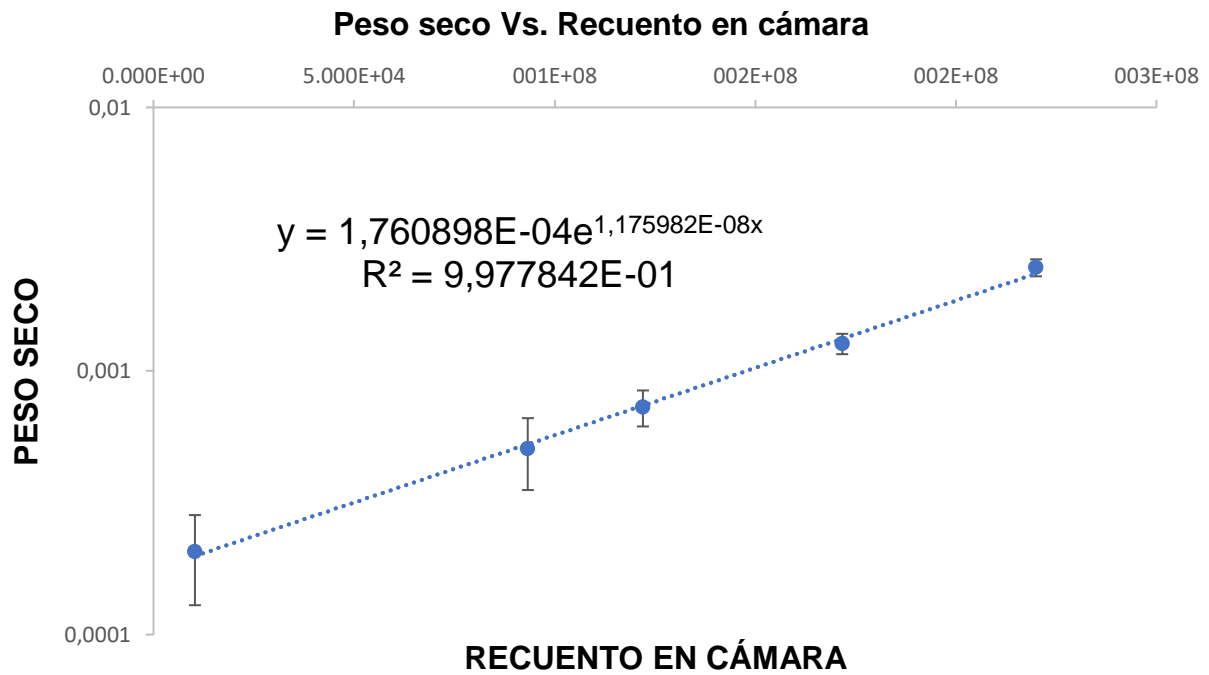
- Se transfirió una suspensión de 5% de *Kluyveromyces Marxianus* (DSM5418) con una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/ml a un volumen de 100ml de caldo czapeck,
- se llevó a incubación a condiciones de 28°C, 120 rpm durante 18 horas.
- El jarabe obtenido por hidrólisis enzimática se suplementó con cloruro de potasio, fosfato dipotásico, nitrato de sodio, sulfato ferroso, sulfato de magnesio, extracto de levadura y peptona.

**Apéndice B.***Datos experimentales de biomasa, sustrato y producto.*

<b>Tiempo[h]</b>	<b>Biomasa [g/l]</b>	<b>Sustrato [g/l]</b>	<b>Producto[g/l]</b>
0	2,072136	6,616161616	0,105638203
1	2,095661	5,215488215	0,357996132
2	2,110501	4,420875421	0,974218982
3	2,204358	3,402356902	1,696080036
4	2,256819	1,991582492	2,373925171
5	2,275473	1,222222222	2,799412377
6	2,262133	0,476430976	3,462585540
7	2,227813	0,372053872	3,873400740
8	2,222581	0,180134680	4,070005207
9	2,206952	0,149831650	3,891007141
10	2,201768	0,094276094	3,779500149

**Apéndice C.**

*Curva de calibración para la cuantificación de biomasa*



**Apéndice D.***Datos de parámetros cinéticos.*

	<b>MONOD</b>	<b>TEISSIER</b>	<b>CONTOIS</b>
<b>Um</b>	0,01868	0,018262	0,21571
<b>ks</b>	0,027077	0,019487	-4,28130
<b>Yxs</b>	0,0077908	0,0086018	0,45605
<b>ms</b>	3,0395	3,1795	4,6061
<b>Ypx</b>	5,0247	23,4413	-110,7204
<b>mp</b>	2,4122	2,1626	4,1244

	<b>ANDREW</b>	<b>AIBA</b>
<b>Um</b>	0,024816	0,024968
<b>ks</b>	0,024415	0,022826
<b>Yxs</b>	0,0077238	0,0077601
<b>ms</b>	3,0347	3,0431
<b>Ypx</b>	7,0676	8,7532
<b>mp</b>	2,3824	2,3605
<b>kis</b>	12,667	17,1915

	<b>PINELLI</b>	<b>HERUSALYMSKY</b>	<b>GHOSE Y TIAGI</b>
<b>Um</b>	0,019775	0,018105	0,032064
<b>ks</b>	0,23997	-0,078853	2,7845
<b>Yxs</b>	0,009865	0,0057727	0,006392
<b>ms</b>	3,2724	2,2037	2,3185
<b>Ypx</b>	6,9567	-55,041	13,190
<b>mp</b>	2,376	3,3871	2,2438
<b>kp</b>	222,9958	1,214,02	114,094300



## Apéndice F.

Diagrama de flujo del proceso de fermentación y deshidratación de etanol

