

**EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE RESIDUOS
ORGÁNICOS Y SUS DIFERENTES MEZCLAS, GENERADOS EN LA EMPRESA
DE ALIMENTOS SAS S.A.S.**

**JUDITH SANTOS AGUILAR
DIEGO ANDRES ZABALA GARCÍA**

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMERICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ
2016**

**EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE RESIDUOS
ORGÁNICOS Y SUS DIFERENTES MEZCLAS, GENERADOS EN LA EMPRESA
DE ALIMENTOS SAS S.A.S.**

**JUDITH SANTOS AGUILAR
DIEGO ANDRES ZABALA GARCÍA**

**Proyecto integral de grado para optar al título de
INGENIERO QUÍMICO**

**MARTHA LUCIA MALAGON M.
INGENIERA QUÍMICA**

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMERICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ
2016**

Nota de Aceptación (Dirección de Investigación)

Firma Docente Investigador

Firma Docente Jurado 1

Firma Docente Jurado 2

Bogotá, D.C., Septiembre 2016

DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD

Presidente de la Universidad y Rector del Claustro

Dr. JAIME POSADA DÍAZ

Vicerrector de Desarrollo y Recursos Humanos

Dr. LUIS JAIME POSADA GARCÍA-PEÑA

Vicerrectora Académica y de Posgrados

Dra. ANA JOSEFA HERRERA VARGAS

Secretario General

Dr. JUAN CARLOS POSADA GARCÍA-PEÑA

Decano de la Facultad de Ingenierías

Ing. JULIO CESAR FUENTES ARISMENDI

Director de Investigaciones

Ing. ARMANDO FERNÁNDEZ CÁRDENAS

Director Programa Ingeniería Química

Ing. LEONARDO DE JESUS HERRERA GUTIERREZ

“Mira que te mando que te esfuerces y seas valiente; no temas, ni desmayes, porque Dios estará contigo dondequiera que vayas” Josué 1,9.

Dedicamos este trabajo a Dios, por permitirnos culminar esta etapa de nuestras vidas, por alcanzar esta meta anhelada y por todo lo que conlleva este proceso de aprendizaje que hoy damos por terminado.
A nuestros padres y familiares que siempre han estado con nosotros apoyándonos incondicionalmente en este logro.

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a Dios, por el amor que me ha mostrado siempre, guiando cada uno de mis pasos, permitiéndome llegar hasta este momento de mi vida, por ser mi fuerza en cada triunfo y derrota.

Agradezco de manera infinita a mis padres por todo su amor, comprensión, paciencia y esfuerzo, por estar conmigo cuando más los he necesitado, por ser mi mayor ejemplo a seguir, porque sin ellos nada de esto sería posible.

Agradezco a mis hermanos por todo el amor y cariño con el que me han tratado siempre, este triunfo es suyo, por inspirarme a ser un ejemplo para cada uno de ustedes, haciendo las cosas de la mejor manera, les agradezco porque a pesar de la distancia siempre me impulsaron a ser una mejor persona.

A mi amigo y compañero Diego, le agradezco por estar conmigo durante este largo camino, por su paciencia, por su cariño, por su amistad incondicional, por todo lo que he aprendido de él en estos años.

A mis compañeras y amigas Laura, Kamila, Jessica y Natalia, les agradezco por estar conmigo en este camino tan largo, por todo cuanto han hecho por mí, las llevo en mi corazón.

A mi comunidad por haber sido quienes me sostenían cuando más los necesité, por tratarme con amor y por ser mi familia en esta ciudad, les estaré eternamente agradecida.

A la Universidad de América por permitirnos realizar experimentaciones en sus laboratorios, por brindarnos reactivos y equipos necesarios para el desarrollo de este proyecto.

A la Directora Martha y a las codirectoras Andrea Lache y Adriana Paez, por brindarnos todos sus conocimientos, por su guía y el asesoramiento para realizar este proyecto.

Judith Santos Aguilar

AGRADECIMIENTOS

A Dios, que con su infinita sabiduría me ha hecho llegar a donde estoy, sobrepasando adversidades y dificultades, haciendo que cada una de ellas sea un aprendizaje más que una experiencia. A mis padres, por su amor y sobre todo paciencia, en esta etapa de mi vida, dándome ánimo para seguir en cada momento. A Palis, que a pesar de los altibajos, demostró siempre creer en mí con su ayuda y apoyo (quizás este no hubiese sido el final sin la ayuda de ella). A mis primos y tías que hicieron de esto algo mucho más sencillo de lo que hubiera podido ser en caso de encontrarme solo, y colaborándome siempre que llegué a necesitarlo. En general, a esas mujeres que me apoyaron incondicionalmente, sin tener en cuenta mis defectos y errores, Jessi, Nata, Yudith, Pao y Lady.

Más que propio, este logro es de todas estas personas que guiaron mi meta.

Diego Andrés Zabala García

CONTENIDO

	pag.
INTRODUCCIÓN	22
OBJETIVOS	23
1. GENERALIDADES	24
1.1 ALIMENTOS SAS S.A.S.	24
1.1.1 Finalidad de la empresa	24
1.1.2 Misión	24
1.1.3 Visión	24
1.1.4 Situación actual de los residuos generados en la empresa	25
1.2 RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS	25
1.2.1 Composición de la lignocelulosa	25
1.3 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LAS FRUTAS	28
1.3.1 Caracterización física	28
1.3.2 Caracterización química	29
1.4 HIDRÓLISIS	29
1.4.1 Hidrólisis ácida	30
1.4.2 Hidrólisis enzimática	30
1.4.3 Multifect B	31
1.4.4 Actividad Enzimática	31
1.4.5 Determinación de azúcares reductores por el método del DNS	31
1.5 FERMENTACIÓN	32
1.5.1 Fermentación alcohólica	32
1.5.2 Microorganismos utilizados para la fermentación	34
1.5.3 Factores que afectan la fermentación	35
1.5.4 Comportamiento del crecimiento de la levadura	36
1.6 DESTILACIÓN	37
1.7 BIOETANOL	37
1.7.1 Bioetanol de Segunda Generación	41
1.7.2 Bioetanol como combustible	41
2. SELECCIÓN DE RESIDUOS ORGÁNICOS	42
2.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DE LAS DIECISÉIS FRUTAS	42
2.2 MATRIZ DE SELECCIÓN	46
2.2.1 Variables evaluadas en el desarrollo del proyecto	47
2.2.2 Relación de Parámetro	48
2.2.3 Matriz	49
3. MATERIALES Y METODOLOGÍA	52
3.1 CARACTERIZACIÓN DE RESIDUOS ORGÁNICOS SÓLIDOS	53
3.1.1 Acidez titulable por volumetría	53
3.1.2 Determinación de Celulosa	54
3.1.3 Determinación de la Densidad	55
3.1.4 Humedad	56

3.2	DETERMINACIÓN DE LAS DIFERENTES COMBINACIONES DE LOS RESIDUOS DE FRUTA	56
3.3	PRETRATAMIENTO DE LOS RESIDUOS ORGÁNICOS	57
3.3.1	Pretratamientos Físicos	57
3.3.2	Pretratamiento Químico	58
3.4	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	58
3.5	HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA	60
3.6	DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES	60
3.6.1	Evaluación del grado de conversión y Rendimiento	61
3.7	FERMENTACIÓN	63
3.7.1	Activación de la Levadura (<i>Inóculo</i>)	63
3.7.2	Determinación de la concentración del inóculo	64
3.7.3	Determinación del tiempo de fermentación	64
3.8	DESTILACIÓN	65
3.9	DETERMINACIÓN DE ETANOL POR EL MÉTODO DEL DICROMATO DE POTASIO	65
3.10	DETERMINACIÓN DE ETANOL POR REFRACTOMETRÍA	68
3.11	DETERMINACIÓN DE ETANOL POR EL MÉTODO DE DENSIDAD	69
3.12	RENDIMIENTO DE BIOETANOL	70
3.13	RENDIMIENTO DE LA FERMENTACIÓN	70
4.	RESULTADOS Y ANÁLISIS	71
4.1	CARACTERIZACIÓN DE RESIDUOS ORGÁNICOS SÓLIDOS	71
4.1.1	Acidez titulable por volumetríane el zumo de cada fruto	71
4.1.2	Determinación de Celulosa	71
4.1.3	Determinación de la Densidad	72
4.1.4	Humedad	73
4.2	DETERMINACIÓN DE LAS DIFERENTES COMBINACIONES DE LOS RESIDUOS DE FRUTA	74
4.3	PRETRATAMIENTO DE LOS RESIDUOS ORGÁNICOS	75
4.4	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	75
4.5	HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA	76
4.6	DETERMINACIÓN DE AZÚCARES POR EL MÉTODO DNS	77
4.6.1	Grado de Conversión y Rendimiento de la Multifect B durante el proceso de Hidrolisis	78
4.7	FERMENTACIÓN	80
4.7.1	Recuento del crecimiento del microorganismo y tiempo de Fermentación	80
4.8	DESTILACIÓN	89
4.9	DETERMINACIÓN DE ETANOL POR EL MÉTODO DEL DICROMATO DE POTASIO	90
4.10	DETERMINACIÓN DE ETANOL POR REFRACTOMETRÍA	92
4.11	DETERMINACIÓN DE ETANOL POR EL MÉTODO DE DENSIDAD	94
4.12	RENDIMIENTO DEL BIOETANOL	95
4.13	RENDIMIENTO DE LA FERMENTACIÓN	99

5.	ESTUDIO DE COSTOS PARA UNA PLANTA PILOTO	100
5.1	DESCRIPCIÓN DEL PROCESO	101
5.2	COSTOS FIJOS	106
5.3	COSTOS DIRECTOS	106
5.3.1	Materia Prima	106
5.4	COSTOS INDIRECTOS	107
5.4.1	Consumo de Energía	107
5.4.2	Consumo de Agua	108
5.5	Costos producción de etanol a escala banco	108
6.	CONCLUSIONES	110
7.	RECOMENDACIONES	111
	BIBLIOGRAFÍA	112
	ANEXOS	118

LISTA DE TABLAS

	pag.
Tabla 1. Características fisicoquímicas de la Curuba (<i>Passiflora Tripartita</i>)	42
Tabla 2. Características fisicoquímicas de la Feijoa (<i>Acca Sellowiana</i>)	42
Tabla 3. Características fisicoquímicas de la Fresa (<i>Fragaria</i>)	43
Tabla 4. Características fisicoquímicas de la Guanábana (<i>Annona Muricata</i>)	43
Tabla 5. Características fisicoquímicas de la Pulpa de Guayaba (<i>Psidium</i>)	43
Tabla 6. Características fisicoquímicas del Limón (<i>Citrus Auantifolia</i>)	44
Tabla 7. Características fisicoquímicas de Lulo (<i>Solanum V</i>)	44
Tabla 8. Características fisicoquímicas de la Mandarina (<i>Citrus Reticulata</i>)	44
Tabla 9. Características fisicoquímicas del Mango (<i>Mangifera Indica L.</i>)	44
Tabla 10. Características fisicoquímicas de la Maracuyá (<i>Passiflora Edulis</i>)	45
Tabla 11. Características fisicoquímicas de la Mora (<i>Rubus glaucus Benth</i>)	45
Tabla 12. Características fisicoquímicas de la Naranja (<i>Citrus Sinensis</i>)	45
Tabla 13. Características fisicoquímicas de la Papaya (<i>Carica Papaya</i>)	45
Tabla 14. Características fisicoquímicas de la Piña (<i>Ananas Comosus</i>)	46
Tabla 15. Características fisicoquímicas del Tomate de árbol (<i>Solanum B</i>)	46
Tabla 16. Características fisicoquímicas de la Uva (<i>Vitis Vinifera</i>)	46
Tabla 17. Clasificación de los valores resultantes en el promedio	49
Tabla 18. Escala de calificación para el parámetro cantidad de residuo en kg	49
Tabla 19. Escala de calificación para el parámetro frecuencia de residuos	49
Tabla 20. Primera matriz de selección	50
Tabla 21. Escala de calificación para el parámetro sólidos solubles totales	51
Tabla 22. Escala de calificación para el parámetro pH.	51
Tabla 23. Segunda matriz de selecció	51
Tabla 24. Acidez determinada por volumetría	71
Tabla 25. Porcentaje de celulosa calculada para los diferentes residuos	72
Tabla 26. Densidad calculada de los residuos	72
Tabla 27. Resultado de humedad en los residuos	73
Tabla 28. Porcentaje de celulosa de cada uno de los residuos	74
Tabla 29. Cantidad de residuos establecidos para la hidrólisis enzimática	74
Tabla 30. Comparación de la actividad enzimática por diferentes autores	76
Tabla 31. Comparación entre tiempos de hidrólisis y %conversión de azúcares	78
Tabla 32. Resultados determinación de Azúcares Reductores por el método	78
Tabla 33. Resultados Conversión de la Multifect B durante la hidrolisis	79
Tabla 34. Rendimiento con base en la cantidad de celulosa	80
Tabla 35. Resultados de la Destilación	89
Tabla 36. Resultado cantidad total del etanol presente en el destilado	91
Tabla 37. Resultado cantidad total del etanol presente en el fermentado	91
Tabla 38. Datos para la curva de calibración del índice de refracción	92
Tabla 39. Porcentaje etanol obtenido por el método de refractometría	93
Tabla 40. Volumen de etanol en cada muestra	94
Tabla 41. Porcentaje de etanol obtenido por el método de densidad	95

Tabla 42. Comparación entre las diferentes concentraciones de etanol y sus métodos de determinación	96
Tabla 43. Rendimiento de bioetanol por cada kg de sustrato	97
Tabla 44. Velocidad de Crecimiento, Azúcares reductores y concentración de etanol	98
Tabla 45. Rendimiento Y(P/S)	99
Tabla 46. Costo de los equipos a nivel planta piloto	106
Tabla 47. Costo de la Materia Prima	107
Tabla 48. Consumo de energía de equipos para el año 2016	107
Tabla 49. Consumo de agua de equipos para el año 2016	108
Tabla 50. Costo de producir bioetanol en el proyecto	108
Tabla 51. Costo de producir 1mL de bioetanol en el proyecto	109

LISTA DE CUADROS

	pag.
Cuadro 1. Relación de Parámetros	48
Cuadro 2. Descripción de los equipos y/o instrumentos utilizados en el proceso de obtención del bioetanol a nivel planta piloto	102

LISTA DE IMAGENES

	pag.
Imagen 1. Determinación de la acidez titulable	53
Imagen 2. Determinación del porcentaje de celulosa presente en los residuos	55
Imagen 3. Determinación del porcentaje de humedad en los residuos	56
Imagen 4. Pretratamientos físicos aplicados a los residuos	57
Imagen 5. Pretratamiento químico, sistema de agitación	58
Imagen 6. Montaje de la Destilación simple a nivel laboratorio	65

LISTA DE GRÁFICOS

	pag.
Gráfico 1. Curva de Crecimiento de la levadura en el fermentado de maracuyá	81
Gráfico 2. Curva de Crecimiento de la levadura en el fermentado de la mezcla limón-lulo	82
Gráfico 3. Curva de Crecimiento de la levadura en el fermentado de lulo	83
Gráfico 4. Curva de Crecimiento de la levadura en el fermentado de la mezcla Mora-Mango	84
Gráfico 5. Curva de Crecimiento de la levadura en el fermentado de limón	85
Gráfico 6. Curva de Crecimiento de la levadura en el fermentado de la mezcla maracuyá-lulo	86
Gráfico 7. Curva de Crecimiento de la levadura en el fermentado de mora	87
Gráfico 8. Curva de Crecimiento de la levadura en el fermentado de la mezcla maracuyá-limón	88
Gráfico 9. Curva de Crecimiento de la levadura en el fermentado de mango	89
Gráfico 10. Curva de Calibración Método Dicromato de Potasio. Concentración Etanol vs Absorbancia	90
Gráfico 11. Curva de calibración para determinar el porcentaje de alcohol por refractometría	93

LISTA DE FIGURAS

	pag.
Figura 1. Estructura de la Celulosa	26
Figura 2. Estructura de la Hemicelulosa	27
Figura 3. Estructura de la Lignina	27
Figura 4. Reacción redox entre el DNS y azúcares reductores	32
Figura 5. Fases del crecimiento de la levadura	36
Figura 6. Diagrama del proceso bioetanol a partir de caña de azúcar	39
Figura 7. Diagrama de proceso bioetanol a partir de cereal	40
Figura 8. Diluciones	64
Figura 9. Cámara Neubauer	64

LISTA DE ESQUEMAS

	pag.
Esquema 1. Ruta metabólica de la Glucólisis	33
Esquema 2. Ruta Metabólica del Piruvato	34
Esquema 3. Esquema de las experimentaciones realizadas	52
Esquema 4. Proceso determinación de la actividad enzimática	59
Esquema 5. Proceso determinación de azúcares reductores. Método DNS	61
Esquema 6. Preparación del medio de cultivo y Activación del inóculo	63
Esquema 7. Curva de Calibración Método del Dicromato de Potasio	67
Esquema 8. Método Dicromato de Potasio	68
Esquema 9. Determinación de etanol por refractometría	69

LISTA DE ECUACIONES

	pag.
Ecuación 1 Acidez titulable	54
Ecuación 2 Porcentaje de celulosa	55
Ecuación 3 Densidad de los residuos	55
Ecuación 4 Porcentaje de Humedad	56
Ecuación 5 Actividad enzimática	59
Ecuación 6 Cantidad de glucosa para la actividad enzimática	59
Ecuación 7 Ecuación calibración método del DNS	60
Ecuación 8 Porcentaje de grado de conversión	61
Ecuación 9 Cantidad de azúcares reducidos	62
Ecuación 10 Porcentaje de celulosa disponible	62
Ecuación 11 Celulosa disponible	62
Ecuación 12 Porcentaje de rendimiento	62
Ecuación 13 Concentración (Cel/mL)	64
Ecuación 14 Alcohol total en la muestra destilada	66
Ecuación 15 Concentración real de alcohol	66
Ecuación 16 Masa total de la mezcla	69
Ecuación 17 Volumen de etanol por el método del picnómetro	69
Ecuación 18 Rendimiento del bioetanol	70
Ecuación 19 Rendimiento $Y_{p/s}$	70

LISTA DE ANEXOS

	pag.
Anexo A Datos generales de Alimentos SAS S.A.S.	118
Anexo B Ficha técnica Multifect B	129
Anexo C Determinación de azúcares por el método DNS.	131
Anexo D Determinación del etanol por método del dicromato de potasio	132
Anexo E Certificado de análisis del medio de cultivo	133
Anexo F Recuentos del crecimiento de la levadura	134
Anexo G Cotización de los equipos utilizados a nivel planta piloto	138

GLOSARIO

AZUCARES REDUCTORES: son aquellos azúcares que tienen la capacidad de actuar como agente reductor frente a algún compuesto, debido a la presencia del grupo carbonilo.

BIOETANOL: es el producto principal de la fermentación anaeróbica de materias que contienen azúcares, tales como cultivos agrícolas.

CARACTERIZACIÓN DE RESIDUOS: conjunto de procesos por los cuales se reconocen propiedades físicas y químicas de los residuos orgánicos.

CELULASA: es una enzima que se utiliza para romper los enlaces del carbohidrato celulosa, obteniendo múltiples monómeros de glucosa.

FERMENTACIÓN: es un proceso que transforma las moléculas de azúcar a diferentes productos dependiendo del sustrato y del tipo de microorganismo que se utilicen, las principales sustancias que se obtienen de la fermentación son: alcohol etílico, ácido láctico, ácido butírico, ácido acético, entre otros.

HIDROLISIS: es un proceso que tiene como objetivo transformar moléculas de gran tamaño en moléculas fácilmente degradables, rompiendo sus enlaces en presencia de un medio acuoso.

LEVADURA: son microorganismos unicelulares, que se reproducen asexualmente por gemación en la mayoría de casos, aunque también lo hacen por fisión por formación de esporas. Se caracterizan por su capacidad de metabolizar carbohidratos.

pH: indica el grado de acidez o basicidad de una solución; los valores de pH están comprendidos en una escala de 0 a 14, el valor medio es 7 el cual corresponde a solución neutra, los valores que se encuentran por debajo de 7 indican soluciones ácidas y valores por encima de 7 corresponde a soluciones básicas o alcalinas.

RESIDUOS ORGÁNICOS: son residuos resultantes del procesamiento de alimentos, los utilizados en este proyecto son aquellos que tienen un potencial alto para producir alcohol, provenientes exclusivamente de frutas.

RESUMEN

Se evalúa la viabilidad de obtener alcohol a partir de los residuos orgánicos que se generan en la empresa Alimentos SAS S.A.S. realizando la experimentación con los residuos de limón, lulo, maracuyá, mango y mora, teniendo en cuenta la composición química de cada uno de ellos. Con el objetivo de seleccionar los residuos se realizó una matriz de selección, la cual pasó por dos condiciones de evaluación, la primera relacionaba la cantidad de residuos que produce cada una de las frutas y la frecuencia con que se generan estos residuos. La segunda condición relacionaba variables químicas (sólidos totales y pH), y de acuerdo con los resultados se seleccionaron los seis residuos mencionados anteriormente.

En la caracterización, se determinó la acidez titulable, la densidad, el porcentaje de celulosa y el porcentaje de humedad presentes en estos, y de este modo, se dividieron en tres grupos: alto (mora: 16,43% y Mango: 17,85%), medio (limón: 7,90%, lulo: 8,48% y maracuyá: 7,75%) y bajo (piña: 2,68%) porcentaje de celulosa, y se plantean las mezclas pertinentes para los procesos posteriores. Se llevaron a cabo pretratamientos físicos (molienda y lavado) y químicos (pretratamiento con hidróxido de sodio 0,5N durante dos horas con agitación constante y ajuste del pH entre 4 y 5), con el fin de facilitar la separación de la lignina y así favorecer el proceso de hidrólisis. En el proceso de hidrólisis, se utilizó como catalizador la enzima Multifect B de Genencor, para la cual se determinó la actividad enzimática: $40,187 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Luego se realizó la hidrólisis para cada una de las mezclas y de los residuos individuales agregando 3,86mL de la celulasa, manteniendo la temperatura de reacción entre 45-55°C y el pH entre 5-6, durante un período de tres horas. Se determinó la cantidad de azúcares reductores presentes después de la hidrólisis con el método del DNS, teniendo como resultado bajos grados de conversión (por debajo del 1%). El producto obtenido de la hidrólisis fue esterilizado. Se preparó el inóculo de la levadura, para cada muestra se prepararon 100mL de este, con 3g de Sabouraud en 100mL de agua, los cuales fueron esterilizados, luego se agregó la levadura y se dejó en incubación (23°C) hasta alcanzar una concentración entre 1×10^7 y 1×10^8 cel/mL. Se agregaron los 100mL de inóculo en 900mL de muestra hidrolizada y esterilizada, se incubaron a 24,6°C. Se realizaron conteos de células cada 12 horas para evaluar el crecimiento del microorganismo y determinar el tiempo de fermentación, que osciló entre 72 y 108 horas.

Los resultados obtenidos de bioetanol demuestran que la cantidad obtenida es muy baja para entrar al mercado de venta, reportando los siguientes rendimientos luego se determinaron los rendimientos de etanol por cada mezcla y/o residuo: limón-lulo 9,22 g/kg, limón: 6,36 g/kg, maracuyá: 7,92 g/kg, mora: 5,99 g/kg, mora-mango: 5,41 g/kg, maracuyá-lulo: 6,94 g/kg, lulo: 4,81 g/kg, maracuyá-limón: 6,66 g/kg, mango: 6,85 g/kg., mediante el método del dicromato de potasio. Finalmente, se realizó un análisis de costo donde se muestra la viabilidad del proyecto.

INTRODUCCIÓN

Según cifras del Ministerio de Ambiente, en Colombia se producen alrededor de 9.488.204 toneladas de residuos sólidos cada año¹ y de estos residuos, entre el 50% y 60% (dependiendo de la ubicación) son de carácter orgánico, también es importante considerar que año tras año la producción total de desechos va en aumento debido a que la generación depende directamente de la población.

El crecimiento acelerado de residuos sólidos ha hecho necesario la implementación de desarrollo tecnológico e industrial de proyectos que revaloricen esta materia y así minimizar el impacto que genera la incorrecta disposición final que se le da, adicional a esto siempre se obtiene un segundo beneficio brindado por el producto generado. De los productos obtenidos por residuos se encuentran: ácidos orgánicos, biocombustibles, componentes aromáticos, metabolitos secundarios bioactivos, entre otros. De los posibles usos, la producción de biocombustibles genera un doble impacto ambiental, su revalorización en sí y la “competencia” para los combustibles fósiles junto con todos los efectos negativos que estos generan: gases invernadero, lluvias ácidas, derrames en ecosistemas, contaminación atmosférica, extinción de especies, etc. Colombia se ha comprometido a reducir la emisión de gases efecto invernadero en un 30%² y para esto, uno de los objetivos es promover el uso de vehículos con menor intensidad de carbono; actualmente en el país se utiliza mayoritariamente combustible E10 (que contiene 10 partes de etanol y 90 de gasolina) y ya se ha demostrado la viabilidad de utilizar E20 (20 partes de etanol y 80 de gasolina), sin embargo, la producción de etanol para estas mezclas proviene únicamente de la caña de azúcar, lo cual genera gran problemática por la deforestación de suelos, competitividad para el cultivo de productos con fines alimenticios y la emisiones de CO₂ de un proceso agrícola adicional. Es por esto que se hace necesario el desarrollo a escala comercial de Biocombustibles de segunda generación, que son aquellos obtenidos a partir de los residuos propiamente.

¹ MINAMBIENTE. Colombia Celebra Día Mundial Del Reciclaje. [Electrónico]. 15 de Mayo de 2015. [Consultado el 07 de Septiembre2015]. Disponible en: <https://www.minambiente.gov.co/index.php/component/content/article/2-noticias/1793-colombia-celebra-dia-mundial-del-reciclaje>

² MINAMBIENTE. Colombia Se Compromete a Reducir El 20% De Sus Emisiones De Gases De Efecto Invernadero Para El Año 2030. [Electrónico]. 21 de Julio de 2015. [Consultado el 07 de Septiembre2015]. Disponible en: <https://www.minambiente.gov.co/index.php/component/content/article/2-noticias/1913-colombia-se-compromete-a-reducir-el-20-de-sus-emisiones-de-gases-de-efecto-invernadero-para-el-ano-2030>

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la producción de etanol a partir de residuos orgánicos y sus diferentes mezclas, generados en la empresa alimentos SAS.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Seleccionar los residuos orgánicos para la hidrólisis enzimática a escala banco.
- Caracterizar los residuos orgánicos seleccionados.
- Realizar el proceso de fermentación de los azúcares obtenidos en la hidrólisis enzimática a escala banco, por medio de un diseño de experimentos para su posterior destilación a escala laboratorio.
- Analizar las propiedades fisicoquímicas del producto obtenido de la destilación en cada caso.
- Realizar el análisis de costos para la futura implementación del proyecto a escala planta piloto.

1. GENERALIDADES

1.1 ALIMENTOS SAS S.A.S.

Alimentos SAS S.A.S. es una empresa ubicada en la ciudad de Bogotá, la cual cuenta con una trayectoria de más de 30 años en el mercado colombiano de alimentos procesados, enfocada en productos derivados de frutas nacionales.

El mercado actualmente atendido por SAS está comprendido fundamentalmente por la mayoría de las cadenas de autoservicio, clientes institucionales (cadenas de comidas rápidas, hoteles, restaurantes, instituciones educativas y hospitalarias) y clientes industriales (fábricas de mermeladas, derivados lácteos, jugos etc), contando con una base de más de 500 clientes activos. Así mismo, existe un creciente mercado de exportación de pulpas de frutas tropicales.

Además, cuenta con la certificación ISO 22.000, ISO 9001, HACCP, KOSHER, concepto favorable de la FDA y del INVIMA, donde los procesos han sido evaluados para cumplir con estándares de calidad para el consumidor nacional e internacional³.

1.1.1 Finalidad de la empresa. ALIMENTOS SAS S.A.S, es una empresa perteneciente al sector agroindustrial, dedicada al desarrollo, producción y comercialización de pulpas, néctares de fruta, congelados y asépticos de excelente calidad.

1.1.2 Misión. Alimentos SAS S.A.S procesa, distribuye y comercializa para el mercado institucional y masivo, a nivel nacional e internacional, un amplio portafolio de productos de fruta de excelente calidad, garantizando siempre la inocuidad del producto, buscando permanente generación de valor para los grupos de interés.

1.1.3 Visión. Para septiembre de 2016, seremos reconocidos como los expertos en frutas por nuestro portafolio de productos y servicios, capacidad de innovación y altos estándares de calidad, por lo que clientes y proveedores nos preferirán como el mejor socio de negocios, a la vez que mantenemos un crecimiento sostenible y rentable.

³ ALIMENTOS SAS S.A.S. Quienes Somos. [Electrónico]. [Consultado el 05 de Septiembre 2015]. Disponible en: <http://www.pulpas-de-frutas.com/quienes-somos-fruit-pulp-alimentosprocesados-exoticas.htm>

1.1.4 Situación actual de los residuos generados en la empresa. Alimentos SAS S.A.S. actualmente no cuenta con algún plan de gestión que proporcione una valoración y/o aprovechamiento de los residuos que se generan en ella como resultado del desarrollo del proceso industrial, sin embargo, anteriormente desarrollaba planes como elaboración de compostaje y fabricación de concentrado para ganados, los cuales dejaron de interesarle a la empresa debido a los resultados ineficientes que se presentaron.

Con el desarrollo de este proyecto de investigación, se pretende brindarle a la empresa Alimentos SAS S.A.S. el planteamiento preliminar de un proceso, que, a largo plazo, les permita el aprovechamiento y valorización de los residuos que generan actualmente; de manera que su proceso global sea sostenible y les dé la oportunidad de mostrarse como una empresa ambientalmente responsable.

1.2 RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS

La lignocelulosa es el biopolímero más abundante en la naturaleza, ya que es el componente principal de las paredes celulares vegetales. Los residuos lignocelulósicos se dividen en seis grupos⁴:

- Residuos Agrícolas: De los cuales hacen parte los bagazos cereales, hueso de aceituna y pulpa.
- Maderas duras como la de álamo y chopo.
- Maderas blandas como la de pino y abeto
- Residuos celulósicos obtenidos de papelería.
- Biomasa herbácea obtenida de alfalfa, pasto varilla, alpiste, limoncillo entre otros.
- Residuos sólidos urbanos.

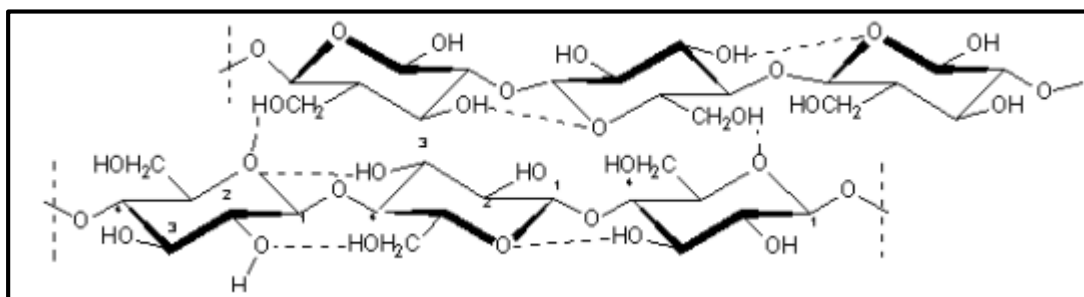
1.2.1 Composición de la lignocelulosa. La biomasa lignocelulósica está compuesta por los polisacáridos, lignina y otras sustancias.

⁴ DÍEZ, S. B. Obtención De Bioetanol 2G a Partir De Hidrolizados De Paja De Trigo: Fermentación Conjunta De Los Penta y Hexa Carbohidratos Con Pichia Stipitis. Universidad de Valladolid, Escuela de Ingenierías Industriales, 2013. p. 13

1.2.1.1 Polisacáridos. Comprende del 60-80% del material lignocelulósico. Este componente hace referencia a la celulosa y hemicelulosa que son hidrocarburos de alto peso molecular⁵.

- **Celulosa:** se caracteriza por su insolubilidad en medio acuoso y en la mayoría de solventes orgánicos. Es el componente principal de la pared celular vegetal, formado por moléculas β -D-Glucosa organizadas en cadenas lineales largas unidas en la forma $\beta(1,4)$, presentan enlaces de puentes de hidrógeno entre grupos hidroxilo y fuerzas de van der Waals intramoleculares⁶. Cuando la celulosa es hidrolizada se obtiene D-glucosa llegando hasta la degradación total, también se pueden obtener productos intermedios como la celobiosa, celotriosa o celotetrosa⁷.

Figura 1. Estructura de la Celulosa



Fuente: DÍEZ, S. B. Obtención de bioetanol 2G a partir de hidrolizados de paja de trigo: fermentación conjunta de los penta y hexa carbohidratos con *Pichia stipitis*; Universidad de Valladolid; Escuela de Ingenierías Industriales. 2013. p. 15.

- **Hemicelulosa:** representa del 15-35% de la biomasa vegetal. Está compuesto por azúcares como pentosas, hexosas, desoxihexosas y ácidos urónicos, lo que lo define como un heteropolímero. Sirve como puente que conecta la lignina y las fibras de celulosa. Debido a su naturaleza ramificada, es amorfa y relativamente fácil de hidrolizar a sus azúcares constitutivos⁸.

⁵ Ibid., p. 5

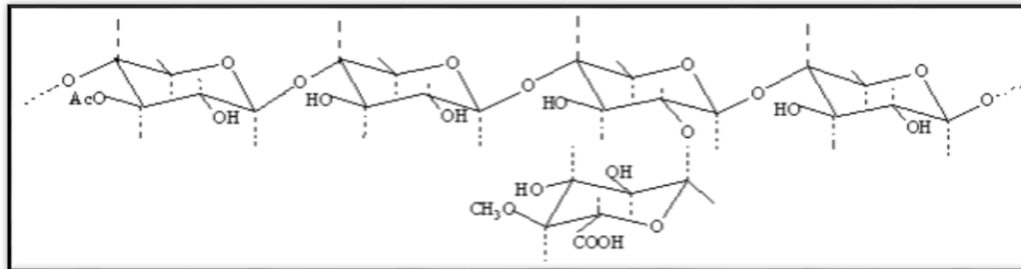
⁶ Ibid., p.5

⁷ LINSTROMBERG, Walter W. Carbohidratos. En Curso Breve de Química Orgánica. Reverte, 1977. p. 388.

⁸ CÓRDOBA, Maureen Daniela. Determinación del Efecto de la Concentración de la Base NaOH, de la Celulosa y Celobiasa en la Hidrólisis Para la Producción de Etanol a partir del Rastrojo de la Piña. Universidad de Costa Rica. Escuela de Ingenierías Industriales, 2011. p. 3.

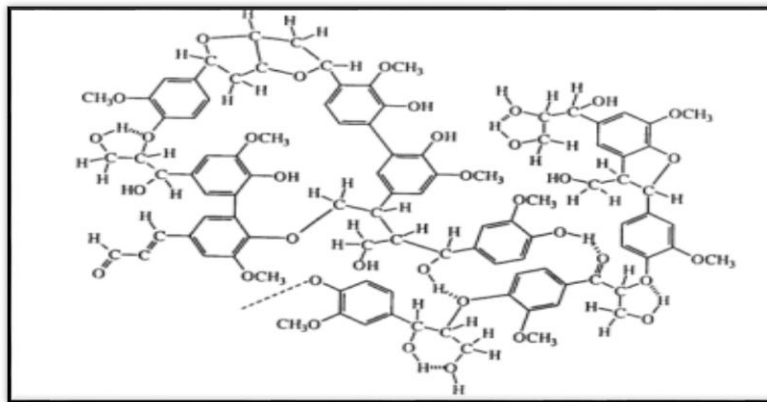
1.2.1.2 Lignina. Sus principales funciones son: actuar como soporte estructural, resistivo contra ataques microbianos y contra estrés oxidativo. La lignina confina a los polímeros existentes en la biomasa lignocelulósica (celulosa y hemicelulosa) por lo que actúa como impedimento para que estas puedan ser hidrolizadas. Tiene una estructura amorfa comprendida por unidades de fenilpropano diferentes: los coniferílicos, cumárico y sinapílico, estos se unen en un polímero gracias a enzimas que producen intermediarios en forma de radicales libres. A diferencia de los polímeros la lignina no está unida de modo único y repetitivo⁹.

Figura 2. Estructura de la Hemicelulosa



Fuente: DÍEZ, S. B. Obtención de bioetanol 2G a partir de hidrolizados de paja de trigo: fermentación conjunta de los penta y hexa carbohidratos con *Pichia stipitis*; Universidad de Valladolid; Escuela de Ingenierías Industriales. 2013. p. 16.

Figura 3. Estructura de la Lignina



Fuente: DÍEZ, S. B. Obtención de bioetanol 2G a partir de hidrolizados de paja de trigo: fermentación conjunta de los penta y hexa carbohidratos con *Pichia stipitis*; Universidad de Valladolid; Escuela de Ingenierías Industriales. 2013. p. 17.

⁹ TAIZ, L. y ZEIGER, E. Metabolitos Secundarios y Defensa En Las Plantas. En: Fisiología Vegetal. Universitat Jaume I, 2006. p. 549.

1.2.1.3 Otras sustancias. Son aquellas que no hacen parte de la estructura de la pared celular, ejemplo de estas son: grasas, ceras, alcaloides, proteínas, fenoles simples y complejos, azúcares simples, pectinas, mucílagos, gomas, resinas, terpenos, etc. Estas pueden ser intermediarios metabólicos o que simplemente aportan propiedades físicas.

1.3 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LAS FRUTAS

La finalidad de esta actividad es definir la calidad, condición, estado, utilidad, etc. de los residuos que se pretenden utilizar como materia prima del proyecto. Bajo esta actividad se podrán definir y deducir procesos posteriores y determinantes, como hidrólisis, fermentación y mezclado. Es importante llevar a cabo esta tarea para cada uno de los residuos, ya que es muy probable que su composición química varíe, independiente de los registros que se puedan encontrar, esto, debido a que los métodos y técnicas de caracterización que se realizan son diferentes a los consignados en la referenciación bibliográfica¹⁰.

1.3.1 Caracterización física. La caracterización física de las frutas se realiza para determinar ciertos parámetros que ayudan a identificar las condiciones bajo las cuales han crecido, ejemplo de estos parámetros son el color, la firmeza, peso, entre otros¹¹.

- **Color:** Las partículas de los alimentos dicta el color del mismo, dado por la cantidad de luz que estas absorban y su dispersión. Este parámetro se determina de forma empírica y puede ser reproducible.
- **Firmeza:** Este parámetro dicta la atracción interna de la fruta, dando una idea de la buena manipulación a la que se ha sometido. Esta característica se mide penetrando un dispositivo cilíndrico sólido para reconocer su resistencia.

¹⁰ PEREIRA, Sandra Cerqueira, et al. 2G Ethanol From the Whole Sugarcane Lignocellulosic Biomass. En: BIOTECHNOLOGY FOR BIOFUELS. 03/12.vol. 8, no. 1, p. 1-16.

¹¹ TORRES F.,Nelly Rocío. Determinación Del Potencial Nutritivo y Nutraceutico De Cuatro Cultivares De Tomate De Árbol (Solanum Betaceum). Riobamba-Ecuador.: Escuela superior Politécnica de Chimborazo, 2006. p. 15.

1.3.2 Caracterización química. Realizar la caracterización química es determinante, debido a que brinda las bases de desarrollo del proyecto, esto, porque en los procesos químicos a realizar, es importante e indispensable controlar las condiciones de operación; condiciones que serán determinadas por los microorganismos de trabajo que variarán su eficiencia y efectividad según el sustrato, además, la elaboración de mezclas debe hacerse entre materias similares, tratando en lo posible de evitar efectos adversos que impidan o inhiban cualquiera de los procesos a realizar y por el contrario, combinar residuos que puedan llegar a aumentar la eficiencia en la obtención del producto final¹². Además, la importancia de identificar los compuestos y no tomar como referencia publicaciones anteriores se ve en que la composición química y biológica varía dependiendo del medio, genética de la planta, almacenamiento, entre otros¹³.

1.3.2.1 Acidez Titulable. A partir de esta caracterización se mide la cantidad del ion hidroxilo necesaria para neutralizar los cationes de ácidos orgánicos presentes en la fruta y así determinar la cantidad de estos.

1.3.2.2 Sólidos Solubles (°BRIX). En esta se mide la cantidad de elementos solubles presentes en la muestra, mediante la refractometría, la cual está dada por la desviación de ángulo luminoso, los azúcares, ácidos orgánicos y alcoholes hacen parte de estos elementos solubles.

1.3.2.3 Azúcares Reductores. Al realizar la caracterización de frutas se encontrarán presentes en su estructura azúcares sencillos como la glucosa y la fructosa, sin embargo, al caracterizar las cáscaras y/o semillas de estas, pueden encontrarse disacáridos y polisacáridos como la celulosa, hemicelulosa, entre otras. Para el reconocimiento de azúcares reductores existen métodos como el DNS y Lane y Eynon entre otros.

1.4 HIDRÓLISIS

Es un proceso que tiene como objetivo transformar moléculas de gran tamaño en moléculas fácilmente degradables, rompiendo sus enlaces en presencia de un medio acuoso. Esta reacción se hace para liberar los azúcares monoméricos presentes en materiales lignocelulósicos o en almidón. Es posible realizar la hidrólisis de manera ácida y enzimática. Para el caso puntual de este trabajo, la hidrólisis se realiza en las fracciones de celulosa y hemicelulosa, obteniéndose glucosa de la primera y pentosas, mayoritariamente xilosa de la segunda.

¹² Ibid., p. 16

¹³ HAMES, BonnieR, et al. Rapid biomass analysis. En: APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY. 03/01.vol. 105, no. 1-3, p. 5-16.

1.4.1 Hidrólisis ácida. La hidrólisis ácida emplea catalizadores ácidos, para efectuar la transformación de las cadenas de polisacáridos que contiene la biomasa lignocelulósica (hemicelulosa y celulosa) en sus monómeros elementales. La hidrólisis ácida de los materiales lignocelulósicos es un proceso conocido desde 1819 (Larsson, 2000), Para este tipo de hidrólisis los ácidos que se pueden emplear son el sulfuroso, clorhídrico, sulfúrico, fosfórico y nítrico, siendo el ácido clorhídrico y el sulfúrico los que se emplean mayoritariamente en las industrias. Se pueden emplear ácidos concentrados y ácidos diluidos.

Los de ácidos concentrados operan a bajas temperaturas con altos rendimientos de glucosa, sin embargo, trae como desventaja la neutralización y recuperación del ácido. Los de ácidos diluidos tienen un bajo consumo de ácido, y operan a temperaturas altas (240°C) para poder alcanzar rendimientos aceptables de glucosa¹⁴.

1.4.2 Hidrólisis enzimática. La hidrólisis enzimática usa como catalizador un complejo de enzimas que se llaman celulasas, que está formado por diferentes enzimas que tienen como fin degradar la celulosa y hemicelulosa, los principales tipos de enzimas que completan esta mezcla son la endo- β -1,4-glucanasa las cuales actúan en la celulosa, específicamente en los enlaces β (1,4) glucosídicos que unen las moléculas de D-Glucosa a partir de esta se obtiene la disminución de la cadena celulósica; la exo- β -1,4-glucanasa que actúan sobre los extremos de las cadenas de celulosa liberando glucosa o celobiosa y la β -1,4-glucosidasa mediante la acción de esta enzima se da la hidrólisis de la celobiosa liberando dos moléculas de glucosa y de este modo evita que la celobiosa actúe de forma inhibitoria sobre los otros dos tipos de celulasas. Trabajan a niveles de pH de 4,8 y un rango de temperatura entre 40 y 50 °C¹⁵.

1.4.2.1 Mecanismos de Acción Enzimática. La hidrólisis de la celulosa es muy compleja y viene dada en muchos pasos, incluso tiene más que cualquier otra reacción química que sea catalizada por enzimas. El mecanismo de acción viene dado por las siguientes etapas¹⁶:

- Adsorción de las enzimas en el sustrato.
- Ubicación de un enlace susceptible a hidrólisis sobre la superficie del sustrato (terminaciones de cadenas para las celobiohidrolasas, división de enlaces para las endogluconasas).

¹⁴ DOMINGUEZ, Op. Cit., p. 12.

¹⁵ Ibid., p. 14-16.

¹⁶ TRIANA CARANTÓN, Cristian Fernando. Producción De Bioetanol a Partir De Residuos Provenientes Del Cultivo De Café. Universidad Nacional de Colombia - Sede Manizales, 2010. p. 35.

- Formación del complejo enzima-sustrato.
- Hidrólisis del enlace β -glucosídico, seguida del deslizamiento simultáneo de la enzima a lo largo de la cadena de celulosa.
- Desorción de las celulasas del sustrato.
- Hidrólisis de la celobiosa por la acción de las β -glucosidasas e inhibición de la enzima por producto formado.

1.4.3 Multifect B. Multifect B® Beta Glucanasa de Genencor, es un complejo enzimático de celulasas y beta-glucanasas obtenido de la fermentación del *Trichoderma reesei*, utilizada para procesos como fermentación, hidrólisis y reducción de viscosidad de materias primas derivadas de plantas que contengan material celulósico, además es empleado en la modificación de fibras del papel. Tiene un rango entre 4.0 – 6.0 de pH, siendo 5.0 el pH óptimo para procesos, dependiendo de la temperatura, tiempo y concentración de sustrato a la que se esté operando. El rango de temperatura a la que puede trabajar es de 40°C-60°C, siendo 50°C la temperatura óptima, la cual, depende de las mismas condiciones de trabajo dichas en el pH. La cantidad de Multifect B utilizada en materias primas celulósicas tiene un rango de 0,05 a 0,1% (peso/peso) de sustrato sólido, con una actividad enzimática de 2,250 Unidades de Beta Glucanasa/mL¹⁷.

1.4.4 Actividad Enzimática. La actividad enzimática para complejos de celulasas, se puede definir como la cantidad de azúcares reductores que es capaz de producir mediante hidrólisis la enzima en una unidad de tiempo. La actividad enzimática se puede determinar mediante papel filtro, actividad sobre Carboxi-metil-celulosa (CMC) y actividad sobre β -Glucosidasa.

1.4.5 Determinación de azúcares reductores por el método del DNS. El método DNS es uno de los más empleados al momento de cuantificar los azúcares presentes en una muestra. EL reactivo DNS, fue desarrollado por Sumner y está compuesto por ácido dinitrosalicílico, sal de rochelle la cual impide que el reactivo se disuelva con el oxígeno, fenol que aumenta la cantidad de color, hidróxido de sodio que realiza la acción reductora de la glucosa en el ácido y bisulfito de sodio que le da la estabilidad al color obtenido en presencia del fenol¹⁸.

El DNS es un método de colorimetría en el cual se da una reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico en presencia de calor y de los azúcares reductores que entran en contacto con él, desarrollando un cambio de color visible de amarillo a rojo. Estos cambios se leen a través de un espectrofotómetro a una longitud de onda determinada. La concentración de azúcar presente en la muestra problema es

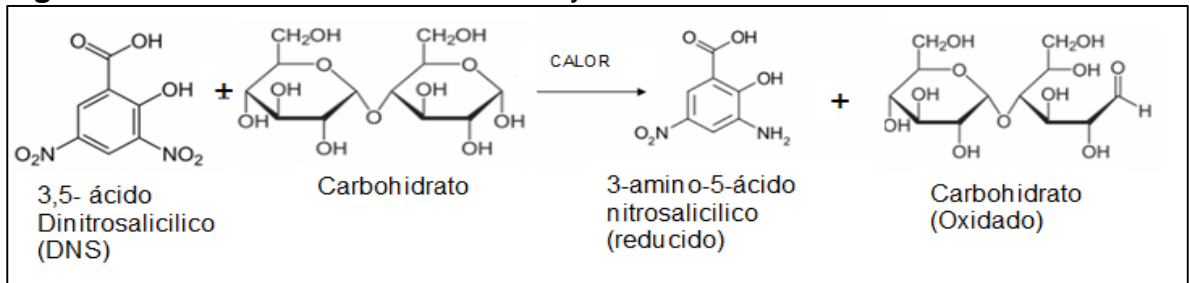
¹⁷ MULTIFECT B GENENCOR BETA GLUCANASE; Genencor; 2011. En www.genencor.com

¹⁸ MILLER, Gail Lorenz; Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar; En: Analytical Chemistry Vol 31, 1959; p. 426.

determinada por la línea recta creada en la curva de calibración del azúcar patrón empleado, la gráfica lleva como coordenada “y” la absorbancia y en el eje “x” se lee la concentración de glucosa.

La reacción de óxido-reducción ocurre debido al grupo OH libre que se presentan en los azúcares reductores, al calentar la muestra se da la oxidación del azúcar mientras que el DNS se reduce.

Figura 4. Reacción redox entre el DNS y azúcares reductores.



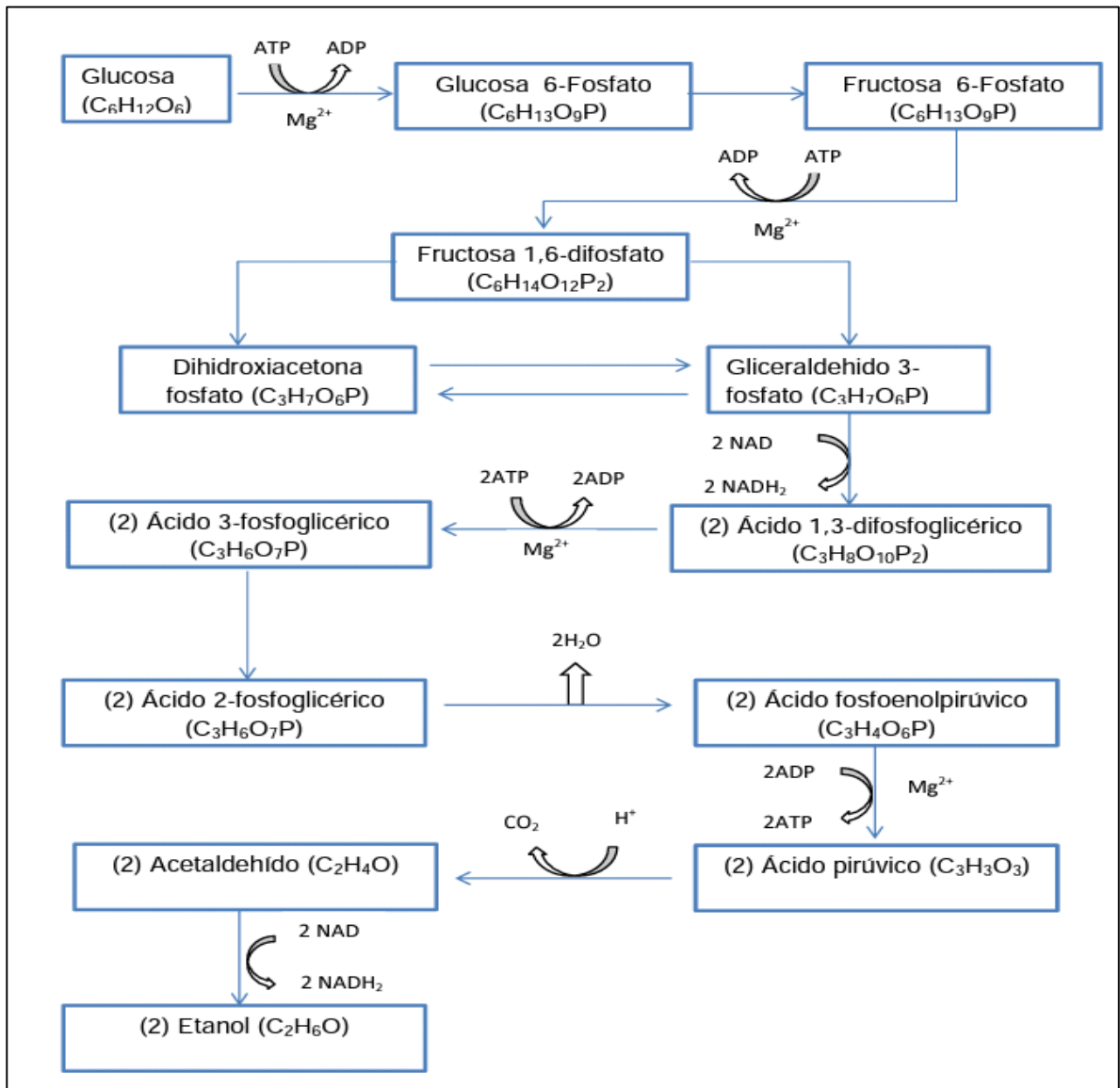
1.5 FERMENTACIÓN

Es un proceso que transforma las moléculas de azúcar a diferentes productos que dependerán del sustrato y del tipo de microorganismo que se utilice, las principales sustancias que se obtienen de la fermentación son: alcohol etílico, ácido láctico, ácido butírico, ácido acético, entre otros y de acuerdo a estos se denomina el tipo de fermentación, además algunas fermentaciones como la alcohólica producen dióxido de carbono.

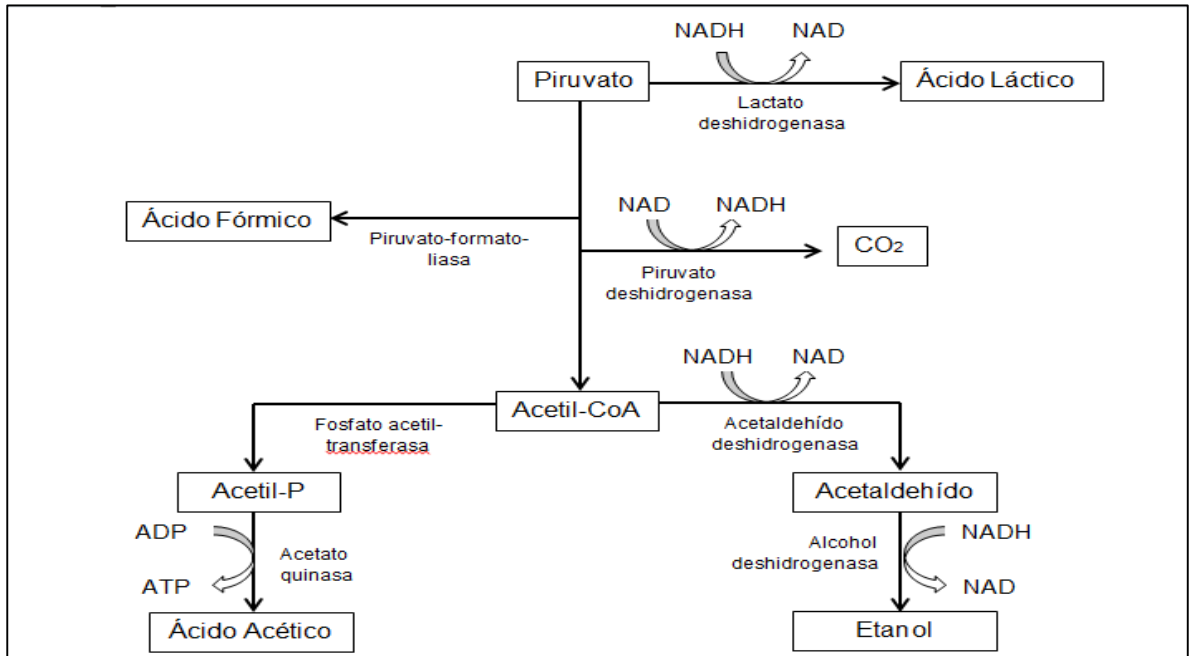
1.5.1 Fermentación alcohólica. La fermentación alcohólica es un proceso anaeróbico realizado por levaduras o bacterias. Donde el sustrato celular; mono y di-sacárido en su mayoría, son transformados principalmente en alcohol etílico y dióxido de carbono, con la generación de equivalentes de reducción de los compuestos NADH/NAD⁺ y NADHP/NADP⁺ y enlaces de alta energía de fosfato, ATP. Para que se pueda desarrollar la glucólisis y el metabolismo del piruvato, es necesario que la molécula de glucosa o fructosa sean transformadas a glucosa-6-fosfato o la fructosa-6-fosfato respectivamente. Será a partir del piruvato que se desarrollarán las reacciones por las que se obtiene el alcohol, como las reacciones son anaeróbicas para el caso de fermentación alcohólica la reducción del piruvato a etanol es posible por la acción de la forma reducida de la coenzima NAD, encargada de realizar la oxidación¹⁹.

¹⁹ ACOSTA ROMERO, Carolina. Evaluación De La Fermentación Alcohólica Para La Producción De Hidromiel. Universidad Nacional de Colombia, 2012. p. 6.

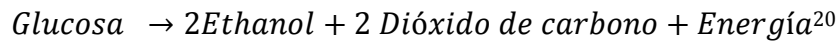
Esquema 1. Ruta metabólica de la Glucólisis.



Esquema 2. Ruta Metabólica del Piruvato.



De manera general, la producción de etanol a partir de glucosa está definida por la siguiente ecuación:



Teóricamente el rendimiento es de 0,511 g de etanol por cada gramo de glucosa consumida.

1.5.2 Microorganismos utilizados para la fermentación. Generalmente, la levadura es el microorganismo más utilizado en la producción de etanol, sin embargo, existen bacterias y hongos que son capaces de sintetizar cantidades apreciables de alcohol.

La levadura ***Saccharomyces cerevisiae***, es la especie de mayor uso en la industria de vinos y cerveza. Se describe normalmente como un anaerobio facultativo, de modo que crece tanto en condiciones anaerobias como aeróbicas, es capaz de emplear un amplio rango de sustratos entre mono-, di- y oligo-sacáridos, así como etanol, acetato, glicerol y hasta lactatos; siendo la glucosa su fuente de carbón preferida²¹.

²⁰ DRAPCHO, Caye M.; NGHIM, Nhuan Ph y WALKER, Terry. Ethanol Production. En: McGraw Hill Professional, Access Engineering, 2008.

²¹ Ibid., p. 144.

Pichia stipitis es una levadura del género *Schefferomyces*, también llamada *Scheffersomyces stipitis*, es un microorganismo facultativo. Este microorganismo tiene como ventaja su capacidad de metabolizar glucosa en etanol, además, *P. stipitis* es capaz de fermentar xilosa sin necesidad de adicionar complejos vitamínicos, cuenta con un amplio rango de azúcares como la celobiosa, lo que permite suponer mayor eficiencia para metabolizar los carbohidratos presentes en biomasa lignocelulósica hidrolizada. Tiene un tamaño de 3-5 μm de diámetro, crece a condiciones de temperatura de 25 a 37°C y de pH entre 5-6. Se registra una cantidad máxima de 0,51g de etanol por cada gramo de glucosa o xilosa que se esté fermentando²².

Zymomonas mobilis es una bacteria Gram negativa, es capaz de crecer en un rango de temperaturas de 25 a 45°C. Es una alternativa muy utilizada para producir etanol a grandes escalas, debido a su tolerancia a altas concentraciones de etanol, en las levaduras este factor es inhibitorio e impide obtener altos rendimientos, esta bacteria puede alcanzar concentraciones hasta del 12% p/v en fermentaciones con glucosa. No obstante se ve limitada por un corto rango de carbohidratos para ser fermentados, *Zymomonas* sólo fermenta la glucosa, la fructosa y la sacarosa, por lo que prácticamente no transforma alguna otra fuente de carbono²³.

La ***Clostridium thermocellum*** es una bacteria termófila anaerobia, la cual se reproduce en un rango de temperatura entre 30-60°C; es indicada para fermentar biomasa lignocelulósica hidrolizada, debido a que es capaz de metabolizar celulosa, glucosa y productos intermedios que se obtienen en la hidrólisis de celulosa, como celobiosa y celodextrinas²⁴.

1.5.3 Factores que afectan la fermentación²⁵.

- **Temperatura:** Es uno de los factores más importantes al momento de realizar cualquier reacción, especialmente si estas vienen dadas por microorganismos, ya que estos tienen un rango específico de temperatura para que sea posible su crecimiento.
- **pH:** al igual que la temperatura, existe un rango óptimo de pH que permitirá el crecimiento acelerado de la levadura durante la fermentación, obteniendo un mayor rendimiento, además que este tiene una gran influencia en los productos finales del metabolismo anaerobio.

²² DÍEZ, S. B. *op. cit.*, p. 30-31.

²³ ANGULO VALENCIA, Alexandra E. Efectividad de microorganismos nativos en relación a *Aspergillus niger*, *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 y *Zymomonas Mobilis* para la producción de bioetanol a partir de residuos de sandía “*Citrullus lanatus*” a escala piloto, Escuela politécnica del ejército, 2010. p. 40-44.

²⁴ *Ibid.*, p. 45.

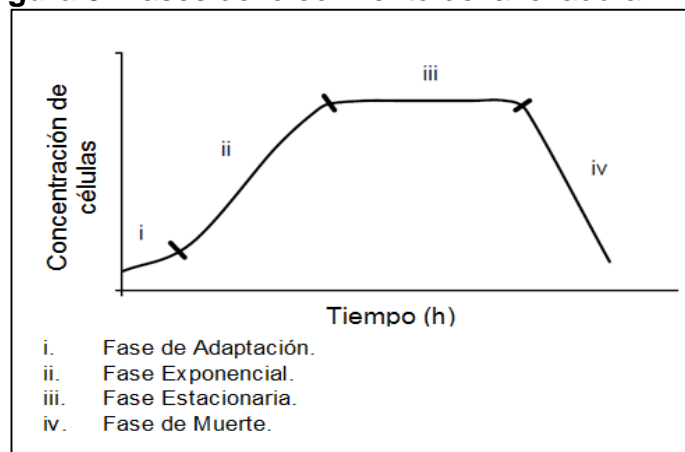
²⁵ ACOSTA ROMERO, Carolina. *op. cit.*, p. 144.

- **Nutrientes:** Es necesario garantizar que el medio de cultivo tenga todos los elementos necesarios para que se efectúe el crecimiento microbiano.
- **Aireación:** La presencia de oxígeno determinará tanto la selección del microorganismo como el producto que se obtenga en la fermentación.

1.5.4 Comportamiento del crecimiento de la levadura. Para representar el comportamiento del crecimiento de la levadura con respecto al tiempo se realiza una curva de crecimiento, en ella se identifican las cuatro fases por las que pasa el microorganismo²⁶:

La primera fase es la de adaptación en la cual no se evidencia un aumento en el número de células, debido a que el microorganismo está adaptándose a las condiciones de los nutrientes y ambiente. La segunda fase es la logarítmica o exponencial, se identifica por el crecimiento acelerado de la población microbiana, en esta se alcanza la concentración máxima de la levadura. El final de esta etapa ocurre cuando los nutrientes se acaban, cuando se cambian las condiciones del medio o cuando se metabolizan productos tóxicos que inhiben el crecimiento. La tercera fase es la estacionaria, esta ocurre luego de alcanzar la concentración máxima de células, por lo cual la velocidad de crecimiento es igual a la velocidad de muerte. La última fase es la fase de muerte, donde el número de células muertas es mayor al número de células reproducidas.

Figura 5. Fases del crecimiento de la levadura.



²⁶ SÁNCHEZ MIGUEL; Anabel. Fermentación de malta empleando un sistema semicontinuo en el proceso de elaboración de cerveza. Universidad tecnológica de la mixteca. 2011. p. 16-17.

1.6 DESTILACIÓN

La destilación es una operación unitaria, es uno de los métodos más utilizados para separar y purificar líquidos. El objetivo principal de este proceso es aprovechar las diferentes volatilidades de los componentes presentes en una mezcla y separar los volátiles de los no volátiles. La efectividad de esta operación unitaria depende de la cantidad de la muestra, el equipo de destilación que se utilice, la formación de azeótropos, entre otros²⁷.

Destilación Flash o de Equilibrio: esta destilación ocurre en una sola etapa, se caracteriza porque la mezcla líquida se vaporiza parcialmente, luego se establece un equilibrio entre la fase líquida y la de vapor, para luego separarse. Este tipo de destilación no es muy recomendable para separación de componentes de volatilidades parecidas²⁸.

Destilación Simple por lotes o diferencial: esta destilación es la que se realiza generalmente en laboratorios cuando no se tiene un sistema de reflujo, el vapor que se produce va directamente hacia un condensador. La destilación simple se realiza calentando la mezcla líquida inicial hasta su punto de ebullición; en el líquido a medida que pasa el tiempo va disminuyendo la concentración de los componentes más volátiles²⁹.

Destilación simple con arrastre de vapor: cuando los líquidos tienen un punto de ebullición muy alto no se puede destilar a presión atmosférica, puesto que la temperatura necesaria para esta separación no se alcanza con un montaje de destilación simple. La mayoría de sustancias de alto punto de ebullición son insolubles en agua, el arrastre de vapor permite que se alcance la separación a temperaturas bajas³⁰.

1.7 BIOETANOL

El bioetanol es un compuesto químico que comercialmente se utiliza como sustituto de la gasolina, luego de haber sido deshidratado hasta alcanzar una pureza del 99,4%. Se obtiene por dos vías la primera de ellas es la fermentación directa de azúcares como la glucosa o fructosa presentes en frutas y la otra vía hace referencia a la descomposición de los azúcares que están presentes en cereales como el trigo, el maíz, entre otros³¹. Sin importar cuál de las dos vías sea la que se recorra, la elaboración del bioetanol tiene su centro de proceso en la

²⁷ ANGULO VALENCIA; Alexandra Elizabeth, *op. cit.*, p. 63.

²⁸ GALLINAR TERCERO; Ana Gabriel, Control robusto de columnas de destilación para mezclas binarias ideales, Universidad veracruzana, 2015. p. 22.

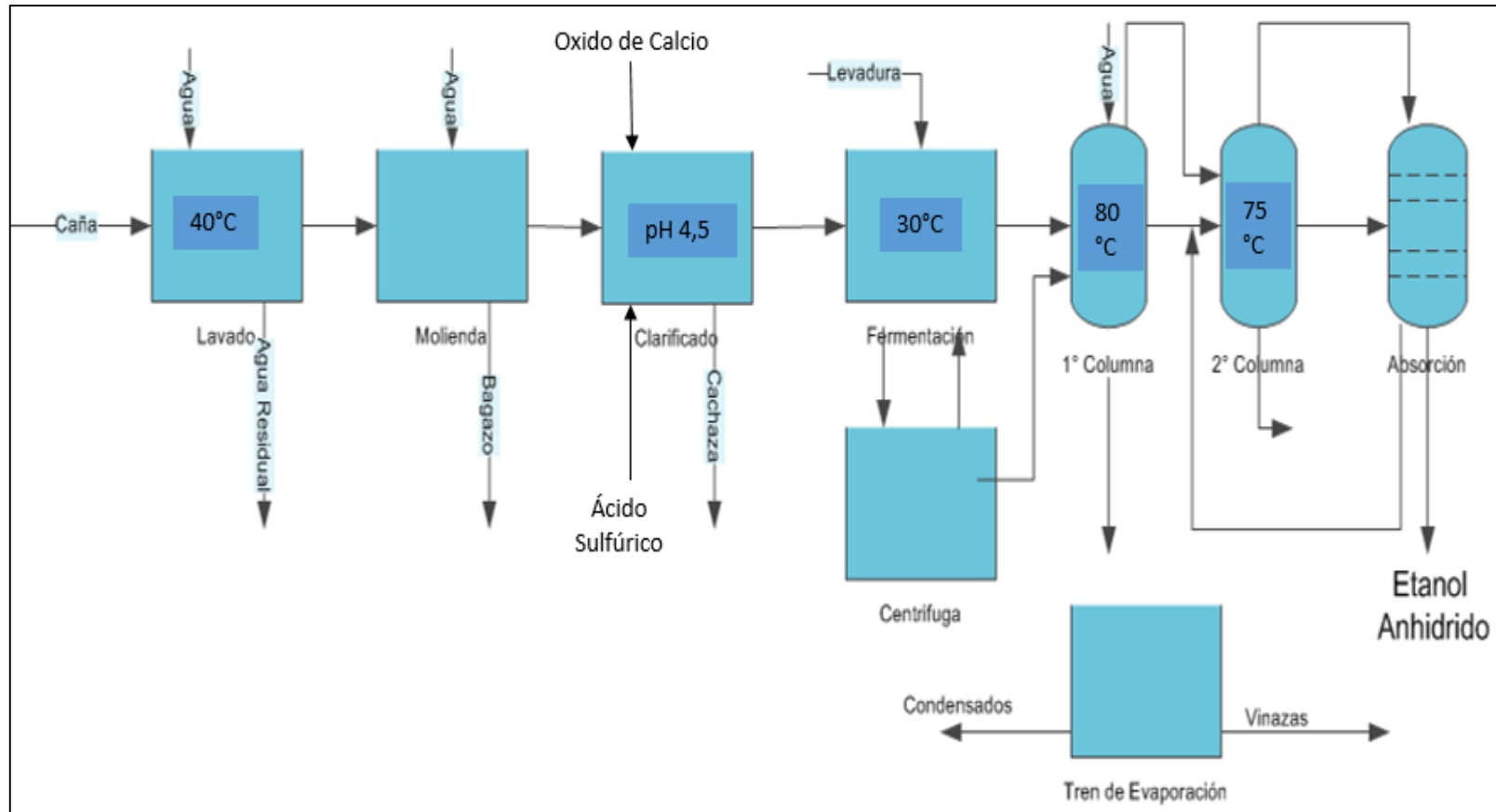
²⁹ *Ibid.*, p. 22.

³⁰ *Ibid.*, p. 6.

³¹ *Ibid.*, p. 6.

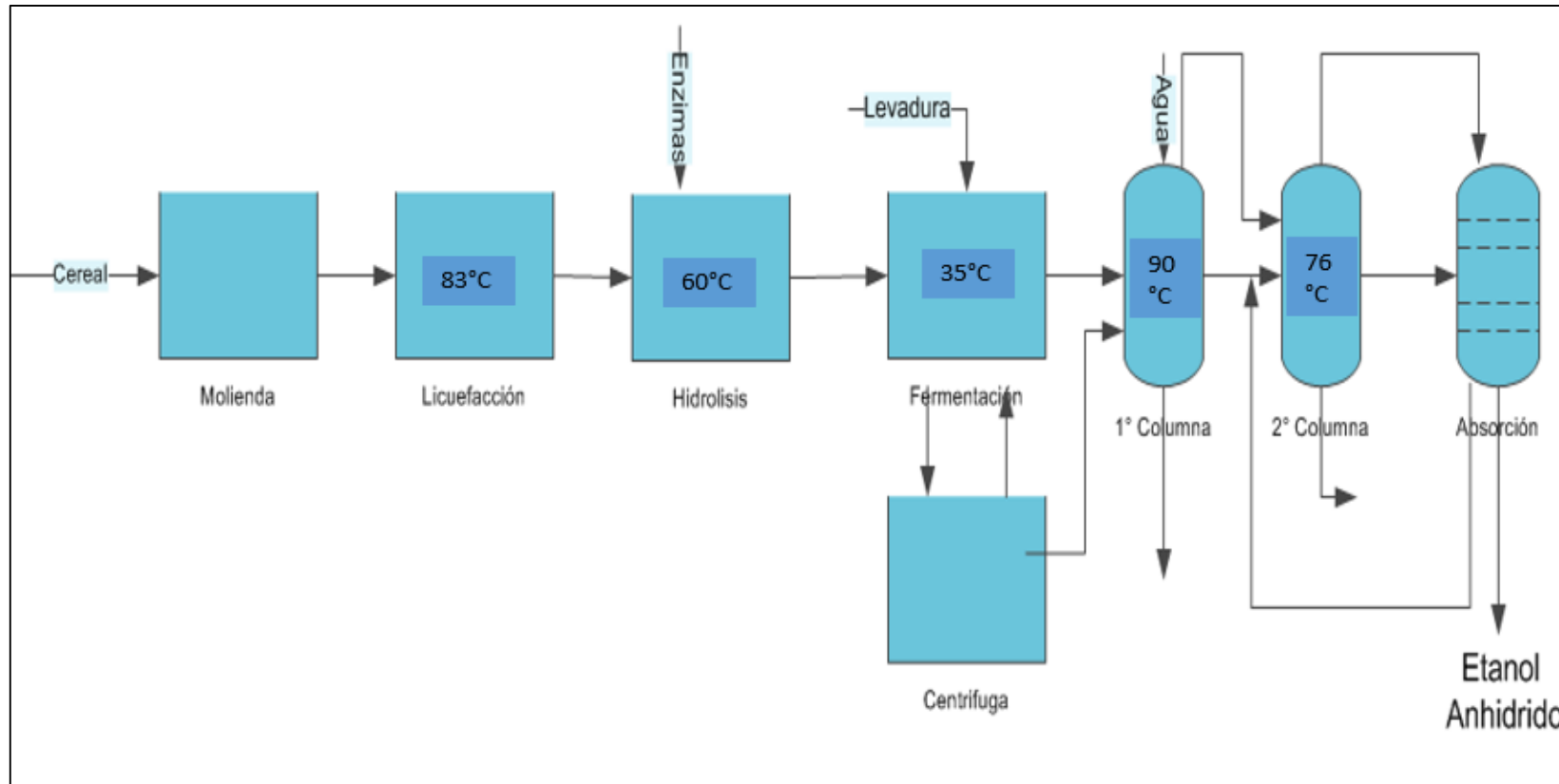
fermentación a la que es sometida la materia prima. La diferencia de los métodos radica en los procesos previos a la fermentación, ya que, para obtener bioetanol de materias primas como la caña de azúcar o la remolacha azucarera, solo es necesario extraer el jugo de éstas para luego ser fermentado, mientras que en la descomposición de maíz y trigo primero se trituran, se realiza la licuefacción y sacarificación de los almidones presentes en ellos para obtener azúcares simples con los cuales se inicia el proceso fermentativo.

Figura 6. Diagrama del proceso bioetanol a partir de caña de azúcar.



Fuente: CARDONA, Carlos; SANCHEZ, Oscar; MONTOYA, María; QUINTERO Julio; Simulación de los procesos de obtención de bioetanol a partir de caña de azúcar y maíz; Scientia et Technica Año XI No 28 Octubre UTP. ISSN 0122-1701; 2005. p. 187 -199.

Figura 7. Diagrama de proceso bioetanol a partir de cereal.



Fuente: CARDONA. Carlos; SANCHEZ, Oscar; MONTOYA, María; QUINTERO Julio; Simulación de los procesos de obtención de bioetanol a partir de caña de azúcar y maíz; Scientia et Technica Año XI No 28 Octubre UTP. ISSN 0122-1701; 2005. P. 190-191.

1.7.1 Bioetanol de Segunda Generación. El bioetanol que se obtiene directamente de las frutas, cereales y/o vegetales se denomina bioetanol de primera generación.

El bioetanol también se puede obtener a partir de sustancias que contienen celulosa como es el caso de la madera y de los residuos agrícolas, este tipo de bioetanol se sitúa como de segunda generación y se conoce como bioetanol celulósico o lignocelulósico, para producirlo, al igual que en la descomposición de los azúcares que contienen los cereales, será necesario adicionar la etapa de hidrólisis lo cual permitirá romper los enlaces presentes en la celulosa y lignocelulosa, obtener el azúcar y realizar el debido proceso de fermentación y destilación³².

1.7.2 Bioetanol como combustible. El uso del bioetanol como combustible vehicular ha tenido gran controversia y poca aceptación en el mercado, debido a que existen motores que no soportan grandes concentraciones de este, sin embargo, el bioetanol se puede mezclar con gasolina hasta en un 10%, concentraciones iguales o menores garantizan el buen funcionamiento del motor sin necesidad de realizar cambios en el mismo. Las mezclas más utilizadas de gasolina/bioetanol son la B5 y la B10, las cuales tienen un 5% y un 10% de bioetanol mezclado con gasolina respectivamente. Países como Estados Unidos y Brasil, cuentan con vehículos ligeros en los cuales los motores tienen una aceptación de combustibles, compuestos de 85% bioetanol y 15% gasolina y 95% bioetanol 5% gasolina, a estas mezclas se les conocen como E85 y E95 respectivamente³³.

Aun, sabiendo todas las desventajas que implica la utilización del bioetanol como combustible vehicular, cabe resaltar que las ventajas que su uso ofrece, sobrepasan los contras que hay con respecto a éste, ya que, el bioetanol tiene mayores concentraciones de oxígeno, lo cual permite una combustión más limpia. El número mayor en el octanaje, el mayor calor de vaporización y el que los límites de inflamabilidad con el aire sean mayores, permiten que el tiempo de encender el motor y de inyección de alcohol sean menores³⁴.

³² Ibid., p. 6.

³³ GUIGOU, Marian. Producción de Bioetanol Combustible a partir de Boniato. Universidad de la Republica. Uruguay, 2011. p. 9

³⁴ Ibid., p. 9.

2. SELECCIÓN DE RESIDUOS ORGÁNICOS

Alimentos SAS S.A.S. actualmente cuenta con una base de datos en la que se registran más de veinte componentes utilizados como materias primas, en los que se encuentran frutas naturales y concentrados de frutas de los cuales no se obtiene ningún tipo de residuo orgánico de interés para este trabajo, es por esto que este proyecto solo tendrá en cuenta dieciséis clases de frutas naturales que son procesadas para la elaboración de néctares, pulpa, congelados, etc. y que producen cantidades considerables de desechos orgánicos constituidos principalmente por cáscaras y semillas. Los residuos corresponden a: Curuba, Feijoa, Fresa, Guanábana, Guayaba, Limón, Lulo, Mandarina, Mango, Maracuyá, Mora, Naranja, Papaya, Piña, Tomate de Árbol y Uva.

2.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DE LAS DIECISÉIS FRUTAS

A continuación, se muestran en las tablas de la 1 a la 16, algunas características importantes de cada una de las frutas de interés reportadas por diferentes autores, aunque no son medidas directas, estos datos brindan una idea y concepción de las características que se pueden esperar en los respectivos residuos, además de posibles componentes que puedan afectar el proceso.

Tabla 1. Características fisicoquímicas de la Curuba (*Passiflora Tripartita*).

Peso en fresco (g)	Azúcares Totales (°Brix)	pH	Cáscara (%)	Pulpa (%)	Color
44.4	11.1	3.5	32.4	66	Amarillo-Anaranjado

Fuente: CAÑAR, Dubert Y. y CAETANO, Creuci M. Caracterización fisicoquímica preliminar como estrategia para promoción y conservación de tres frutales neotropicales. En: Acta agronómica. vol. 61, no. 5, p. 83

Tabla 2. Características fisicoquímicas de la Feijoa (*Acca Sellowiana*).

pH	Sólidos Totales (°Brix)	Materia Seca (%)	Contenido Fibra (%)	Pectina (%)
3.6	12	15	3.8-4.3	2.5

Fuente: SUN-WATERHOUSE, Dongxiao, et al. utilisation Potential of feijoa fruit wastes as ingredients for Functional Foods. En: Food and bioprocess technology. vol. 6, no. 12, p. 3441-3455

Tabla 3. Características fisicoquímicas de la Fresa (*Fragaria*).

Muestra de Fruta (g)	Hidratos de Carbono (g) (4.66-7.68)		Fibra (g)	Proteína (g)	Ácidos (mg)		Lípidos (g)
100	Glucosa	2.04-3.03	2	0.7	Cítrico	870	0.3-0.5
	Fructosa	2.5-3.5			Málico	140	
	Sacarosa	0.12-0.35			Oxálico	16	
					Salicílico	1.4	

Fuente: DAMACENO, Marlene Nunes. Caracterización y procesamiento de kiwi y fresa Cultivados por diferentes sistemas. Universidad de Santiago de Compostela, 2007. p. 12.

Tabla 4. Características fisicoquímicas de la Guanábana (*Annona Muricata*).

Muestra de Pulpa de Fruta (g)	Sólidos Solubles Totales (°Brix)	Acidez Total Titulable (% Ácido Málico)	pH	Azúcares Totales (g)	Pectina (g)	Proteína (g)
100	6-13	0,07-1,25	3.93-4.6	11.5-17.9	0.4-0.9	0,6-1.2

Fuente: MÁRQUEZ CARDOZO, Carlos Julio. Caracterización Fisiológica, fisicoquímica, reológica, nutracéutica, estructural y sensorial de la guanábana (*annona muricata* l. cv. elita). Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, 2009.

Tabla 5. Características fisicoquímicas de la Pulpa de Guayaba (*Psidium*).

Sólidos Solubles (°Brix)	Acidez Titulable (%Ácido Cítrico)	Índice de Madurez
11.7	0.196	60.63

Fuente: Rodríguez, Ligia; López, Leslie y García, Maribel. Determinación de la composición química y actividad antioxidante en distintos estados de madurez de frutas de consumo habitual en Colombia, mora (*Rubus glaucus* B.), maracuyá (*Passiflora edulis* S.), guayaba (*Psidium guajava* L.) y papayuela (*Carica cundinam*). En: Alimentos Hoy. vol. 19, no. 21, p. 35-42

Tabla 6. Características fisicoquímicas del Limón (*Citrus Auantifolia*).

Tiempo (Días)	pH	°Brix	Índice Madurez	% Ácido
15	1.27	11	0.23	0.23

Fuente: REINA G., Carlos Emilio; VARGAS C., Esther y WITZ S., Mónica. Manejo Postcosecha y Evaluación de la calidad para la naranja (*Citrus Sinences*), Limón (*Citrus Aurantifolia*) y Mandarina (*Citrus Reticulata*) Que se comercializa en la ciudad de Neiva). [Electrónico]: Neiva: Universidad Surcolombiana, 1995. p. 74.

Tabla 7. Características fisicoquímicas de Lulo (*Solanum V*).

Etapa	Acides Total Titulable (ATT)	Sólidos Solubles Totales (SST)	Ácido Málico (mg/100mgLulo)	Relación de Madurez (SST/ATT)
Maduración	1,24%	9,63 ° Brix	28,06	7.78

Fuente: FONSECA, Magda Carolina, et al. Caracterización fisicoquímica del fruto de cuque (*Solanum vestissimum* Dunal) durante la maduración. En: revista colombiana de ciencias hortícolas. vol. 6, no. 1, p. 31-40

Tabla 8. Características fisicoquímicas de la Mandarina (*Citrus Reticulata*).

Tiempo (Días)	pH	°Brix	Índice Madurez	mL NaOH	% Ácido
11	3.25	11	7.86	1.4	0.18

Fuente: REINA G., Carlos Emilio; VARGAS C., Esther y WITZ S., Mónica. Manejo postcosecha y evaluación de la calidad para la naranja (*citrus sinences*), limón (*citrus aurantifolia*) y mandarina (*citrus reticulata*) que se comercializa en la ciudad de neiva). [Electrónico]: Neiva: Universidad Surcolombiana, 1995. p. 74.

Tabla 9. Características fisicoquímicas del Mango (*Mangifera Indica L.*).

Masa del Fruto (g)	Porcentaje de Cáscara	Porcentaje de Semilla	Porcentaje de Pulpa	Sólidos Solubles Totales (°Brix)	Acidez Total Titulable (%)	Relación Madurez (SST/ATT)
127.9	12.1	11.8	75.9	18.2	0.16	121.4

Fuente: AULAR, Jesús y RODRÍGUEZ, Yecenia. Características físicas y químicas y pruebas de preferencia de tres tipos de mangos criollos venezolanos. En: BIOAGRO. vol. 17, no. 3, p. 171-176

Tabla 10. Características fisicoquímicas de la Maracuyá (*Passiflora Edulis*).

Sólidos Solubles Totales (°Brix)	pH	Acidez Total Titulable (%)	Índice de Madurez
13.3	3.06	3.71	4.09

Fuente: REINA, Carlos Emilio; DUSSAN PARRA, Saúl y SÁNCHEZ S., Ricardo. Manejo Postcosecha y Evaluación De La Calidad De Maracuyá (*Passiflora Edulissims*) Que se comercializa en la ciudad de Neiva. [Electronico]:Neiva: Universidad Surcolombiana, 1999. p. 53

Tabla 11. Características fisicoquímicas de la Mora (*Rubus glaucus Benth*).

Sólidos Solubles Totales (°Brix)	Ácido Titulable (%)	Índice de Madurez	pH
7.6	1.030	7.39	3.1

Fuente: RODRÍGUEZ, Ligia; LÓPEZ, Leslie y GARCÍA, Maribel. Determinación de la composición química y actividad antioxidante en distintos estados de madurez de frutas de consumo habitual en Colombia, mora (*Rubus glaucus B.*), maracuyá (*Passiflora edulis S.*), guayaba (*Psidium guajava L.*) y papayuela (*Carica cundinam*). En: ALIMENTOS HOY. vol. 19, no. 21, p. 35-42

Tabla 12. Características fisicoquímicas de la Naranja (*Citrus Sinensis*).

Tiempo (Días)	pH	°Brix	Índice Madurez	% Ácido
12	3.35	11	1.32	1.06

Fuente: REINA G., Carlos Emilio; VARGAS C., Esther y WITZ S., Mónica. Manejo Postcosecha y Evaluación De La Calidad Para La Naranja (*Citrus Sinences*), Limón (*Citrus Aurantifolia*) y Mandarina (*Citrus Reticulata*) Que se comercializa en la ciudad de Neiva. [Electrónico]: Neiva: Universidad Surcolombiana, 1995. p. 74.

Tabla 13. Características fisicoquímicas de la Papaya (*Carica Papaya*).

Peso (g)	Longitud (cm)	Diámetro (cm)	Sólidos Solubles Totales (°Brix)	Acidez Titulable (%Ácido Cítrico)
383 - 493,3	14,16 - 16,10	5,70 - 8,88	10,6 - 13,3	0,0126 - ,041%,

Fuente: MARUCHI, Alonso, et al. Caracterización de los frutos de cuatro cultivares de papaya del grupo solo, introducidos en Cuba. En: Agronomía costarricense. vol. 32, no. 2, p. 169

Tabla 14. Características fisicoquímicas de la Piña (*Ananas Comosus*).

Acidez Total Titulable (% Ác Cítrico)	pH	Ácido Propiónico (ppm)	Azúcares Totales (%)	Azúcares Reductores (%)
0.71	3.83	2.73	6.22	3.17

Fuente: MORALES, Madelaide, et al. Caracterización de la maduración del fruto de pina nativa (*Ananas comosus* L. Merrill) CV. India. En: *Agronomía colombiana*. vol. 18, no. 1-3, p. 63-69

Tabla 15. Características fisicoquímicas del Tomate de árbol (*Solanum B*).

Masa del Fruto (g)	pH	°Brix	Humedad Base Húmeda (%)
100.11	3.53	8.8	88.2

Fuente: CIRO, HÉCTOR J.; VAHOS, DIEGO L. y MÁRQUEZ, CARLOS JULIO. Estudio experimental de la fuerza de fractura en frutas tropicales: el tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* sendt). En: *DYNA*. vol. 72, no. 146, p. 55-64

Tabla 16. Características fisicoquímicas de la Uva (*Vitis Vinifera*).

Azúcares Reductores (g)	Relación Semilla/Pulpa	Relación Hollejo/Pulpa	Acidez Total (g Ác. Tartárico)
215	0.058	0.16	5.2

Fuente: GONZÁLEZ, Graciela, et al. Caracterización de uvas para vinificar en diferentes regiones de Mendoza (Argentina). En: *revista de la facultad de ciencias agrarias UNCUYO*. vol. 41, no. 1, p. 165-175

2.2 MATRIZ DE SELECCIÓN

En el Anexo A se muestra la producción de residuos de cada una de las frutas en los últimos tres años, resulta sencillo evidenciar que la frecuencia de algunos desechos y la cantidad en la que se producen, hacen que no sea comercialmente viable desarrollar una investigación para ciertos residuos, ya que en definitiva, es probable que no se puedan aprovechar, al menos en un futuro cercano y en el escenario actual que no ofrece la posibilidad de integración oportuna de diversos efluentes de materia orgánica que faciliten la opción de una mayor cantidad de materia. En consecuencia, se hace necesaria una selección previa de los residuos y así poder desarrollar el proceso experimental con una delimitación lógica, para esto se plantea el uso de una matriz de selección, la cual tendrá en cuenta frecuencia y cantidad de residuos y una segunda matriz en la que se consideren el pH y sólidos totales; desde una perspectiva general, se puede decir que se utilizaron dos filtros para dicha selección.

La matriz de selección es una herramienta metodológica útil para la priorización de ideas, temas, parámetros, aspectos, productos, etc, ya que, a través de ésta se facilita la toma de decisiones, reconociendo la importancia de cada parámetro que

se estudia. El primer paso que se hace para la construcción de una matriz de selección es reconocer el conjunto de parámetros, reconocer la relación existente entre ésta, dar un número de puntuación para cada uno, luego promediar los resultados y escoger los aspectos de mayor importancia³⁵.

2.2.1 Variables evaluadas en el desarrollo del proyecto. Se establecieron 4 variables principales con el propósito de preseleccionar los residuos de manera lógica mediante la matriz de selección, dichas variables fueron fisicoquímicas (sólidos totales y pH) y operacionales (cantidad de residuo y frecuencia de residuos).

2.2.1.1 Cantidad de Residuo. Hace referencia al conjunto de desechos orgánicos provenientes de las frutas (semillas, cáscaras) que se utilizan en ALIMENTOS SAS S.A.S. se considera una delimitante de gran importancia, debido a que por medio de este se reconocerán las frutas que producen la mayor cantidad de residuos y por ende son potenciales para producir cantidades significativas de bioetanol.

2.2.1.2 Frecuencia de Residuos. Este parámetro se refiere a qué tan seguido se produce residuos de determinada fruta, es necesario evaluar el impacto que tiene este aspecto en el proyecto, para determinar qué residuos se producen de manera estable a lo largo del año y son esenciales para producir bioetanol de manera constante.

Los resultados para estos dos primeros parámetros están dados como el promedio de cada fruta a lo largo de los últimos tres años (2012, 2013 y 2014).

2.2.1.3 Sólidos Solubles Totales. Con esta característica química se reconoce la cantidad de compuestos tales como: ácidos, sales, azúcares y otros compuestos que son solubles en agua y están presente en los residuos de fruta que se van a utilizar. Es importante evaluar este parámetro ya que con éste se identificará qué frutas presentan grandes concentraciones de los compuestos ya mencionados que pueden ser oportunos para la fermentación como es el caso de los azúcares.

2.2.1.4 pH. El potencial de hidrógeno presente en los residuos de frutas es importante para reconocer qué enzima en la etapa de hidrólisis y qué levadura en la etapa de fermentación se debe utilizar de acuerdo al pH óptimo que éstas requieran.

³⁵ VILAR BARRIO, José Francisco; GOMEZ FRAILE, Fermin y TEJERO MONZÓN, Miguel. Las Siete Nuevas Herramientas Para La Mejora De La Calidad. FC Editorial, 1997. P. 69-92.

2.2.2 Relación de Parámetros. De acuerdo al cuadro 1, la relación entre los parámetros Cantidad y Frecuencia de residuos tienen una relación muy fuerte debido a que la una trae consigo la existencia de la otra, pero estas dos a su vez son independientes de los parámetros restantes, básicamente esto se debe a que los dos primeros son netamente operacionales de la empresa y la demanda que tenga cada fruta y los otros dos aspectos hacen referencia a variables fisicoquímicos que dependen de la naturaleza de cada fruta. Por ende, es necesario primero evaluar los residuos con respecto a los dos primeros parámetros (Tabla 20) y a los residuos con mayor promedio se les evaluarán las otras características (Tabla 23).

Cuadro 1. Relación de Parámetros.

	Cantidad de Residuo	Frecuencia de Residuos	Solidos Solubles	pH
Cantidad de Residuo		●	○	○
Frecuencia de Residuos	●		Δ	Δ
Solidos Solubles	Δ	Δ		●
pH	Δ	Δ	●	
Azúcares Reductores	Δ	Δ	●	●

Relación Fuerte: ●

Relación Moderada: ○

Relación Débil: Δ

Para cada una de las matrices de selección, se obtendrá un promedio global de calificación, este promedio tiene un orden según el valor obtenido, la cual se muestra en la tabla 17. Por lo tanto, habrá dos promedios globales, el primero correspondiente a los parámetros operacionales (frecuencia de producción y cantidad de producción) y el segundo a las variables fisicoquímicas (pH, sólidos solubles y azúcares).

2.2.3 Matriz.

Tabla 17. Clasificación de los valores resultantes en el promedio.

Clasificación	Calificación
Muy Bajo	< 2
Bajo	2.1-3
Regular	3.1-4
Alto	>4

En las tablas 18 y 19, se muestran las calificaciones que se le darán a cada una de las variables según su rango de valores para la primera matriz. Para la calificación de frecuencia, los valores tienen un rango entre 1 y 36, siendo estos valores, el número de meses en los que se produjo cada fruta en el transcurso de los tres años de producción estudiados.

Tabla 18. Escala de calificación para el parámetro cantidad de residuo en kg.

Clasificación	Valor (kg)	Calificación
Muy Bajo	<2000	1
Bajo	2001-3300	2
Regular	3301-4600	3
Alto	4601-5900	4
Muy alto	>5901	5

Tabla 19. Escala de calificación para el parámetro frecuencia de residuos.

Clasificación	Valor (frecuencia)	Calificación
Muy Bajo	<10	1
Bajo	10-15	2
Regular	15-20	3
Alto	20-25	4
Muy alto	>25	5

Tabla 20. Primera matriz de selección.

Parámetro/ Fruta	Curuba	Feijoa	Fresa	Guanabana copos semilla	Guayaba	Limón	Lulo	Mandarina
Cantidad de residuo	1	1	1	1	2	4	4	1
Frecuencia de residuos	2	5	5	5	4	4	5	1
Promedio Global	1,4	2,6	2,6	2,6	2,8	4	4,4	1

Parámetro/ Fruta	Mango	Maracuyá	Mora	Naranja	Papaya	Piña	Tomate de árbol	Uva fruta
Cantidad de residuo	5	5	3	1	1	4	1	1
Frecuencia de residuos	4	5	5	2	5	5	5	5
Promedio Global	4,6	5	3,8	1,4	2,6	4,4	2,6	2,6

En la tabla 20 se observan las 16 frutas que fueron evaluadas bajo los parámetros de cantidad y frecuencia de residuos. Para el primer aspecto se recolectaron los datos de compra mes a mes de cada fruta en kilogramos para los años 2012, 2013 y 2014 (Tablas A2, A3 y A4) junto con la información acerca de los porcentajes de desperdicio para cada una de las materias primas (Tabla A1), los cuales a su vez son muy cercanos a los encontrados en la literatura (Marquez³⁶). Se calculó la cantidad de residuo generado mes a mes por medio del promedio de desperdicio suministrado por la empresa, luego para cada fruta se hizo una media global de los tres años. La clasificación de la escala para la media global está dada en la tabla 18. Para esta primera matriz de selección, el parámetro denominado cantidad de residuo tiene un porcentaje del 60%, ya que no se considera que esta tenga la misma relevancia que el otro aspecto evaluado en la matriz, pues el parámetro de frecuencia no garantiza que de los residuos se puedan obtener cantidades grandes de bioetanol. Para continuar con la elección de residuos se escogen los desechos cuyo promedio de matriz sea mayor a 3.

A continuación, para el desarrollo de la segunda matriz, se plantean las tablas 21 y 22, que indican las calificaciones que se asignarán para los valores de cada una de las variables fisicoquímicas.

³⁶ MÁRQUEZ CARDOZO, Carlos Julio. Caracterización Fisiológica, Fisicoquímica, Reológica, nutraceútica, Estructural y Sensorial de la guanábana (*annona muricata* L. cv. *elita*). Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, 2009.

Tabla 21. Escala de calificación para el parámetro sólidos solubles totales

Clasificación	Valor (g/g totales)	Calificación
Muy Bajo	<10	1
Bajo	10.1-20	2
Regular	20.1-30	3
Alto	30.1-40	4
Muy alto	>40.1	5

Como se mencionó anteriormente, la enzima con la que se va a hidrolizar, tiene un rango de pH ácido para trabajar, por lo tanto, valores altos de pH hacen que la cantidad de solución buffer necesaria para alcanzar la acidez, sea mayor. Por lo tanto, valores básicos tendrán calificaciones bajas en la tabla 22 y valores ácidos mejores puntuaciones.

Tabla 22. Escala de calificación para el parámetro pH.

Clasificación	Valor (pH)	Calificación
Muy Bajo	>12	1
Bajo	9-11.9	2
Regular	7-8.9	3
Alto	5-6.9	4
Muy alto	<4.9	5

Tabla 23. Segunda matriz de selección.

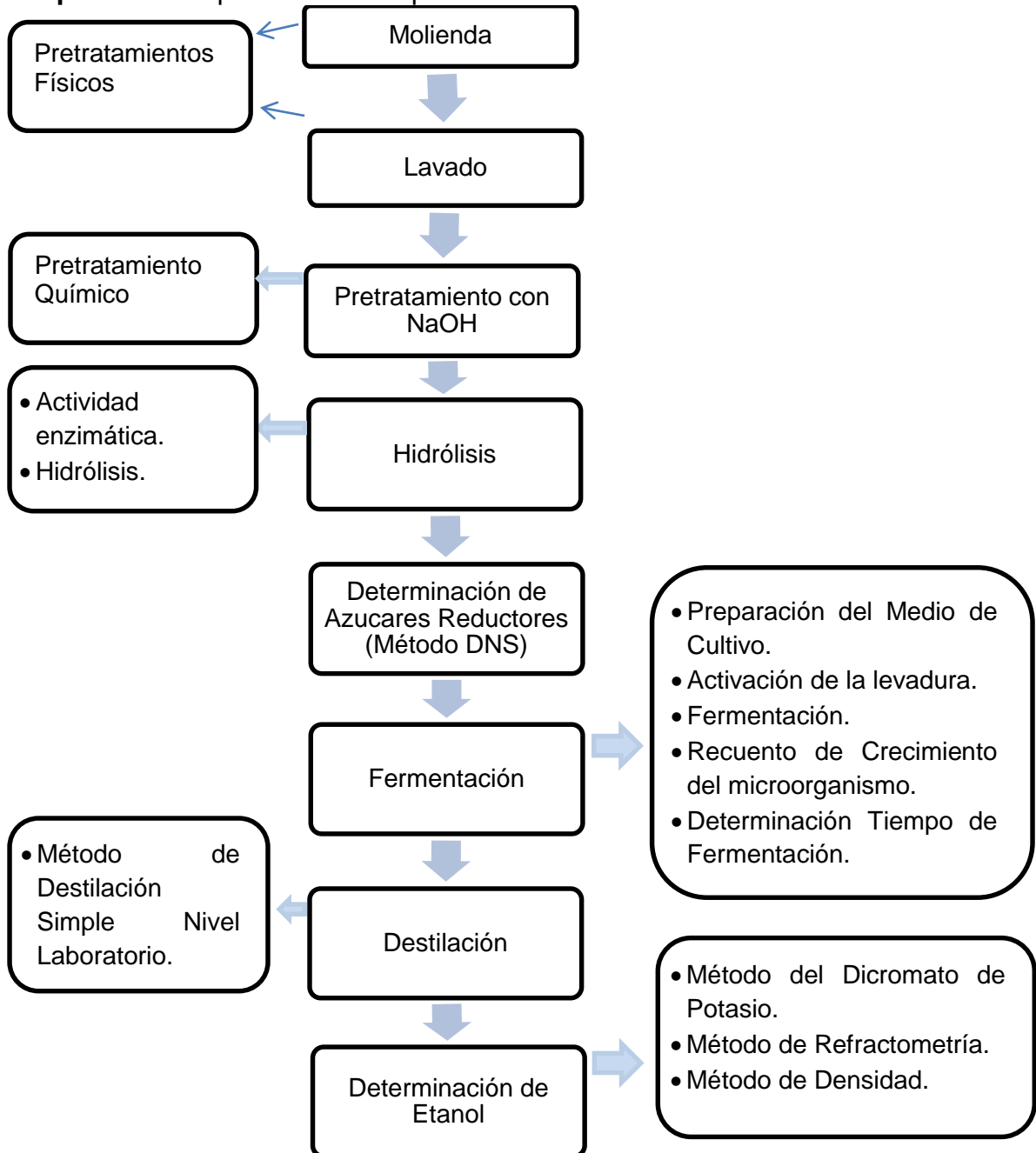
Parámetro/ Fruta	Limón	Lulo	Mango	Maracuyá	Mora	Piña
pH	-----	-----	-----	5	-----	-----
Sólidos Solubles	5	-----	4	3	-----	5
Azúcares	5	-----	4	5	-----	4
Promedio	4,5	-----	3,6	4,1	-----	4,05

Con una primera selección (Tabla 20), se identificaron los residuos de: Limón, Lulo, Mango, Maracuyá, Mora y Piña, como materias primas importantes y considerables para el desarrollo del proyecto en cuanto a cantidad y frecuencia; según lo planteado con anterioridad, se elaboró una segunda matriz (Tabla 23) como segundo filtro para reducir el grupo de estudio, sin embargo, la falta de información propia de los desechos, impide el desarrollo de dicha matriz, por lo cual, la primera clasificación será la que se considere para la siguiente etapa, que es la caracterización experimental de los residuos.

3. MATERIALES Y METODOLOGÍA

El desarrollo experimental se divide en dos partes, caracterización de la materia prima y producción de Bioetanol. A continuación, se presenta el diagrama del paso a paso de las experimentaciones para la producción de Bioetanol:

Esquema 3. Esquema de las experimentaciones realizadas.



3.1 CARACTERIZACIÓN DE RESIDUOS ORGÁNICOS SÓLIDOS

A continuación, se muestra la metodología usada para la evaluación experimental de las principales variables fisicoquímicas de los residuos seleccionados en el capítulo anterior, esto con el propósito de conocer el estado real de las materias primas y su factibilidad de uso en el desarrollo experimental de etapas posteriores.

3.1.1 Acidez titulable por volumetría.

Imagen 1. Determinación de la acidez titulable.



La acidez titulable se determinó bajo la norma AOAC 930.35, en este método se determina el volumen necesario de una base para neutralizar una cantidad conocida de alícuota que es titulada hasta llegar a un punto final que se identifica con el cambio de color que se produce por la presencia de una solución de indicador ácido-base³⁷.

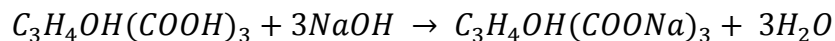
Para determinar la acidez titulable presente en los residuos de las frutas se utilizó como base hidróxido de sodio (NaOH) al 0.1N. Se mezclaron 50 mL de agua destilada con 1 g de residuo de fruta y como indicador se utilizó fenolftaleína 1% P/V. se agregaron tres gotas de este último a la alícuota de 50 mL y se procedió con la titulación adicionando gota a gota el NaOH hasta obtener un color rosa estable en la alícuota. El proceso se realizó por triplicado. El resultado se expresa en gramos de ácido cítrico (ya que es el predominante en el limón³⁸, piña³⁹,

³⁷ RODRIGUEZ BARAHONA, Carmen María; SARABIA TRUJILLO, Cristina Isabel. Efecto del método de fermentación acética en las características físico-químicas y sensoriales en vinagre de naranja agria (*Citrus x aurantium*) y piña (*Ananas comosus*). Universidad Zamorano. 2012. p.7.

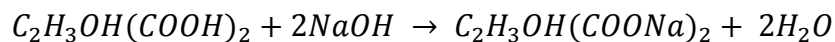
³⁸ DOMÍNGUEZ, E., et al. Aumento de la vida postcosecha del limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Swingle) producido en Apatzingán, Mich., mediante el uso de recubrimientos naturales a diferentes temperat... En: REVISTA IBEROAMERICANA DE TECNOLOGÍA POSTCOSECHA. vol. 5, no. 2, p. 128-133

³⁹ MARTÍNEZ, Andrés Rebolledo, et al. Rendimiento y calidad de fruto de cultivares de piña en densidades de plantación. En: REVISTA FITOTECNIA MEXICANA. vol. 29, no. 1, p. 55-62

mango⁴⁰ (en estado maduro) y Maracuyá⁴¹) por cada 100 gramos de muestra. Para la mora⁴² y lulo, el ácido dominante es el málico. Entonces, asumiendo que el ácido que reacciona es totalmente cítrico, la reacción es:



En el caso de la mora, la reacción es:



Lo cual significa que por cada gramo de NaOH reacciona 1,601 g de ácido cítrico o 1,676 g de ácido málico, y en consecuencia la acidez se da por la ecuación:

Ecuación 1

$$\%Acidez = \frac{V_T * N * 39,997 * 1,601}{M} * 100$$

Donde V_T es el volumen gastado de la solución titulante, N su normalidad, 39,997 el peso por cada equivalente de NaOH y M es la masa de la muestra que se evaluó.

3.1.2 Determinación de Celulosa⁴³. La cantidad de celulosa presente en los residuos de fruta se determinó con el método descrito por Van Soest and Wine.

⁴⁰ SILLER-CEPEDA, Jorge, et al. Calidad poscosecha de cultivares de mango de maduración temprana, intermedia y tardía. En: REVISTA FITOTECNIA MEXICANA. vol. 32, no. 1, p. 45-52.

⁴¹ LIGIA, Rodríguez; LÓPEZ, Leslie y GARCÍA, Maribel. DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN DISTINTOS ESTADOS DE MADUREZ DE FRUTAS DE CONSUMO HABITUAL EN COLOMBIA, MORA (*Rubus glaucus* B.), MARACUYÁ (*Passiflora edulis* S.), GUAYABA (*Psidium guajava* L.) Y PAPAYUELA (*Carica cundinam*. En: ALIMENTOS HOY. vol. 19, no. 21, p. 35-42

⁴² MONTOYA GÓMEZ, Álvaro; LONDOÑO GÓMEZ, Jenny Katherine y MÁRQUEZ CARDOZO, Carlos Julio. Licor de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) con diferentes porcentajes de pulpa. En: REVISTA FACULTAD NACIONAL DE AGRONOMÍA, MEDELLÍN. vol. 58, no. 2, p. 2963-2974

⁴³ N. Abdullah; N. Ejaz; M. Abdullah; Alim Un Nisa; S. Firdous. Lignocellulosic degradation in solid-state fermentation of sugar cane bagasse by *Termitomyces* sp. Colegio de Postgraduados (Campus Puebla, México). 2006. p. 2.

Imagen 2. Determinación del porcentaje de celulosa presente en los residuos.



La cantidad de cada residuo evaluada fue de 1g, la muestra fue secada durante 7 horas a una temperatura de 105°C. Se preparó una solución con 15mL de ácido acético al 80% y 1.5 mL de ácido nítrico concentrado, la muestra de residuo se agregó a esta solución y se sometió al sistema de reflujo durante 20 minutos. Luego el residuo fue filtrado, lavado con etanol, fue secado a 105°C durante 24 horas, finalmente fue incinerado a una temperatura de 504°C durante 3 horas. Se realizaron dos repeticiones para cada residuo.

Para conocer la cantidad de celulosa presente en la muestra se desarrolla la siguiente ecuación:

Ecuación 2

$$\%Celulosa = \frac{Material\ A - Material\ B}{Peso\ de\ la\ Muestra} * 100$$

Las variables “material A” y “material B” representan el peso de la muestra después de ser secada e incinerada respectivamente.

3.1.3 Determinación de la Densidad. La densidad fue determinada de acuerdo al principio de Arquímedes, se pesaron 3g de cada uno de los residuos, se tomó un volumen conocido de agua en una probeta, luego se agregó la cantidad de residuo a esta y se midió el volumen de agua desplazada.

Ecuación 3

$$\rho = \frac{Masa\ Residuo}{Volumen\ Desplazado - Volumen\ Inicial\ de\ Agua}$$

3.1.4 Humedad.

Imagen 3. Determinación del porcentaje de humedad en los residuos.



La determinación de humedad presente en los residuos se realizó, de acuerdo, con la norma AOAC, 16.032, 1984. Se tomaron como muestra 2g de cada residuo, se redujo su tamaño de partícula a 1mm, se colocaron en el horno de secado a una temperatura de 105°C durante 7h⁴⁴.

Para calcular el porcentaje de humedad la ecuación es:

Ecuación 4

$$\%Humedad = \frac{(m_0 - m_1)}{(m_0)} * 100$$

Donde m0 es la masa de la muestra húmeda y m1 es la masa de la muestra seca. El proceso se realizó por duplicado.

3.2 DETERMINACIÓN DE LAS DIFERENTES COMBINACIONES DE LOS RESIDUOS DE FRUTA

Para establecer qué mezclas de residuos son pertinentes en el desarrollo del proyecto, se evaluarán los resultados obtenidos en el laboratorio de la determinación de celulosa, de acuerdo a los porcentajes obtenidos de esta en cada residuo se determinan cuáles pueden combinarse, de tal manera que si algún material tiene porcentajes muy bajos de celulosa no se llevará al proceso de hidrólisis individual, sino que se evaluará la posibilidad de combinarlo con los residuos que tienen altas concentraciones de esta o simplemente descartarlo. De igual manera se realizarán mezclas entre los desechos que presenten

⁴⁴ Ibid 26., p. 47.

concentraciones de celulosa cercanas, las combinaciones estarán formadas por dos residuos de fruta y aparte se realizará un proceso de hidrólisis y fermentación individual.

3.3 PRETRATAMIENTO DE LOS RESIDUOS ORGÁNICOS

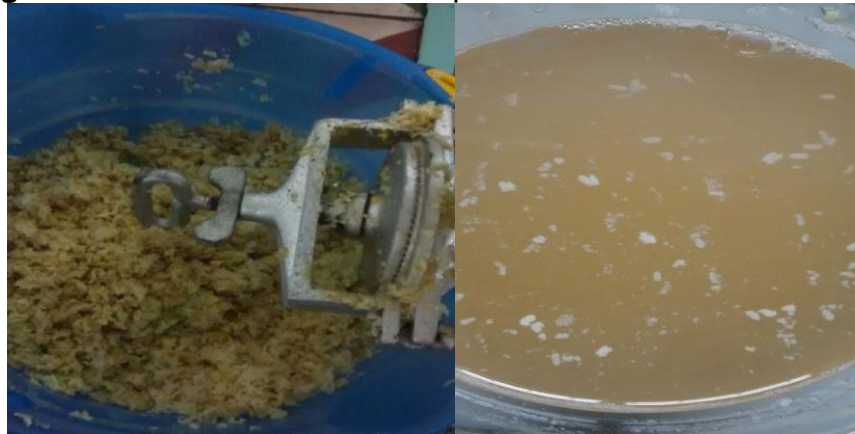
Antes de iniciar el proceso de hidrólisis enzimática en los residuos, es necesario realizar pretratamientos físicos y químicos, que faciliten romper la lignina que actúa como soporte estructural de la celulosa e impide su hidrólisis.

Para los pretratamientos se pesaron 2kg de cada residuo en el caso de ser hidrólisis individual y en las mezclas se pesó 1kg de cada uno de los residuos a combinar.

3.3.1 Pretratamientos Físicos.

- **Molienda:** Los residuos de fruta fueron sometidos a un proceso de molienda mediante un molino de disco, con el fin de disminuir el tamaño de la materia prima y así tener una mayor área de contacto entre el sustrato y los reactivos químicos que se van a utilizar y disminuir la cristalinidad de la celulosa presente para finalmente facilitar la hidrólisis que sigue al proceso.
- **Lavado:** Los residuos se sumergieron en agua a punto de ebullición durante 2 horas, para facilitar el desprendimiento de la lignina presente en estos. Para el mantenimiento de la temperatura del agua se utilizó una resistencia eléctrica como fuente de calor.

Imagen 4. Pretratamientos físicos aplicados a los residuos.



3.3.2 Pretratamiento Químico. Para esta etapa, los residuos fueron sumergidos en una solución de NaOH 0,5N durante dos horas, con una agitación constante, usando como fuente de potencia un motoreductor de 0,25 HP. En los residuos ocurre un efecto de esponjamiento, lo que produce una separación entre la lignina y los carbohidratos presentes. Posteriormente se filtró y realizaron 4 lavados con agua potable para garantizar que no quedaran residuos del hidróxido que pudieran afectar la hidrólisis.

Después de los pretratamientos se determinó el pH de las muestras y se agregó buffer de la marca HI 7004 Buffer Solution pH 4,01 necesario para alcanzar un pH de 4.0-6.0 para que la enzima pueda ser activada.

Imagen 5. Pretratamiento químico, sistema de agitación.



3.4 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Para determinar la actividad enzimática de la Multifect B, se realizó una hidrólisis sobre papel filtro, con el fin de comprobar que la enzima estuviera activa.

El papel filtro utilizado fue Scheleicher & Schuell de referencia No. 10311612 y diámetro 150 mm, de este se pesaron 0,05 g en pedazos pequeños cortados manualmente, se colocaron en un tubo de ensayo, se adicionó 2mL de solución Buffer Citrato (4,8 pH) y 1mL de Multifect B. Se llevó a la condición de temperatura óptima (50°C) durante 1 hora en un baño maría, luego la hidrólisis fue detenida agregando 1mL de NaOH de 1N y 1mL de agua destilada. La lectura de los azúcares presentes se realizó con el método del DNS⁴⁵. Entonces, la actividad enzimática se determina de la siguiente manera:

⁴⁵ MALAGÓN MICAN, Martha Lucia. Hidrólisis enzimática de la celulosa de residuos vegetales, por medio de celulasas para producir bioetanol.

Ecuación 5

$$A \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL} * \text{h}} \right) = \frac{\text{Cantidad de glucosa}}{\text{Volumen de enzima} * \text{Tiempo de hidrólisis}}$$

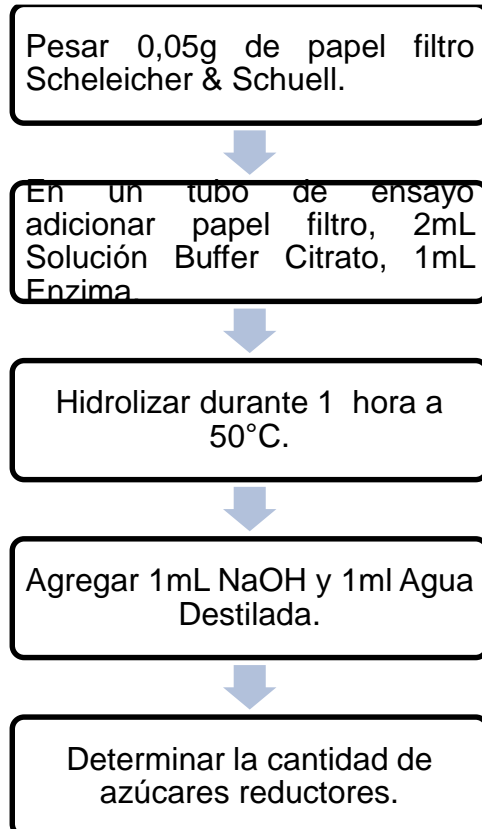
Donde la cantidad de glucosa (para esta investigación) está dada en μmol , el volumen de la enzima en mL y el tiempo de hidrólisis en horas. Las variables previamente determinadas por el método son: 1 hora de tiempo y 1 mL de enzima. La cantidad de glucosa es la variable que se debe determinar y se halla así:

Ecuación 6

$$\text{Cantidad de glucosa } (\mu\text{mol}) = C * V * \frac{1 \text{ mol}}{180,1559 \text{ g}} * \frac{10^6 \mu\text{mol}}{1 \text{ mol}}$$

Siendo C la concentración de glucosa hallada por el método del DNS en g/L, V el volumen total de la mezcla a la cual se le efectuó la determinación de azúcares reductores, es decir 4 mL y 180,1559 el peso molecular de la glucosa.

Esquema 4. Proceso determinación de la actividad enzimática.



3.5 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

La hidrólisis enzimática se realizó con el complejo multifect B de Genencor, la cantidad de celulasa que se agrega puede ser 0,05-0,10% peso-peso de la cantidad de celulosa presente en los residuos. En este caso, se utilizó una cantidad igual para todos los residuos de 3,86mL, a cada muestra se agregaron volúmenes de 2 litros de agua y se verificó que quedara totalmente sumergida la muestra, en caso de que no, se agregaron otros 2 litros y se volvía a verificar, se mantuvo la temperatura en un rango de 48°C a 52°C, sumergiendo los tanques en un sistema de baño maría alimentado mediante resistencia eléctrica, pH 5-6, para garantizar que la actividad de la enzima estuviera en el rango de sus condiciones adecuadas de operación, el proceso se mantuvo en un lapso de 3 horas⁴⁶ y al finalizar se filtraron las muestras obteniendo un volumen final hidrolizado.

3.6 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

Se realizó mediante el método del DNS tomó 0,25mL de cada una de las muestras hidrolizada y filtrada (de estas se desconoce la concentración de azúcar), se agregó 0,25mL de reactivo DNS, luego se calentó hasta la reducción en un baño maría, se sumergió en agua fría, se agregaron 2,5 mL de agua destilada y se llevó al espectrofotómetro donde se leyó la absorbancia. La concentración de glucosa presente en la muestra se determinó reemplazando los valores en la ecuación de la recta obtenida en la curva de calibración del DNS, la lectura de absorbancia se realizó a 540nm de longitud de onda, el blanco se preparó con 0,25mL de agua destilada y 0,25mL de reactivo DNS, para cada residuo y mezcla de residuo el método tuvo dos repeticiones⁴⁷.

La ecuación de calibración para el DNS usado fue la siguiente:

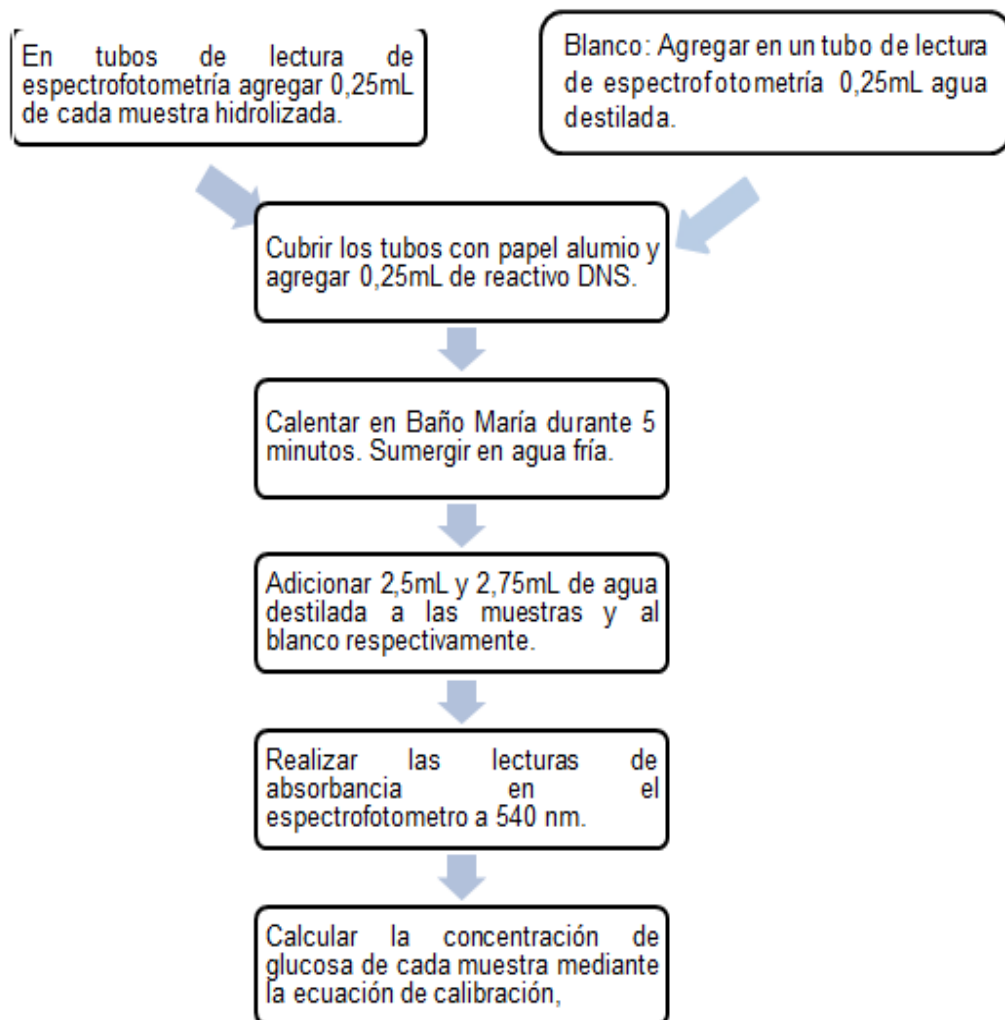
Ecuación 7

$$y = 0,5356x + 0,00825 \quad r^2 = 0,9949$$

⁴⁶ FORERO GOMEZ, Fabian Enrique; LOPEZ VELANDIA, Roberto Ribelino y MALAGÓN M. Martha Lucía. Obtención Del Etanol a Partir de Brócoli y Cáscara de Arveja Empleando la Enzima Multifect 720 de Carácter Básico a Nivel Laboratorio. Bogotá, D.C.: Fundación universidad de América, 2008.

⁴⁷ CHAPARRO, Deisy; ROSAS, Diana; Aislamiento de la actividad enzimática de hongos descomponedores de madera en la reserva natural la montaña del ocaso, Quimbaya- Quindío; Universidad Javeriana, 2005. p. 26-27.

Esquema 5. Proceso determinación de azúcares reductores. Método DNS.



3.6.1 Evaluación del grado de conversión y Rendimiento.⁴⁸Para conocer el grado de conversión y el grado de rendimiento que la enzima presentó al realizar la prueba de actividad enzimática es necesario aplicar las siguientes ecuaciones:

Ecuación 8

$$\text{Grado de Conversión (\%)} = \frac{\text{Cantidad de Azúcares Reducidos (g)}}{\text{Peso de sustrato (g)}} * 100$$

⁴⁸ FORERO GÓMEZ, Fabián Enrique; LÓPEZ VELANDIA, Roberto Ribelino y MALAGÓN M., Martha Lucia. Obtención Del Etanol a Partir De Brócoli y Cáscara De Arveja Empleando La Enzima Multifect 720 De Carácter Básico a Nivel De Laboratorio. Bogotá, D. C: Fundación Universidad de América, 2008.

Ecuación 9

$$\text{Cantidad de Azúcares Reducidos (g)} = V_H * C_{DNS}$$

En todos los casos, el peso del sustrato corresponde a 2000 g, V_H es el volumen final hidrolizado y C_{DNS} es la concentración de glucosa hallada con el método del DNS.

El rendimiento de la hidrólisis está definido como la proporción de azúcares que se producen a partir de lo que teóricamente es posible obtener. Idealmente toda la celulosa disponible podría hidrolizarse a glucosa, es decir, la cantidad másica de celulosa disponible es la misma cantidad que puede obtenerse en glucosa. La celulosa disponible para las pruebas individuales es el porcentaje de celulosa hallado previamente, y para las mezclas se determina de la siguiente manera, aplicando un balance de materia:

Ecuación 10

$$C (\%) = \%C_1 * 0,5 + \%C_2 * 0,5$$

Donde $\%C_1$ es el porcentaje de celulosa del primer componente de la mezcla y $\%C_2$ del segundo componente, 0,5 es la fracción másica del respectivo componente.

Ecuación 11

$$\text{Celulosa Disponible (g)} = C(\%) * 2000g$$

Nuevamente, para claridad de la metodología,

$$\text{Celulosa Disponible (g)} = \text{Glucosa teóricamente obtenible (g)}.$$

Ecuación 12

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Cantidad de Azúcares Reducidos (mg)}}{\text{Glucosa teóricamente obtenible (mg)}} * 100$$

NOTA: La cantidad de azúcares reductores es la que se encuentra presente en el total del volumen final hidrolizado.

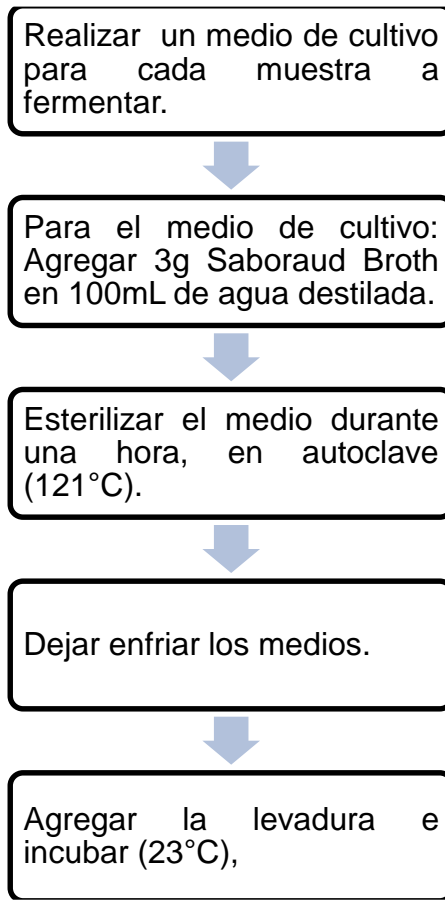
3.7 FERMENTACIÓN

Para esta etapa del proyecto se implementó una levadura etanólica industrial, provista en los laboratorios de microbiología de la Pontificia Universidad Javeriana.

3.7.1 Activación de la Levadura (*Inóculo*). Con el propósito de hacer fermentaciones de un volumen total de 9 L (1L de cada volumen final hidrolizado), se inoculará cada muestra en una concentración de 10% (V/V) de inóculo, es decir, 900 mL de muestra y 100 mL de precultivo por cada fermentación.

Para la preparación del inóculo se utilizó el medio de cultivo Sabouraud Broth de Scharlab S.L., el cual requiere, según su certificado de análisis, una concentración de 30 g/L para el crecimiento del microorganismo, esto es, 3 g a cada inóculo de 100 mL, una vez preparados los precultivos a las concentraciones indicadas, se esterilizan en una autoclave a 121 °C y 15 psia, durante 1 hora, disminuida la temperatura se agrega la levadura y se incuba a una temperatura de 23°C. El procedimiento se resume en el esquema 6.

Esquema 6. Preparación del medio de cultivo y Activación del inóculo.



3.7.2 Determinación de la concentración del inóculo. Para determinar la concentración del inóculo se realizaron recuentos en cámara Neubauer hasta alcanzar una concentración entre 1×10^7 y 1×10^8 , realizando diluciones de la forma descrita en la siguiente figura.

Figura 8. Diluciones

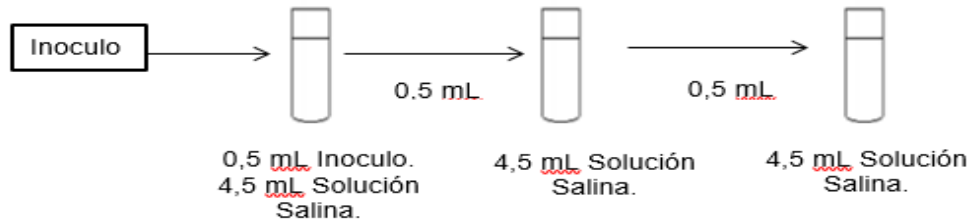
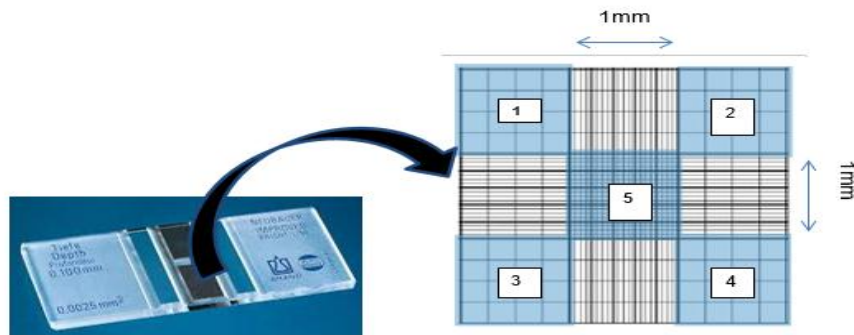


Figura 9. Cámara Neubauer



Para el recuento en cámara Neubauer, se tuvo en cuenta el cuadrante número 5, el cual tiene un área de 1 mm^2 y $0,1 \text{ mm}$ de profundidad, es decir, un volumen de $0,1 \text{ mm}^3$, el número de células contadas se multiplica por un factor que corresponde al volumen de conteo en mL, también se multiplica por $1 \times 10^{\text{No Diluciones}}$.

Ecuación 13

$$\text{Concentración} \left(\frac{\text{cel}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{No Células}}{0,1 \text{ mm}^3} * \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ mL}} * 1 \times 10^{\text{No Diluciones}}$$

3.7.3 Determinación del tiempo de fermentación. El producto obtenido de la hidrólisis es llevado a esterilizar, luego se le agrega el inóculo, se llevó a incubación ($20\text{-}25^\circ\text{C}$) y se tomaron muestras de estas cada 12h para determinar la concentración de levadura, utilizando el método directo de conteo con Cámara de Neubauer, y por último establecer el tiempo al cual se detiene la fermentación mediante la construcción de la cinética de crecimiento de la levadura etanólica.

3.8 DESTILACIÓN

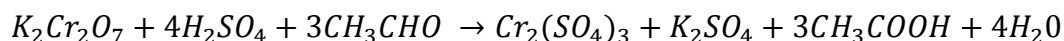
La destilación del producto fermentado se hizo a nivel laboratorio, se tomaron 250mL de cada uno y se llevaron al montaje de destilación simple durante dos horas en un rango de temperatura entre 70°C y 80°C. Al final, el volumen destilado se acumula en el balón aforado de 100 mL.

Imagen 6. Montaje de la Destilación simple a nivel laboratorio.



3.9 DETERMINACIÓN DE ETANOL POR EL MÉTODO DEL DICROMATO DE POTASIO

El método del dicromato de potasio es una experimentación en la que se reconoce la cantidad de etanol presente en una muestra, debido a la reacción de óxido reducción que ocurre entre el dicromato de potasio y el etanol en un medio fuertemente ácido. La reacción final ocurre de la siguiente manera:



La técnica del dicromato de potasio es un método de colorimetría, se realizó tomando 2mL de la muestra anteriormente destilada y 2mL de la solución oxidante de Dicromato descrita en el ANEXO E. La mezcla se homogenizó 1500 rpm y se calentó durante 30 minutos a 80°C, luego se dejó enfriar a temperatura ambiente,

se leyó la absorbancia de esta mezcla a 440nm y se interpola con la recta de la curva de calibración dada en el ANEXO D⁴⁹.

Ecuación 14

$$A_T = V_r * C_A$$

Donde A_T es el alcohol total en gramos que hay en el volumen final hidrolizado, V_r es el Volumen destilado en litros y C_A es la concentración de alcohol hallada con la lectura de absorbancia en la curva de calibración y está dada en gramos por cada litro, debido a que la concentración de las soluciones patrones están dadas en estas unidades (ANEXO D).

Ahora, para determinar la concentración real de la muestra fermentada se asume que todo el alcohol presente quedó en el volumen resultante de destilación y se sabe que este alcohol proviene en realidad de los 250 mL iniciales, por lo tanto:

Ecuación 15

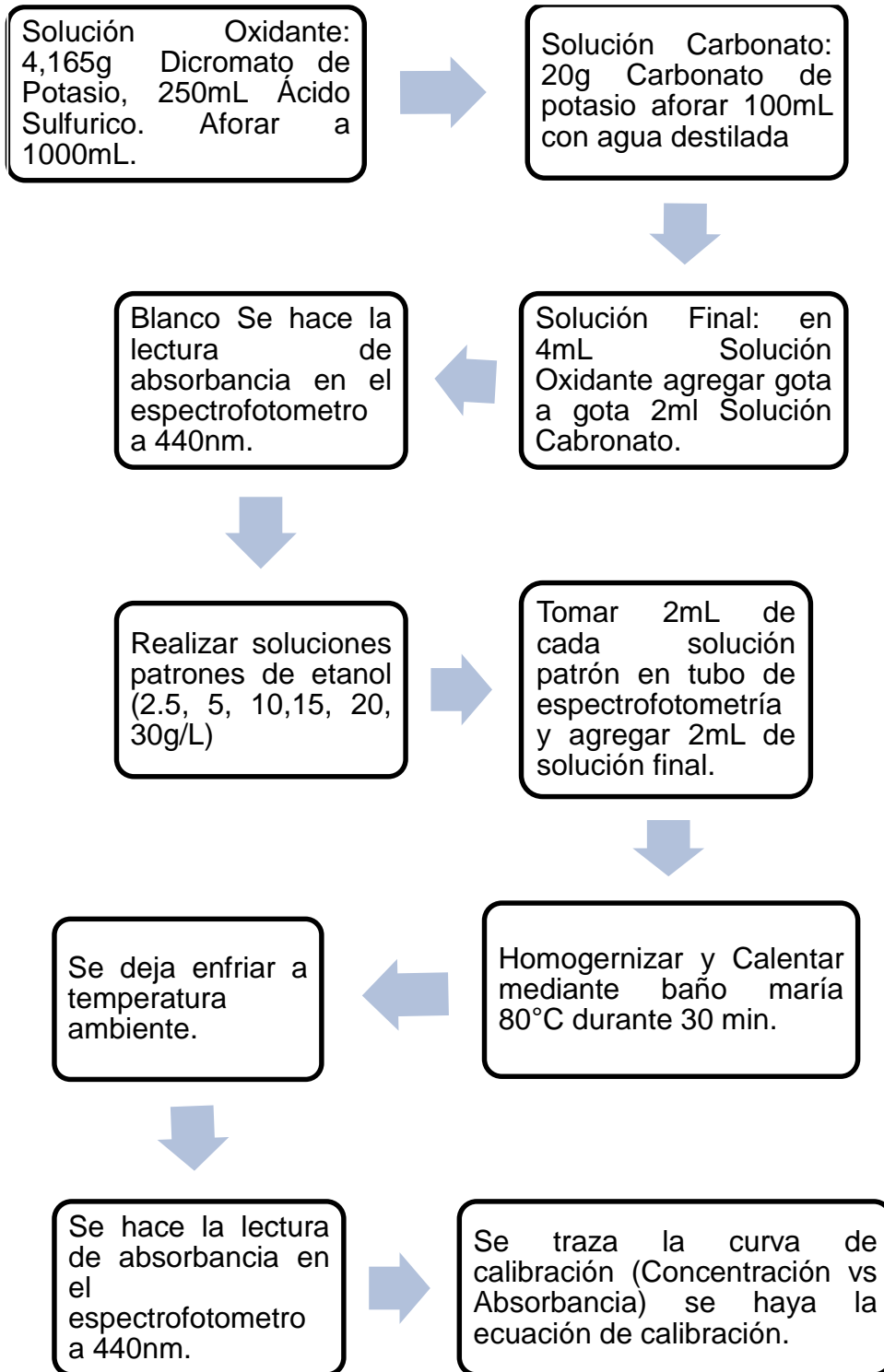
$$C_R = A_T / 0,25L$$

Donde C_R es la concentración real de la muestra en gramos por cada litro que se fermentó después de la hidrólisis, A_T es el alcohol total en gramos, de cada muestra destilada y 0,25 L es la cantidad de fermentado que se colocó a destilar.

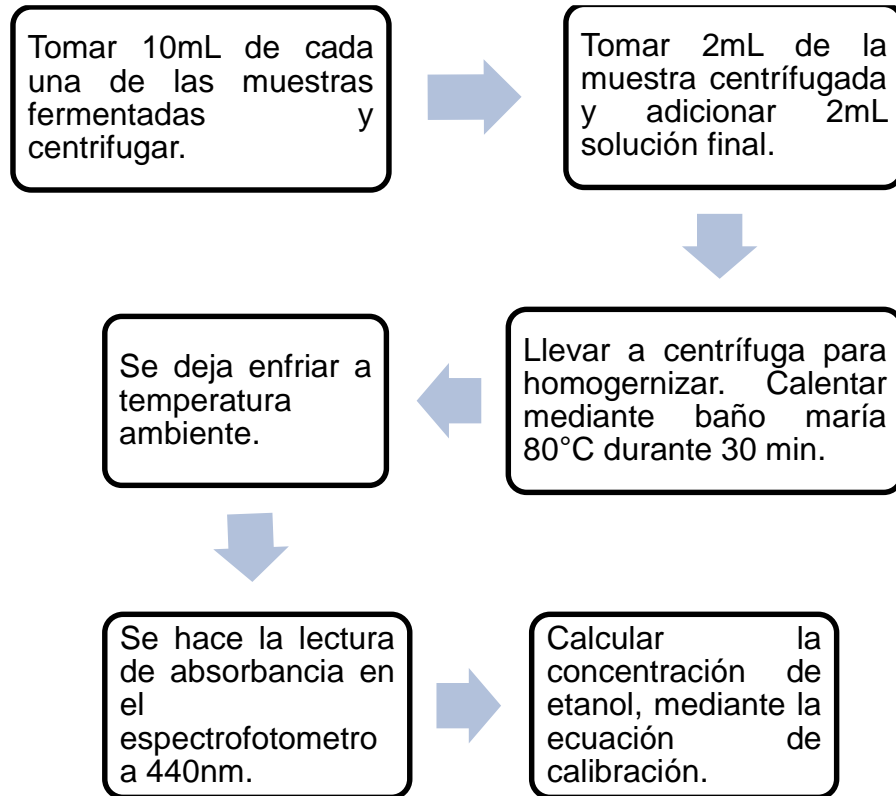
En los esquemas 7 y 8 se describe el proceso para realizar la curva de calibración y determinar la concentración de etanol en las muestras fermentadas, respectivamente.

⁴⁹ VANEGAS, Melissa; ZAPATA, Mónica; Aislamiento de Levaduras capaces de producir etanol a partir de macrofitas acuáticas extraídas mecánicamente de la laguna de Fúquene; Universidad Javeriana; Bogotá. P. 11, 41-42.

Esquema 7. Curva de Calibración Método del Dicromato de Potasio.



Esquema 8. Método Dicromato de Potasio.



3.10 DETERMINACIÓN DE ETANOL POR REFRACTOMETRÍA

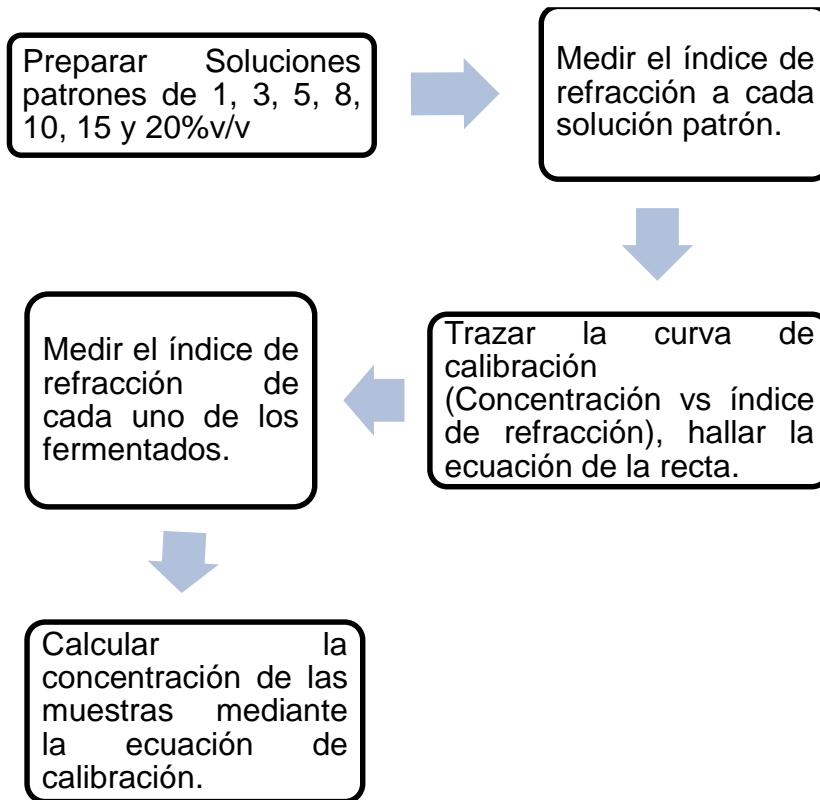
El método de refractometría es muy utilizado para medir la concentración del etanol presente en muestras problemáticas, debido a que es una prueba de laboratorio rápida y sencilla.

Para realizar este método, se prepararon cuatro soluciones patrones de concentración: 1, 3, 5, 8, 10, 15, y 20 %v/v de etanol. Luego se midió el índice de refracción para cada una de estas muestras con un refractómetro HANNA INSTRUMENTS 96800, se trazó una curva de calibración (Concentración de etanol vs Índice de refracción), consiguiendo la ecuación de calibración.

Posteriormente se tomaron muestras de cada uno de los destilados y se les midió el índice de refracción, a partir de la ecuación de calibración se calculó la concentración de etanol presente en los destilados⁵⁰.

⁵⁰ ORTEGANO, Diana; Determinación de la sacarosa en una bebida gaseosa comercial y de etanol en una bebida alcohólica (aguardiente), mediante la aplicación de la refractometría; UNEXPO, 2015.

Esquema 9. Determinación de etanol por refractometría.



3.11 DETERMINACIÓN DE ETANOL POR EL MÉTODO DE DENSIDAD

Este método requiere de un picnómetro y una balanza, utiliza como principio, que la mezcla tratada es una solución ideal y por lo tanto la masa total de la solución es la suma de las masas de cada uno de sus componentes en sus respectivas proporciones:

Ecuación 16

$$m_T = \rho_{H_2O}V_{H_2O} + \rho_{etanol}V_{etanol}$$

Donde m_T es la masa total del fluido almacenado en el picnómetro, ρ es la densidad del respectivo fluido y V el volumen de cada fluido. A partir de la ecuación 12 se obtiene la siguiente ecuación:

Ecuación 17

$$V_{etanol} = \frac{m_T - 10mL * \rho_{H_2O}}{\rho_{etanol} - \rho_{H_2O}}$$

La densidad del agua se halla con el líquido puro y del mismo modo se realiza con el alcohol.

3.12 RENDIMIENTO DE BIOETANOL

Como definición general, el rendimiento de Bioetanol se define como la cantidad de etanol (ya sea en volumen o masa) que se produce por cantidad de materia prima:

Ecuación 18

$$R_B = \frac{V_H * C_R}{2000 g}$$

Donde R_B es la cantidad de gramos de bioetanol que se producen por cada g de residuo de fruta, V_H es el volumen final hidrolizado de cada muestra, C_R es la concentración de etanol que se puede obtener para todo el volumen hidrolizado.

3.13 RENDIMIENTO DE LA FERMENTACIÓN

En el proceso de fermentación se consideran dos rendimientos importantes: $Y_{X/S}$ que expresa la cantidad de biomasa producida a partir del sustrato consumido, este rendimiento se ve afectado por variables como la composición del medio, la naturaleza de las fuentes de carbono y nitrógeno, el pH, la temperatura y la concentración de oxígeno; el rendimiento del producto a partir del sustrato $Y_{P/S}$, es económicamente el más importante.⁵¹

Ecuación 19

$$Y_{P/S} = \frac{\text{Producto Formado (etanol)}}{\text{Consumo de sustrato}}$$

En este trabajo sólo se evaluará el rendimiento de producto a partir de la cantidad de sustrato.

⁵¹ Buitrago Estrada, Johanna Carol y Tenjo Camacho, Dolly Giselle. Obtención de un sustrato fermentable de origen vegetal y su evaluación con células libres de *Saccharomyces Cerevisiae*. Pontificia Universidad Javeriana.

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS

4.1 CARACTERIZACIÓN DE RESIDUOS ORGÁNICOS SÓLIDOS

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en la caracterización de los residuos de fruta.

4.1.1 Acidez titulable por volumetría. En la tabla 24 se muestra la acidez de cada uno de los residuos previamente seleccionados, expresada en gramos de ácido cítrico (para el limón, mango, maracuyá y mora) por cada 100 gramos de muestra, y en gramos de ácido málico para la mora y el lulo; los valores son bajos en comparación con los del propio fruto, esto, debido a que la mayor cantidad de fluidos de las frutas han sido removidos en los procesos primarios de la empresa y el residuo sólido no tiene la misma capacidad de retener el ácido que sí contiene el zumo de cada fruto.

Tabla 24. Acidez determinada por volumetría.

Fruta	Acidez (g Ac./100g muestra)
Limón	0,274
Lulo	0,233
Mango	0,213
Maracuyá	0,288
Mora	0,194
Piña	0,155

Por ejemplo, para el caso de la piña, la cantidad de muestra promedio que se analizó fue 1,033 g y el volumen de solución titulante 0,00025 L, entonces:

$$\begin{aligned} \%Acidez &= \frac{0,00025 * 0,1 * 39,997 * 1,601}{1,033} * 100 \\ &= 0,155 \% \left(g \text{ Ac.} \frac{\text{Cítrico}}{100g} \text{ Muestra} \right) \end{aligned}$$

4.1.2 Determinación de Celulosa. A continuación, se evidencia en la tabla 25 el porcentaje de celulosa en gramos de celulosa por cada 100 gramos de desecho húmedo del respectivo fruto, siendo la Piña la de menor disponibilidad del polisacárido y el mango el de mayor contenido, esta variable es con seguridad la más importante de todas las encontradas, ya que teóricamente indica la cantidad máxima de glucosa disponible para la fermentación.

Tabla 25. Porcentaje de celulosa calculada para los diferentes residuos.

Residuo	%Celulosa
Limón	7,90
Lulo	8,48
Mango	17,85
Maracuyá	7,75
Mora	16,43
Piña	2,68

Por ejemplo, para la determinación de celulosa del mango, el peso real de la muestra en la primera repetición fue de 0,3271 g, el peso después del secado fue 0,0631g y posterior a la incineración 0,0021:

$$\%Celulosa = \frac{0,0631 - 0,0021}{0,3271} * 100 = 18,65\%$$

Para la segunda repetición, peso de la muestra: 0,2522g, peso después del secado 0,0442g y peso después de la incineración: 0,0012, por la tanto el porcentaje de celulosa fue 17,05%. Y el porcentaje promedio 17,85%.

4.1.3 Determinación de la Densidad. En la medición de esta variable (tabla 26) se observa una particularidad, y es que los dos desechos más pesados corresponden a los frutos con menor y mayor porcentaje de celulosa, para el mango, el alto contenido fibroso es la explicación a su alta densidad, sin embargo, para la piña es necesario observar el valor de humedad, el cual excede el 80% y explica que su densidad esté por encima de la del agua.

Tabla 26. Densidad calculada de los residuos.

Residuo	Densidad (g/mL)
Limón	0,505
Lulo	0,534
Mango	1,045
Maracuyá	0,619
Mora	0,858
Piña	1,112

Aplicando la ecuación 3 y teniendo como muestra de cálculo el caso del limón, para el cual, el peso real muestreado fue 1,514g, el volumen inicial de agua 92 mL y el volumen final con la muestra 95 mL, se tiene:

$$\rho = \frac{1,514g}{95 mL - 92 mL} = 0,505 g/mL$$

4.1.4 Humedad. En la tabla 27 se registran los porcentajes máxicos del contenido de humedad en g/g, mostrando todos los resultados por encima del 69%. El bagazo de piña presenta el mayor contenido de humedad con el 81,427%. En términos generales, la humedad podría considerarse como desventaja para el proceso, ya que la materia prima está compuesta principalmente de un componente que no presenta utilidad, esto teniendo en cuenta que el agua es de interés para el proceso de fermentación, sin embargo, antes de esta etapa la materia prima debe tener procesos de molienda y filtrado (retirar el agua) para facilitar el desprendimiento de lignina y la posterior hidrólisis; además de aumentar el costo de manejo y transporte en el caso de un tratamiento a escala industrial.

Tabla 27. Resultado de humedad en los residuos.

Residuo	% Humedad Promedio
Limón	69,62
Lulo	79,70
Mango	77,58
Maracuyá	79,46
Mora	70,48
Piña	81,43

Para el caso del lulo, el peso de la primera y segunda muestra fueron 2,0878g y 2,0093g respectivamente, después del secado los pesos fueron 0,4511g y 0,3816g, por lo tanto, aplicando la ecuación 4:

$$\%Humedad = \frac{(2,0878g - 0,4511)}{(2,0878g)} * 100 = 78,39\%$$

En la segunda repetición, el resultado es 81,01%, teniendo como resultado una humedad promedio de 79,70 %.

4.2 DETERMINACIÓN DE LAS DIFERENTES COMBINACIONES DE LOS RESIDUOS DE FRUTA

A partir de los porcentajes promedios de celulosa obtenidos en la caracterización de los residuos, se determinaron y establecieron las mezclas pertinentes para el desarrollo de la hidrólisis enzimática, la cual se desarrolló en bancos de 2 kg, para cada una de las muestras y/o mezclas. La tabla 28 muestra en orden, el porcentaje en peso de celulosa de cada uno de los residuos.

Tabla 28. Porcentaje de celulosa de cada uno de los residuos.

Residuo	%Celulosa Promedio
Piña	2,68
Maracuyá	7,75
Limón	7,90
Lulo	8,48
Mora	16,43
Mango	17,85

De acuerdo con estos resultados, se plantean en la tabla 29 las mezclas y muestras, más pertinentes. Esta tabla, se realiza teniendo en cuenta los porcentajes similares de celulosa de cada uno de los residuos y separándolos en tres grupos, de bajo, medio y alto porcentaje de celulosa, perteneciendo al primero la piña, al segundo el maracuyá, limón y lulo, y al tercero la mora y el mango. De este modo, se mezclan entre sí y en proporciones iguales, cada una de los residuos en sus respectivos grupos. Por su bajo contenido de celulosa, se descarta la hidrólisis de la piña.

Tabla 29. Cantidad de residuos establecidos para la hidrólisis enzimática de las mezclas.

Tabla 29. Muestra	Maracuyá (kg)	Limón (kg)	Lulo (kg)	Mora (kg)	Mango (kg)	Total de muestra (kg)
1	1	1	0	0	0	2
2	1	0	1	0	0	2
3	0	1	1	0	0	2
4	0	0	0	1	1	2
5	2	0	0	0	0	2
6	0	2	0	0	0	2
7	0	0	2	0	0	2
8	0	0	0	2	0	2
9	0	0	0	0	2	2
Total	4	4	4	3	3	18

Se aclara que el uso de mezclas binarias y en iguales proporciones, se hace debido a la complejidad de desarrollar una experimentación con más de dos componentes o proporciones diferentes al 50%. Los resultados de este trabajo, proporcionarán un indicio para investigaciones posteriores que tengan como objetivo desarrollar hidrólisis a más de dos componentes simultáneamente y/o en complejos binarios con fracciones distintas a 50%.

4.3 PRETRATAMIENTO DE LOS RESIDUOS ORGÁNICOS

Durante el proceso de molienda, todas las muestras perdieron agua por el proceso de compresión y reducción de tamaño, lo cual se podía comprobar únicamente con tocar la muestra y verificar que estaba más seca, con excepción del lulo, que adquirió una textura pastosa y la pérdida de humedad no fue evidente. En el lavado con agua a punto de ebullición, en cada una de las pruebas se podía distinguir claramente el olor de cada una de ellas cuando el agua ebullicía, lo que los residuos poco a poco iban perdiendo sus componentes, en este caso, aromáticos, al final de los lavados se observa cualitativamente que las muestras han reducido su tamaño por la pérdida de sólidos solubles y por los filtrados.

El pretratamiento con NaOH se realiza y en todas las pruebas se pierde el olor de cada fruta, también se evidencian ligeras saponificaciones en la superficie del tanque de pretratamiento, exceptuando la muestra de limón, la cual simplemente pierde su aroma. Al final de los cuatro lavados y respectivos filtrados, las muestras comienzan a recuperar ligeramente su aroma.

4.4 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Realizada la hidrólisis al papel filtro, se aplicó el método del DNS para conocer la concentración de azúcares y se obtuvo una absorbancia de 0,9761, lo que significa una concentración de 1,81 g/L de glucosa. Aplicando la ecuación 6, se tiene:

$$\text{Cantidad de glucosa } (\mu\text{mol}) = 1,81 \frac{\text{g}}{\text{L}} * 0,0004 * \frac{1 \text{ mol}}{180,1559\text{g}} * \frac{10^6 \mu\text{mol}}{1 \text{ mol}} = 40,187$$

Por último, se utiliza la ecuación 5 para tener:

$$A \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL} * \text{h}} \right) = \frac{40,187 \mu\text{mol Glucosa}}{1 \text{ mL de Enzima} * 1 \text{ hora}} = \frac{40,187 \mu\text{mol}}{1 \text{ mL} * 1 \text{ h}}$$

Lo que significa que 1 mL de enzima Multifect B es capaz de hidrolizar 40,187 μmol (0,00724 g) de glucosa cada hora y comprueba que la enzima tiene actividad y es apta para procesos de hidrólisis. En comparación con Forero y López⁵², que

⁵² FORERO GÓMEZ, Fabián Enrique; LÓPEZ VELANDIA, Roberto Ribelino y MALAGON M., Martha Lucia. Obtención Del Etanol a Partir De Brócoli y Cáscara De Arveja Empleando La Enzima

implementa la enzima Multifect 720 a 50°C y pH de 8,5 durante 24 horas con una actividad de 0,168 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, y con López y Jiménez⁵³, los cuales utilizan la enzima Multifect A40 a 60°C y pH de 4,5 durante 2 horas con una actividad de 2,0149 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, la actividad enzimática de la Multifect B es notoriamente más alta, teniendo en cuenta que se disminuye el tiempo de hidrólisis respecto a la Multifect 720, y también el PH; respecto a las Multifect A40, con tan solo una hora más de operación, la actividad aumenta de forma considerable. La tabla 30 muestra una comparación entre los autores y la bibliografía.

Tabla 30. Comparación de la actividad enzimática por diferentes autores.

Trabajo	Enzima	Temperatura (°C)	pH	Tiempo (Hora)	Actividad $\mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{h})$
Forero	y Multifect 720	50	8,5	24	0,168
López	y Multifect A40	60	4,5	2	2,0149
Jiménez					
Autores	Multifect B	50	4,8	1	40,187

4.5 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

En esta etapa, la cantidad de agua que se utilizó por hidrólisis, fue de la siguiente manera: **a.** Maracuyá-Limón: 6 L. **b.** Maracuyá-Lulo: 6L. **c.** Limón-lulo: 6L. **d.** Mora-mango: 4L. **e.** Maracuyá: 6L. **f.** Limón: 4L. **g.** Lulo: 4L. **h.** Mora: 4L. **i.** Mango: 6L. Aunque en la ficha técnica de la enzima no hay especificación del volumen de agua que se debía utilizar para la hidrólisis, se consideró que todas las muestras deberían quedar completamente sumergidas para tener mayor movilidad y contacto con la enzima, es por esto que los residuos o mezclas de mayor cantidad quedaron sumergidos en 6 litros de agua, mientras que los de menor cantidad, apenas fue necesario sumergirlos en 4 litros. Al finalizar las nueve hidrólisis enzimáticas, todas las muestras cambiaron evidentemente su viscosidad, lo que hizo que se tornaran espesas y viscosas, también aumentó la intensidad en su olor, predominando el aroma de cada fruta en el caso de las mezclas: en la combinación mango-mora predominaba el aroma del mango; en la muestra maracuyá-lulo el olor era fuerte y muy similar al del lulo; en maracuyá-limón el aroma era muy suave parecido al del limón; la última mezcla, limón-lulo, presentó una particularidad respecto a su aroma, ya que era muy intenso, pero con similitud

Multifect 720 De Carácter Básico a Nivel De Laboratorio. Bogotá, D. C: Fundación Universidad de América, 2008.

⁵³ LÓPEZ CASTILLO, Carolina; JIMÉNEZ CIFUENTES, María Alejandra y MALAGÓN M., Martha Lucia. Obtención De Etanol a Nivel De Laboratorio a Partir De Espinaca y Lechuga Mediante Hidrólisis Enzimática. Bogotá: Fundación Universidad de América, 2007.

al olor de la madera y sin relación a ninguna de las frutas que componían la mezcla.

4.6 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES POR EL MÉTODO DNS

En esta etapa del proceso se evidencia sin necesidad de un análisis cuantitativo, un bajo rendimiento del proceso de hidrólisis enzimática. Como lo muestra la tabla 31, las concentraciones de azúcares reductores son bastante bajas en comparación con otros autores, por ejemplo, Giraldo *et al.*⁵⁴ Evidencia un rendimiento superior de azúcares reductores con las enzimas Pectinex (0,37743 mg de azúcares por cada mg de materia seca) y Celluclast (0,28853 mg de azúcares por cada mg de materia seca) para el residuo del mango, Ávila⁵⁵ realiza un proceso de hidrólisis ácida al residuo del maracuyá y obtiene concentraciones de azúcares entre 3 g/L y 8 g/L. Y aunque los porcentajes de celulosa mostraban un indicio de cuáles eran los mayores prospectos para la producción de azúcares, los resultados se comportaron de manera diferente a lo esperado: el mango, con el mayor contenido de celulosa (17,85%), fue el de menor capacidad para producir azúcares; el limón, de las hidrólisis individuales, tuvo el mejor rendimiento (1,87g de glucosa/L), aunque su porcentaje de celulosa era intermedio (7,9%); respecto a las mezclas, la combinación mora-mango, no fue la mejor a pesar de tener la mejor disponibilidad de polisacárido (17,14%); se destaca la mezcla entre el lulo y el limón, que superó considerablemente a todas las mezclas y desechos individuales (2,08 g de glucosa/L). La principal variable que llega a afectar este proceso de hidrólisis, es el tiempo, debido a que en varios procesos se plantean tiempos de más de 48 horas para hidrólisis enzimática, dependiendo del complejo enzimático y sus condiciones de operación, en la tabla 30 se presentan resultados a distintos tiempos de otros autores. También es importante tener en cuenta, que los mayores grados de conversión se obtuvieron en los residuos con mayor acidez titulable, lo que puede sugerir que las condiciones ácidas inherentes a cada residuo benefician la hidrólisis y contrarrestan cualquier efecto residual que pudiera llegar a tener el tratamiento con NaOH. Se aclara que en la tabla 32, el volumen final hidrolizado, es la cantidad de líquido que se pudo filtrar del proceso de hidrólisis.

⁵⁴ GIRALDO, L. M., et al. Aprovechamiento del residuo agroindustrial del mango común (*Mangifera indica* L.) en la obtención de azúcares fermentables. En: INGENIERÍA y CIENCIA. vol. 3, no. 6, p. 41-62

⁵⁵ AVILA JIMÉNEZ, Luis Miguel. Obtención de bioetanol de segunda generación a partir del pericarpio de maracuyá (*passiflora edulis* f. *flavicarpa*). 2015.

Tabla 31. Comparación entre tiempos de hidrólisis y % conversión de azúcares.

Trabajo	Enzima	Tiempo (Hora)	Conversión (%)
Wen ⁵⁶	βglucosidasa de novozymes	96	40
Vlasenko ⁵⁷	Cellulase 100 L	72	38
Vlasenko ⁵⁸	Novozyme-188	72	54
González ⁵⁹	Celluclast 1.5 L	168	92

Tabla 32. Resultados determinación de Azúcares Reductores por el método DNS.

Muestra	Absorbancia Promedio	Volumen final hidrolizado (L)	Concentración (g glucosa/L)
Maracuyá-Limón	0,763	5,35	1,41
Maracuyá-Lulo	0,814	5,34	1,50
Limón-Lulo	1,124	5,12	2,08
Mora-Mango	0,94	3,63	1,74
Maracuyá	0,97	5,14	1,80
Limón	1,01	3,89	1,87
Lulo	0,778	3,79	1,44
Mora	0,973	3,84	1,80
Mango	0,754	5,64	1,39

4.6.1 Grado de Conversión y Rendimiento de la Multifect B durante el proceso de Hidrolisis. Al determinar el grado de conversión, es evidente que los resultados son muy bajos y desde un principio pocos viables comercialmente, con base en la materia prima en su estado original, ni siquiera el 1% de ninguna muestra, es aprovechado para producir azúcares, como muestra en la tabla 33. Sin embargo, al determinar rendimiento del contenido de celulosa, tabla 34, se evidencia que la relación entre producto y materia prima real aumenta considerablemente, incluso más de 10 veces, ya que esta relación utiliza como base la celulosa únicamente y no incluye agua, ni otros componentes de los desechos. Aplicando la ecuación 8 y 7:

⁵⁶ WEN, Zhiyou; LIAO, Wei y CHEN, Shulin. Hydrolysis of animal manure lignocellulosics for reducing sugar production. En: BIORESOURCE TECHNOLOGY. vol. 91, no. 1, p. 31-39

⁵⁷ VLASENKO, E. Yu, et al. Enzymatic hydrolysis of pretreated rice straw. En: BIORESOURCE TECHNOLOGY. vol. 59, no. 2, p. 109-119

⁵⁸ Ibid., p. 109-119

⁵⁹ GONZÁLEZ, RENTERÍA, SM, et al. Optimización del proceso de hidrólisis enzimática de una mezcla de pajas de frijol cuatro variedades (Pinto villa, Pinto saltillo, Pinto mestizo y Flor de mayo). En: REVISTA MEXICANA DE INGENIERÍA QUÍMICA. vol. 10, no. 1, p. 17-28

$$\text{Azúcares Reducidos Limón (g)} = 3,89 \text{ L} * 1,87 \frac{\text{g}}{\text{L}} = 7,27 \text{ g}$$

$$\text{Azúcares Reducidos Limón (g)} = 7,27 \text{ g}$$

$$\text{Grado de Conversión (\%)} = \frac{7,27 \text{ g}}{2000 \text{ g}} * 100$$

$$\text{Grado de Conversión (\%)} = 0,364\%$$

Tabla 33. Resultados Conversión de la Multifect B durante la hidrólisis.

Muestra	Volumen final hidrolizado (L)	Azúcares Obtenidos (g)	Grado de Conversión (%)
Maracuyá-Limón	5,35	7,54	0,377
Maracuyá-Lulo	5,34	8,03	0,402
Limón-Lulo	5,12	10,67	0,533
Mora-Mango	3,63	6,31	0,316
Maracuyá	5,14	9,23	0,461
Limón	3,89	7,27	0,364
Lulo	3,79	5,45	0,272
Mora	3,84	6,92	0,346
Mango	5,64	7,85	0,393

Aplicando las ecuaciones (9), (10) y (11), se determina el rendimiento con base en la cantidad de celulosa para el maracuyá-limón:

$$C(\%) = 7,75\% * 0,5 + 7,9\% * 0,5 = 7,83 \%$$

$$\text{Celulosa Disponible (g)} = 7,83\% * 2000 \text{ g} = 156,5 \text{ g Celulosa}$$

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{7,54 \text{ g}}{156,5 \text{ g}} * 100 = 4,82\%$$

Tabla 34. Rendimiento con base en la cantidad de celulosa.

Muestra	C (%)	Celulosa Disponible (g)	Rendimiento (%)
Maracuyá-Limón	7,83	156,5	4,82
Maracuyá-Lulo	8,12	162,3	4,95
Limón-Lulo	8,19	163,8	6,51
Mora-Mango	17,14	342,8	1,84
Maracuyá	7,75	155	5,95
Limón	7,90	158,1	4,60
Lulo	8,48	169,5	3,21
Mora	16,43	328,5	2,11
Mango	17,85	357	2,20

4.7 FERMENTACIÓN

A continuación, se presentan las cinéticas de crecimiento para cada una de las 9 fermentaciones y los tiempos a los cuales se detiene el crecimiento microbiano, que varió entre 72 horas y 108 horas.

4.7.1 Recuento del crecimiento del microorganismo y tiempo de Fermentación. En el anexo F se muestran la cantidad de células contadas en cámara de Neubauer para cada fermentación desde el tiempo cero de crecimiento hasta el momento en que este se detiene, en intervalos de 12 horas.

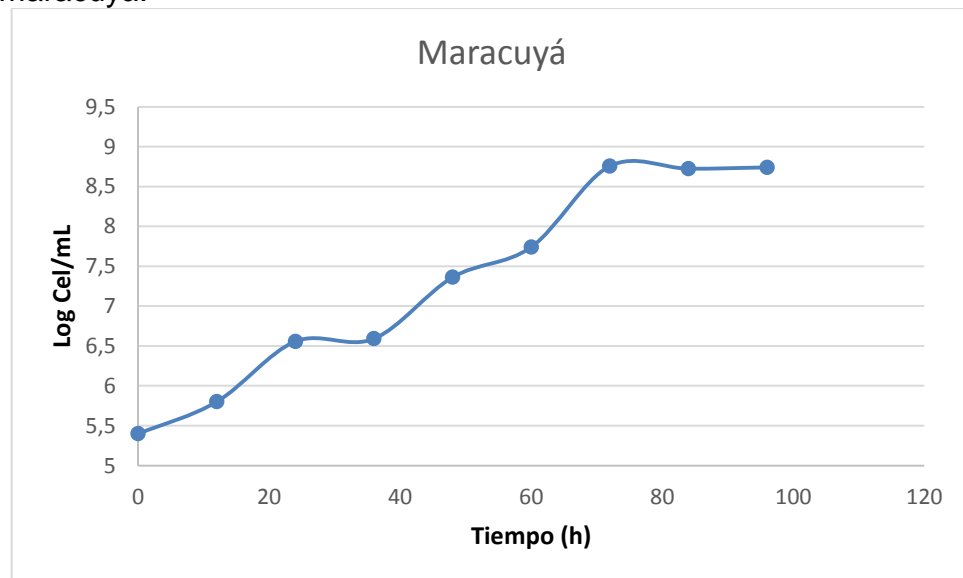
En comparación con otros autores, Adarme y Rincones⁶⁰, que presentan un crecimiento logarítmico en las primeras 8 horas de fermentación, los tiempos de crecimiento que se dan en este trabajo son relativamente altos, considerando que las concentraciones de sustrato son menores. Sánchez⁶¹ muestra una cinética de crecimiento la cual tiene una fase exponencial entre 5 y 10 días, sin embargo, las concentraciones de azúcares reductores son del orden de los 70 g/L, por lo cual es evidente que el crecimiento dure mucho más.

⁶⁰ ADARME V., TANIA C. y RINCONES. L., MONICA P. Evaluación De Cuatro Antimicrobianos Para El Control De Levaduras Contaminantes De Un Proceso De Fermentación De Ácido Cítrico. Bogotá.: Pontificia Universidad Javeriana, 2008. p. 50.

⁶¹ SANCHEZ, M., Anabel. Fermentación De Malta Empleando Un Sistema Semicontinuo En El Proceso De Elaboración De Cerveza. Huajuapán De León, Oaxaca.: Universidad Tecnológica de Mixteca, 2011. p. 72.

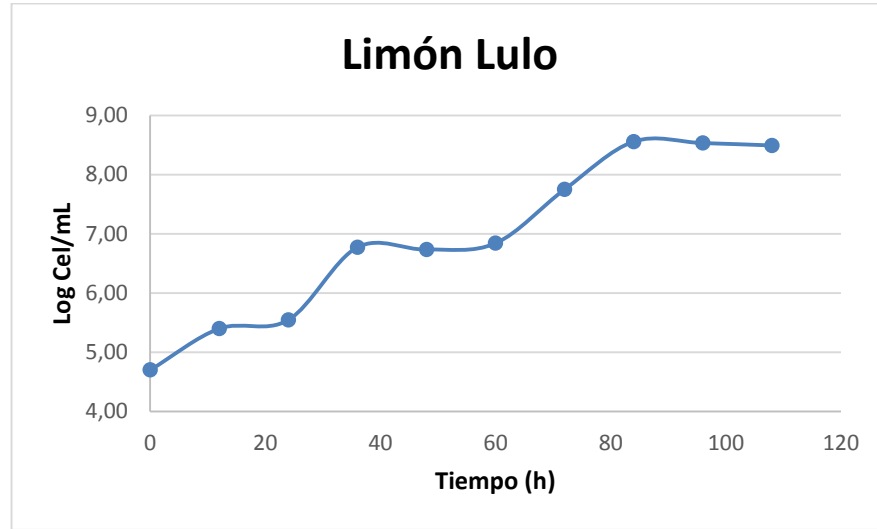
En el gráfico 1, se muestra la curva de crecimiento del microorganismo en la fermentación de la cáscara de maracuyá, en este sustrato el aumento de la población microbiana se hizo notorio a partir de la hora 24, desde la cual para realizar el recuento de las células se llevaron a cabo la dilución correspondiente. El maracuyá es el segundo sustrato del cual se obtuvo una mayor cantidad de azúcares reductores mediante el método del DNS (9,23 g) y se ve reflejado en la fase de crecimiento que inicia en la hora 24 y finaliza en la hora 72, la cual se considera como una fase extensa comparada con otros sustratos estudiados en este mismo proyecto. A partir del conteo realizado en la hora 72 las diluciones no aumentaban lo cual indicó que el crecimiento se detuvo, con ella el inicio de la fase estacionaria y la finalización del tiempo de fermentación en la hora 96.

Gráfico 1. Curva de Crecimiento de la levadura en el fermentado de maracuyá.



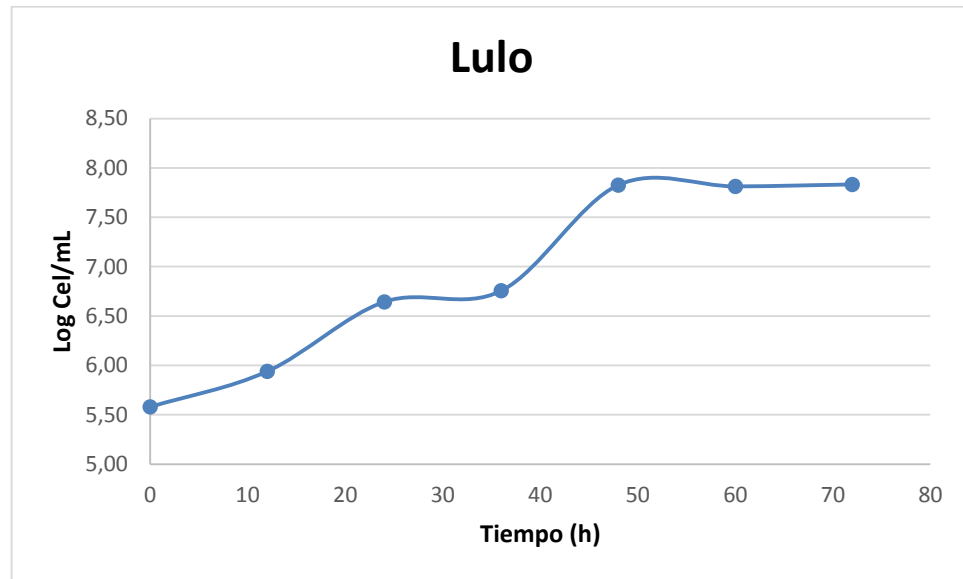
Para la mezcla limón-lulo, la fase de crecimiento se evidenció a partir de la hora 36 (momento en el que se realizó la primera dilución) y hasta la hora 84, la fase de adaptación se demoró más tiempo (24 horas) a comparación de las demás muestras realizadas en este proyecto, durante esta fase las células sintetizan las enzimas necesarias para crecer en el nuevo medio de cultivo en el que se encuentran. Al ser el limón-lulo la mezcla de la que se obtuvo la mayor cantidad de azúcares reductores después de la hidrólisis (10,67g), la demanda de enzimas es mayor lo cual se evidencia en la duración de esta fase. Luego de la hora 84 y hasta la hora 108 las diluciones no aumentaron, por lo cual se identificó como la fase estacionaria.

Gráfico 2. Curva de Crecimiento de la levadura en el fermentado de la mezcla limón-lulo.



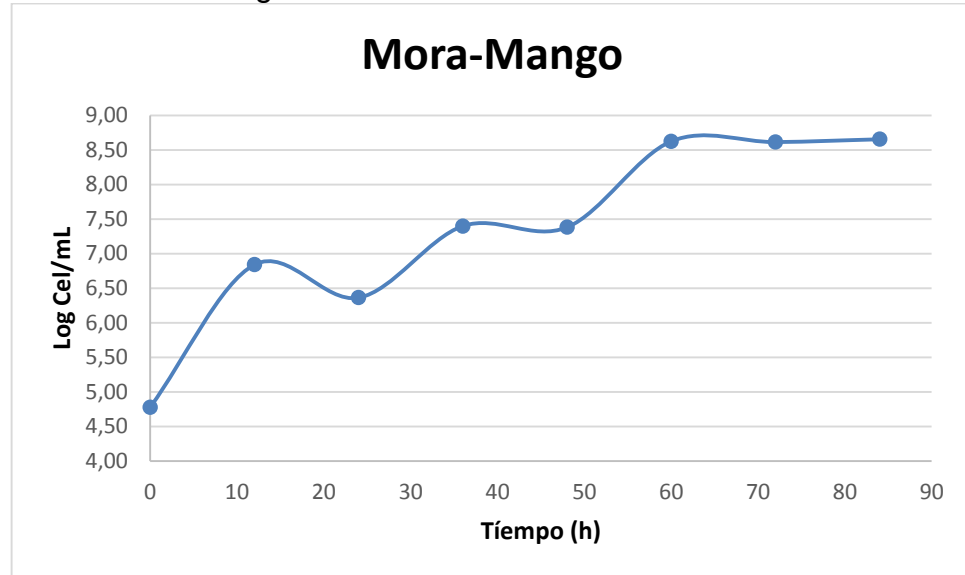
En el gráfico 3 se muestra la curva de crecimiento en la muestra de lulo, este residuo tuvo la más baja cantidad de azúcares reductores, debido a esto, el tiempo de fermentación fue menor al agotarse el sustrato. La fase de adaptación transcurrió durante las primeras 12 horas de fermentación; similar a la obtenida en la fermentación de otros residuos. La fase de crecimiento inició hacia la hora 24 y finalizó en la hora 48, luego de esto las diluciones no aumentaron al momento de realizar el recuento de células. La fermentación se detuvo en la hora 72.

Gráfico 3. Curva de Crecimiento de la levadura en el fermentado de lulo.



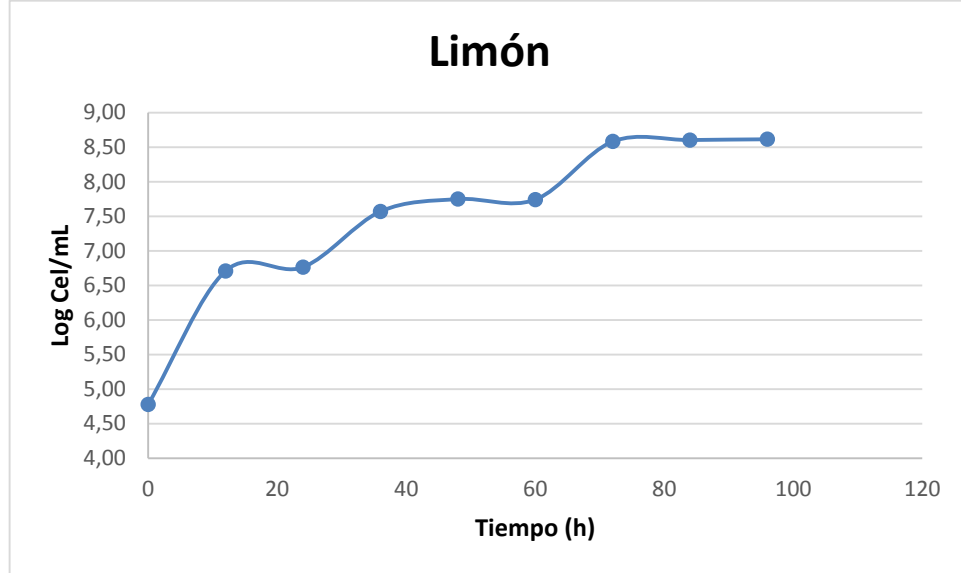
De la mezcla mora-mango (gráfico 4), se obtuvo una cantidad de azúcares reductores similar a la del lulo, de ésta se obtuvieron 6,31 g de azúcar, sin embargo, el tiempo de fermentación fue mayor, llegando a las 84 horas. La fase de adaptación se llevó a cabo durante las primeras 12 horas de fermentación, transcurrido este tiempo se evidenció el crecimiento de las células asociado con las diluciones de las muestras. La fase de crecimiento se detuvo en el recuento de la hora 42 donde inicia la hora estacionaria permaneciendo constante el crecimiento de la levadura.

Gráfico 4. Curva de Crecimiento de la levadura en el fermentado de la mezcla Mora-Mango.



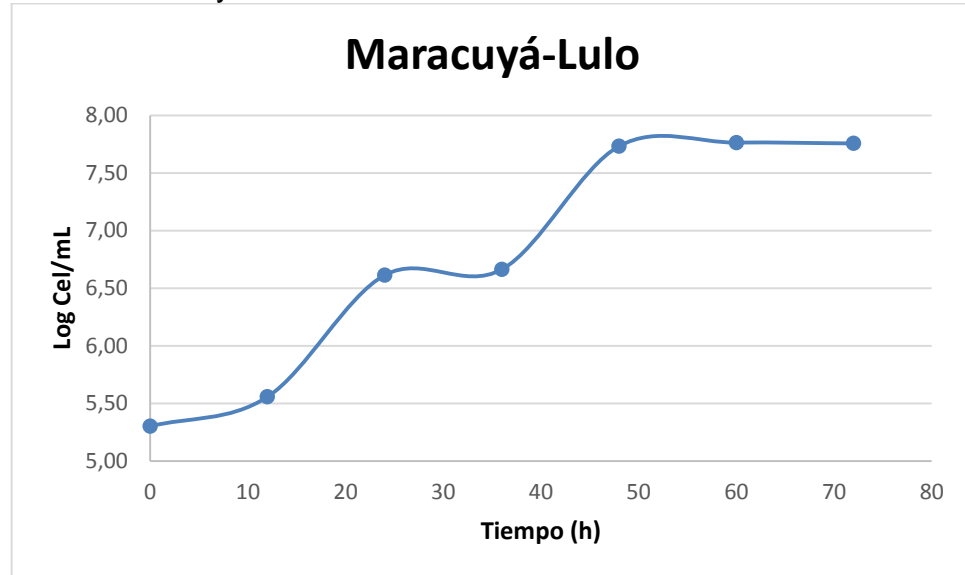
En el gráfico 5 se observa la cinética de crecimiento sobre el residuo de limón desde la hora cero hasta la hora 96, la fase de adaptación transcurrió durante las primeras 12 horas, la fase de crecimiento para el limón fue extensa en comparación con las demás muestras, esta finalizó en la hora 72. El residuo del limón presentó 7,27g de azúcares reductores después de la hidrólisis, siendo el sexto con mayor cantidad de carbohidratos; el tiempo de duración de la fase exponencial es similar al indicado por la mezcla limón-lulo, lo cual lleva a suponer que la presencia del limón en la fermentación favorece el crecimiento de la levadura, esto debe ser confirmado con estudios que varíen la cantidad de este residuo en las mezclas. El tiempo de fermentación es mayor en comparación de residuos como mora-mango.

Gráfico 5. Curva de Crecimiento de la levadura en el fermentado de limón.



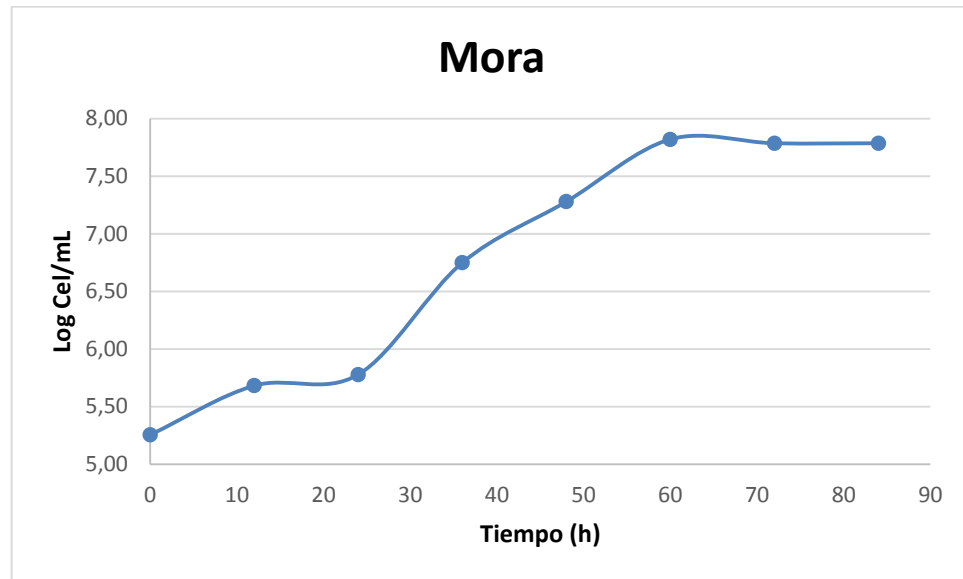
El gráfico 6 evidencia el crecimiento de la levadura en la mezcla de maracuyá-lulo fermentada, la fase de adaptación ocurrió durante las primeras 24 horas de fermentación, a pesar que la cantidad de azúcares obtenidos en esta mezcla (8,03g) es considerablemente alta en comparación con la del maracuyá, el tiempo de fermentación no fue tan extenso como la de este último, lo cual podría deberse a que la presencia del residuo lulo frena el crecimiento de la levadura, ya que al comparar las curvas de crecimiento se encuentra similitud con la muestra fermentada individual de lulo, la fase de crecimiento ocurrió entre las horas 24 y 48. La fase estacionaria inicia en la hora 48 y finaliza en la hora 72.

Gráfico 6. Curva de Crecimiento de la levadura en el fermentado de la mezcla maracuyá-lulo.



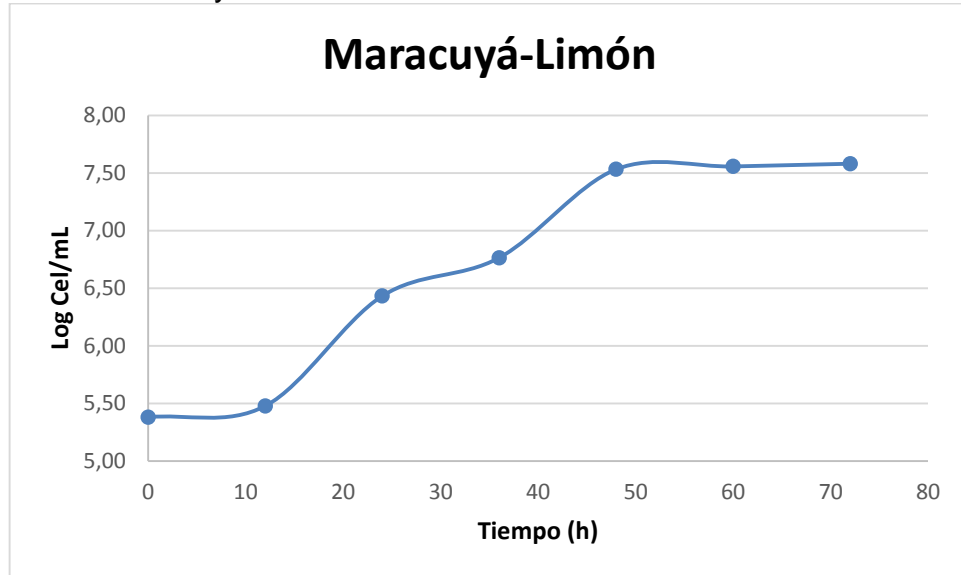
El gráfico 7 define la curva de crecimiento del residuo de mora fermentado, la fase de adaptación ocurrió en las primeras 36 horas de fermentación y a comparación de la mezcla limón-lulo, la cual tuvo el mismo tiempo de adaptación debido a características anteriormente dichas; la mora es un caso totalmente diferente en el cual se da una fase de adaptación muy extensa donde los azúcares obtenidos (6,92g) no indican grandes cantidades de sustrato que impliquen sintetizar cantidades altas de enzima y lo cual se constata en el tiempo total de fermentación que fue de 72 horas. La fase de crecimiento ocurre entre la hora 36 y 48; a partir de la 48 el crecimiento de la levadura se hace constante, esto muestra que el microorganismo a pesar de tener un sustrato con cantidad de azúcares reductores similar al de otras muestras no creció durante prolongados tiempos, sino que se estancó, deduciendo que el medio de cultivo no favorece la fermentación de esta levadura.

Gráfico 7. Curva de Crecimiento de la levadura en el fermentado de mora.



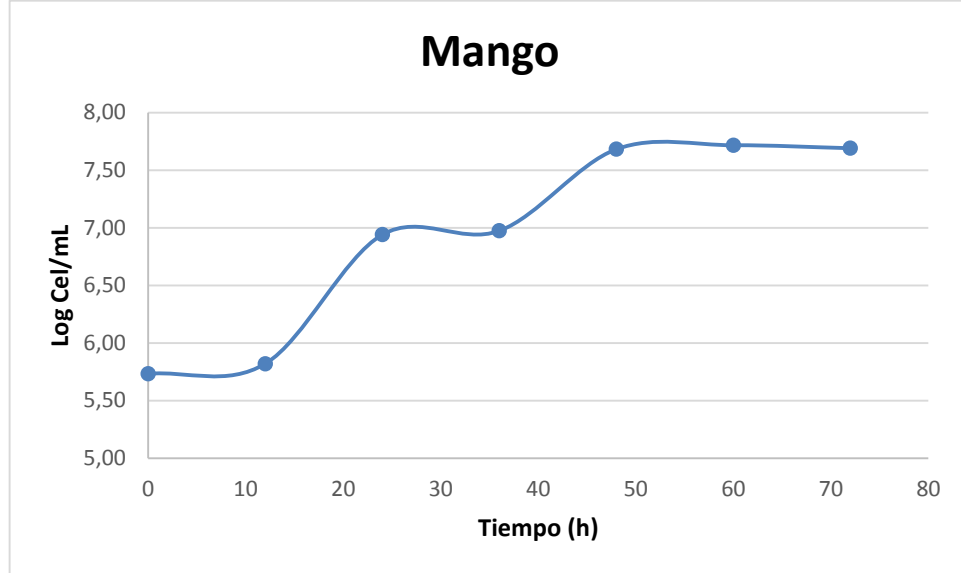
El gráfico 8 muestra el crecimiento en la mezcla maracuyá-limón; para esta mezcla se obtuvieron 7,54g de azúcares reductores mediante el método DNS. La fase de adaptación ocurrió durante las primeras 24 horas de reacción, la fase de crecimiento tuvo lugar entre las horas 24 y 48, el tiempo de fermentación fue de 72 horas, el cual es un tiempo de fermentación bajo, teniendo en cuenta que la fermentación de limón y maracuyá de manera individual fue de 96 horas en ambos casos, es decir, que la mezcla de estos dos residuos es desfavorable para el crecimiento de la levadura. La concentración final de levaduras también reafirma que el microorganismo no se reprodujo tan favorablemente como en los casos mencionados anteriormente.

Gráfico 8. Curva de Crecimiento de la levadura en el fermentado de la mezcla maracuyá-limón.



Por último, el crecimiento de la levadura a partir del residuo de mango se registra en el gráfico 9, para el cual la fase de adaptación transcurre durante las primeras 24 horas, la fase de crecimiento ocurre entre la hora 24 y la hora 48, a partir de la hora 48 el crecimiento se hace constante. El mango presentó 7,85g de azúcares reductores, cantidad similar a la determinada en el limón (7,27g), pero a diferencia de este, el tiempo de fermentación fue menor y el crecimiento celular no se vio favorecido, lo cual sugiere que los residuos de mango frenan el crecimiento de la levadura, lo que ocurre también con los residuos de mora que fueron fermentados de manera individual; al mezclar estos dos residuos aumenta el crecimiento del microorganismo, siendo esto uno de los propósitos principales: establecer las mezclas que favorecen el crecimiento del microorganismo en comparación con la fermentación individual de estos.

Gráfico 9. Curva de Crecimiento de la levadura en el fermentado de mango.



4.8 DESTILACIÓN

Transcurrido el tiempo de destilación, el volumen resultante (el que queda en el balón aforado de 100 mL) de muestra destilada osciló en alrededor de una décima parte del volumen inicial. Sus valores exactos se muestran en la tabla 35 junto con los resultados promedio de absorbancia de las 9 pruebas.

Tabla 35. Resultados de la Destilación.

Muestra	Absorbancia Promedio	Volumen Destilado (L)
Limón-Lulo	0,7662	0,035
Limón	0,8974	0,027
Maracuyá	0,8180	0,028
Mora	0,7055	0,033
Mora-Mango	0,7917	0,028
Maracuyá-Lulo	0,8380	0,023
Lulo	0,8219	0,023
Maracuyá-Limón	0,8797	0,021
Mango	0,7550	0,024

4.9 DETERMINACIÓN DE ETANOL POR EL MÉTODO DEL DICROMATO DE POTASIO

Empleando la curva de calibración del método del dicromato (gráfico 10), se obtuvo la ecuación representativa de la curva, la cual con los valores de absorbancia promedio, indicó los resultados de concentración de etanol en g/L (Tabla 36).

Concentración para la mezcla limón-lulo:

$$c \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{0,7662 - 0,0282}{0,02887} = 25,71 \frac{g}{L}$$

Con la ecuación 13 se determina la cantidad de alcohol en el **Volumen destilado**:

$$A_T = 0,035L * 25,71 \frac{g}{L} = 0,90 gEtanol$$

Gráfico 10. Curva de Calibración Método Dicromato de Potasio. Concentración Etanol vs Absorbancia.

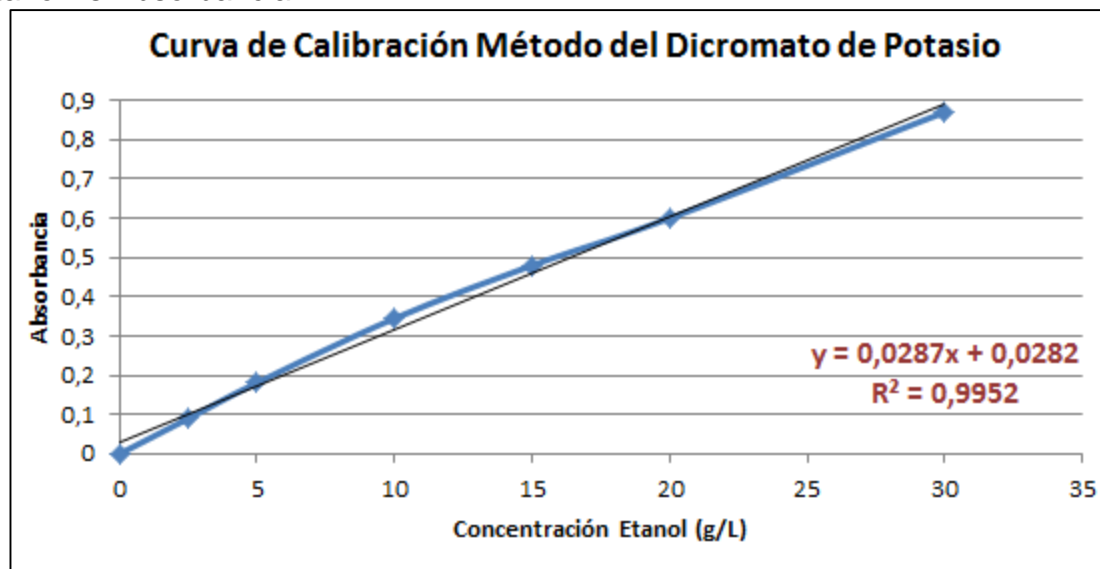


Tabla 36. Resultado cantidad total del etanol presente en el destilado.

Muestra	Absorbancia Promedio	Volumen destilado (L)	Concentración de Alcohol (g/L)	Alcohol Total (g)
Limón-Lulo	0,7662	0,035	25,71	0,90
Limón	0,8974	0,027	30,29	0,82
Maracuyá	0,8180	0,028	27,52	0,77
Mora	0,7055	0,033	23,60	0,78
Mora-Mango	0,7917	0,028	26,60	0,75
Maracuyá-Lulo	0,8380	0,023	28,22	0,65
Lulo	0,8219	0,023	27,65	0,64
Maracuyá-Limón	0,8797	0,021	29,67	0,62
Mango	0,7550	0,024	25,33	0,61

Finalmente, con la ecuación 14 se puede conocer la concentración real de etanol en el volumen fermentado:

$$\text{Concentración en los } 250\text{mL} = \frac{0,90 \text{ gEtanol}}{0,25\text{L}} = 3,6 \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

Es importante tener en cuenta que esta concentración de etanol también se expresa como la cantidad de gramos de etanol que se obtiene por litro de volumen final hidrolizado.

Tabla 37. Resultado cantidad total del etanol presente en el fermentado.

Muestra	Concentración de Alcohol en los 250 mL (g/L)
Limón-Lulo	3,60
Limón	3,27
Maracuyá	3,08
Mora	3,12
Mora-Mango	2,98
Maracuyá-Lulo	2,60
Lulo	2,54
Maracuyá-Limón	2,49
Mango	2,43

Al comparar con otras investigaciones se hace evidente que la concentración de alcohol es muy baja, autores como Melissa Vanegas⁶² registran que para el tiempo 24 horas se tienen concentraciones entre 30g/L y 60g/L en medios hidrolizados, para medios sin hidrolizar la concentración de etanol está en un rango de 6-12 g/L. estos resultados son obtenidos a través del aislamiento de macrófitas acuáticas tomadas de una laguna, a pesar que no son un sustrato similar utilizado en este proyecto, se menciona referencia la referencia para comprobar que los resultados obtenidos mediante el método del dicromato de potasio se expresan en términos de g/L. La tasa de concentración de alcohol calculada en este proyecto es incluso menor (2,43 – 3,60g/L) a la registrada por la anterior citación bibliográfica en medios sin hidrolizar, lo que significa que el medio fermentado contaba con una concentración muy baja de azúcares y se demuestra en el resultado de etanol producido.

4.10 DETERMINACIÓN DE ETANOL POR REFRACTOMETRÍA

A continuación, en la tabla 38, se muestran los índices de refracción obtenidos para las muestras patrón de etanol y su respectiva curva de calibración (gráfico 11).

Tabla 38. Datos para la curva de calibración del índice de refracción.
Curva de Calibración

Concentración Etanol % (V/V)	Índice de Refracción
1	1,3134
3	1,3236
5	1,3378
8	1,3403
10	1,3525
15	1,3586
20	1,3708

⁶² VANEGAS, Melissa; ZAPATA, Mónica; Aislamiento de Levaduras capaces de producir etanol a partir de macrofitas acuáticas extraídas mecánicamente de la laguna de Fúquene; Universidad Javeriana; Bogotá. P. 20-21.

Gráfico 11. Curva de calibración para determinar el porcentaje de alcohol por refractometría.

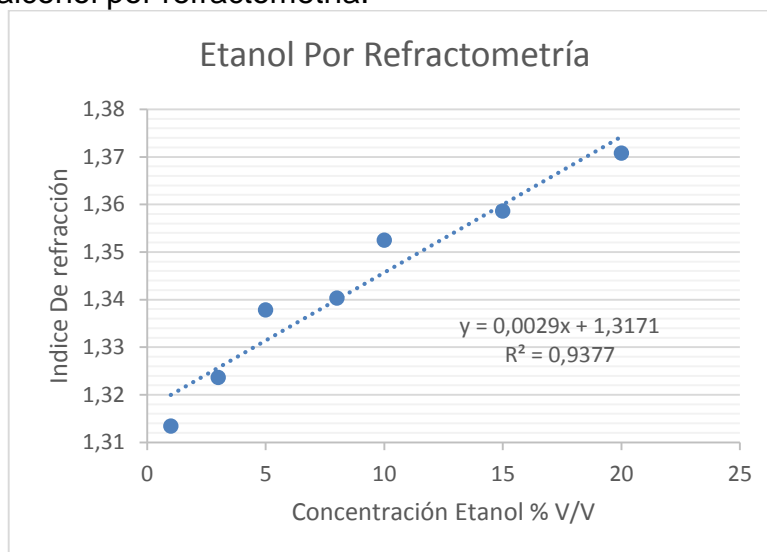


Tabla 39. Porcentaje etanol obtenido por el método de refractometría.

Muestra	Índice de Refracción Leído	% (V/V) del destilado	Volumen resultado de destilación (mL)	Volumen total de etanol (mL)	% (V/V) Fermentado
Limón-Lulo	1,3266	3,28	35	1,15	0,46
Limón	1,3283	3,86	27	1,04	0,42
Maracuyá	1,3274	3,55	28	0,99	0,40
Mora	1,3256	2,93	33	0,97	0,39
Mora-Mango	1,3268	3,34	28	0,94	0,37
Maracuyá-Lulo	1,3274	3,55	23	0,82	0,33
Lulo	1,3272	3,48	23	0,80	0,32
Maracuyá-Limón	1,3281	3,79	21	0,80	0,32
Mango	1,3264	3,21	24	0,77	0,31

En la tabla 39 se calcula el porcentaje de etanol de la siguiente manera (ejemplo limón):

$$X = \frac{1,3283 - 1,3171}{0,0029} = 3,86 \% \left(\frac{V}{V} \right)$$

Pero ese porcentaje es del volumen resultado del destilado y no de todo el que se fermentó, así que se halla el volumen de etanol en esa muestra:

$$\text{Volumen total de etanol} = 3,86 \% * \frac{27\text{ml}}{100\text{mL}} = 1,04 \text{ mL de Etanol}$$

Entonces, esos 1,04 mL vienen de un total de 250 mL, así que:

$$\% \left(\frac{V}{V} \right) = \frac{1,04 \text{ ml}}{250 \text{ mL}} * 100 \text{ mL} = 0,42 \% (V/V)$$

4.11 DETERMINACIÓN DE ETANOL POR EL MÉTODO DE DENSIDAD

El primer procedimiento fue tomar el peso del picnómetro, el cual fue de 12,6 g, a continuación, se determinó la densidad del agua: 1,048 g/mL y la densidad del etanol: 0,792 g/mL. Los datos de las muestras se documentaron en la tabla 40 para determinar los volúmenes de etanol en cada muestra:

$$V_{\text{etanol}} = \frac{10,4 - 10\text{mL} * 1,048}{0,792 - 1,048} = 0,3125 \text{ mL Etanol}$$

$$\% \left(\frac{V}{V} \right) \text{ en el Picnómetro} = \frac{0,3125\text{mL}}{10 \text{ mL}} * 100 = 3,125 \%$$

Tabla 40. Volumen de etanol en cada muestra.

Muestra	Peso Picnómetro + muestra (g)	Peso de la muestra (g)	Densidad de la muestra (g/mL)	Volumen Etanol (mL)	% (V/V) en el Picnómetro
Mango	23	10,4	1,04	0,3125	3,125
Maracuyá-Lulo	23,02	10,42	1,042	0,234375	2,344
Limón-lulo	22,98	10,38	1,038	0,390625	3,906
Mora-Mango	23,02	10,42	1,042	0,234375	2,344
Limón	23,02	10,42	1,042	0,234375	2,344
Maracuyá	23,02	10,42	1,042	0,234375	2,344
Mora	23,04	10,44	1,044	0,15625	1,563
Lulo	23,02	10,42	1,042	0,234375	2,344
Maracuyá-Limón	23,01	10,41	1,041	0,273437	2,734

La concentración del etanol en el picnómetro es la misma en el volumen resultado del destilado, por lo tanto:

$$\text{Volumen total de etanol} = 3,125 \% * \frac{24\text{ml}}{100\text{mL}} = 0,75 \text{ mL de Etanol}$$

Entonces, esos 0,75 mL vienen de un total de 250 mL, así que:

$$\% \left(\frac{V}{V} \right) = \frac{0,75\text{ml}}{250 \text{ mL}} * 100 \text{ mL} = 0,30 \% (V/V)$$

Tabla 41. Porcentaje de etanol obtenido por el método de densidad.

Muestra	Volumen resultado de destilación (mL)	Volumen total de etanol (mL)	% (V/V) Fermentado
Mango	24	0,75	0,30
Maracuyá-Lulo	23	0,54	0,22
Limón-lulo	35	1,37	0,55
Mora-Mango	28	0,66	0,26
Limón	27	0,63	0,25
Maracuyá	28	0,66	0,26
Mora	33	0,52	0,21
Lulo	23	0,54	0,22
Maracuyá-Limón	21	0,57	0,23

4.12 RENDIMIENTO DEL BIOETANOL

Antes de calcular el rendimiento de bioetanol, en la tabla 42 se hace comparación entre los tres métodos de determinación de etanol, con el fin de determinar el método más pertinente para calcular el rendimiento.

Se observa claramente que el método de densidad difiere bastante a los otros dos, esto ocurre porque tiene un fundamento físico que necesita una instrumentación muy precisa debido a las cantidades tan pequeñas que se manipulan, además las variaciones en las concentraciones son demasiado bajas para que generen un cambio significativo de la densidad que pueda ser detectado por la balanza empleada; en consecuencia, el método del refractómetro y del dicromato, generan un grado de confiabilidad más alto y esto se evidencia en los resultados obtenidos, los cuales no difieren significativamente entre ellos. Siendo la refractometría un

método físico más preciso, ya que se implementa a un nivel molecular que permite distinguir cambios mínimos en la composición de un compuesto; finalmente el dicromato de potasio tiene principio químico para la identificación de sustancias y al estar en exceso, se puede tener seguridad que todo el alcohol presente va a reaccionar y por lo tanto el cambio de color correspondiente va a ser a causa de todo el etanol presente. Por esto, se selecciona el método del dicromato de potasio para realizar los cálculos de rendimientos, ya que se considera el más preciso.

Para calcular el porcentaje en volumen del método del dicromato de potasio se utiliza como factor de conversión, la densidad estándar de etanol 0.789 g/mL.

Tabla 42. Comparación entre las diferentes concentraciones de etanol y sus métodos de determinación.

Muestra	Método de densidad % (V/V)	Método de Refractometría % (V/V)	Método del Dicromato de Potasio % (V/V)	Método del Dicromato de Potasio (g/L)
Limón-Lulo	0,55	0,46	0,46	3,60
Limón	0,25	0,42	0,41	3,27
Maracuyá	0,26	0,40	0,39	3,08
Mora	0,21	0,39	0,39	3,12
Mora-Mango	0,26	0,37	0,38	2,98
Maracuyá-Lulo	0,22	0,33	0,33	2,60
Lulo	0,22	0,32	0,32	2,54
Maracuyá-Limón	0,23	0,32	0,32	2,49
Mango	0,30	0,31	0,31	2,43

En la tabla 43 se muestran los rendimientos de etanol con base en la ecuación 12.

$$R_B = \frac{5,12L * 3,6g/L}{2 kg} = 9,22 \frac{g Etanol}{kg sustrato} \quad Ec(12)$$

Tabla 43. Rendimiento de bioetanol por cada kg de sustrato.

Muestra	Volumen final hidrolizado (L)	Concentración Etanol (g/L)	Rendimiento de Bioetanol (g/kg)
Limón-Lulo	5,12	3,60	9,22
Limón	3,89	3,27	6,36
Maracuyá	5,14	3,08	7,92
Mora	3,84	3,12	5,99
Mora-Mango	3,63	2,98	5,41
Maracuyá-Lulo	5,34	2,60	6,94
Lulo	3,79	2,54	4,81
Maracuyá-Limón	5,35	2,49	6,66
Mango	5,64	2,43	6,85

Los resultados obtenidos de rendimiento, a pesar de no ser viables para producir bioetanol en comparación con los que se obtienen con sustratos ricos en azúcares como el bagazo de caña de azúcar (0,34L etanol/kg de bagazo⁶³), son altos al ser comparados con los registrados por Tejeda Lesly⁶⁴, donde de cada kilogramo de cáscara de naranja se produjeron 8,4 gramos de etanol y por cada kilogramo de cáscara de piña se obtuvo 1 gramo de etanol.

En la tabla 44 se muestra la velocidad de crecimiento del microorganismo, la cual se calculó con el fin de comparar su dependencia con los parámetros de azúcares reductores y concentración de etanol.

El cálculo de la velocidad de crecimiento del microorganismo se realizó con la ecuación Monod⁶⁵ en la cual:

$$r_g = \mu C_c$$

Donde r_g es la velocidad de crecimiento celular

⁶³ FORERO, O. El bagazo de caña de azúcar petróleo verde del siglo; [Documento WWW]. URL. Recuperado 17 de Mayo 2016. http://www.dinero.com//seccion-patrocios/green/bagazo/-cana-azuca-petroleo-verde-del-siglo_62876.aspx.

⁶⁴ TEJEDA, Lesly; TEJADA, Candelaria; VILLABONA, Ángel; ALVEAR, Mario; CASTILLO, Carlos; HENAO, Daniela; MARIMÓN, Wilfrido; MADARIAGA, Natali; TARÓN Arnulfo; Producción de Bioetanol a Partir de la fermentación alcohólica de jarabes glucosados derivados de cáscaras de naranja y piña; Universidad de Cartagena, Cartagena (Colombia); Revista educación en Ingeniería, 2010. p. 120-125.

⁶⁵ DURANGO LONDOÑO, Laura; Evaluación y escalamiento de la producción de levaduras nativas tipo *saccharomyces* spp. a nivel de laboratorio; Universidad EAFIT Medellín; 2007. p. 44.

μ es la velocidad de crecimiento específica
 C_c es la concentración celular

La velocidad de crecimiento específica se determina mediante la siguiente ecuación:

$$\mu = \mu_{max} \frac{C_s}{K_s + C_s}$$

$$r_g = \mu C_c$$

Donde μ_{max} es la velocidad de crecimiento específica máxima
 K_s es la constante de Monod
 C_s es la concentración del sustrato

La constante de Monod (K_s) para varias especies de microorganismos tiene en la ecuación valores muy pequeños, por lo cual, se reduce a⁶⁶:

$$r_g = \mu_{max} C_c$$

Tabla 44. Velocidad de crecimiento, azúcares reductores y concentración de etanol.

Muestra	Velocidad de Crecimiento (Cel/mL*h)	Azúcares Reductores (g)	Concentración de Etanol (g/L)
Limón-Lulo	7.50E+06	10,67	3,60
Limón	6.33E+06	7,27	3,27
Mora	1.58E+06	6,92	3,12
Maracuyá	1.19E+07	9,23	3,08
Mora-Mango	8.75E+06	6,31	2,98
Maracuyá-Lulo	2.25E+06	8,3	2,60
Maracuyá-Limón	1.42E+06	7,54	2,49
Mango	2.00E+06	7,85	2,43
Lulo	2.79E+06	5,45	2,54

En la tabla 44 se evidencia que la mayor velocidad de crecimiento es alcanzada por los residuos de maracuyá (1.19E+7), sin embargo no es el sustrato con mayor cantidad de azúcares reductores y la concentración de etanol obtenida a partir de la muestra tampoco es la mayor, lo cual sugiere que el aumento de la población de levadura no es debido solo a la presencia de los azúcares reductores, sino que el sustrato que consume para su duplicación puede ser cualquier otro carbohidrato presente en la muestra y por consiguiente la producción de etanol no aumentará ya que el metabolito que se genere por otros sacáridos no será este mismo, lo cual se constata en los residuos de la mezcla maracuyá-limón y de mango, que

⁶⁶ SCOTT FLOGER, H.; Elementos de Ingeniería de las reacciones químicas Tercera Edición; Pearson Hall: 2001. p. 396.

presentaron la velocidad de crecimiento más baja ($1.42E+6$ y $2.0E+6$ respectivamente), sin embargo, la cantidad de azúcares presente en estas muestras era considerablemente alto, pero su crecimiento se ve limitado y por ende la producción de etanol.

4.13 RENDIMIENTO DE LA FERMENTACIÓN

Recopilando los datos de la tabla 33 donde se muestra la cantidad de azúcar disponible y que fue consumida, y de la tabla 43 donde está la cantidad de etanol obtenido, se obtiene la tabla 44, en la cual se muestra el rendimiento $Y_{P/S}$.

Comparando con los resultados obtenidos por Buitrago y Tenjo⁶⁷, la levadura tuvo un rendimiento alto de producto, esto debido a que la fuente de carbono es un factor limitante a concentraciones bajas de glucosa, entonces se obtiene más biomasa y un equilibrio en el número de células, el peso seco, el nitrógeno celular, el RNA y el DNA al producirse a la misma velocidad. En general, la levadura tuvo un rendimiento constante en todas las pruebas realizadas, lo que significa que los medios de cultivo mantuvieron condiciones similares e inocuas que permitieron el crecimiento de la cepa. El rendimiento teórico de la fermentación es de 0,51, la razón por la cual en esta experimentación se supera este límite es debido a que probablemente el hidrolizado tenía contenido de sacarosa que no puede ser leído por el método DNS, y algunas levaduras poseen la enzima invertasa que convierte la sacarosa en glucosa y fructosa.⁶⁸

Tabla 45. Rendimiento $Y_{(P/S)}$.

Muestra	Azúcares consumidos (g)	Bioetanol (g)	Rendimiento $Y_{P/S}$
Limón-Lulo	10,67	9,22	0,86
Limón	7,27	6,36	0,87
Maracuyá	9,23	7,92	0,86
Mora	6,92	5,99	0,87
Mora-Mango	6,31	5,41	0,86
Maracuyá-Lulo	8,03	6,94	0,86
Lulo	5,45	4,81	0,88
Maracuyá-Limón	7,54	6,66	0,88
Mango	7,85	6,85	0,87

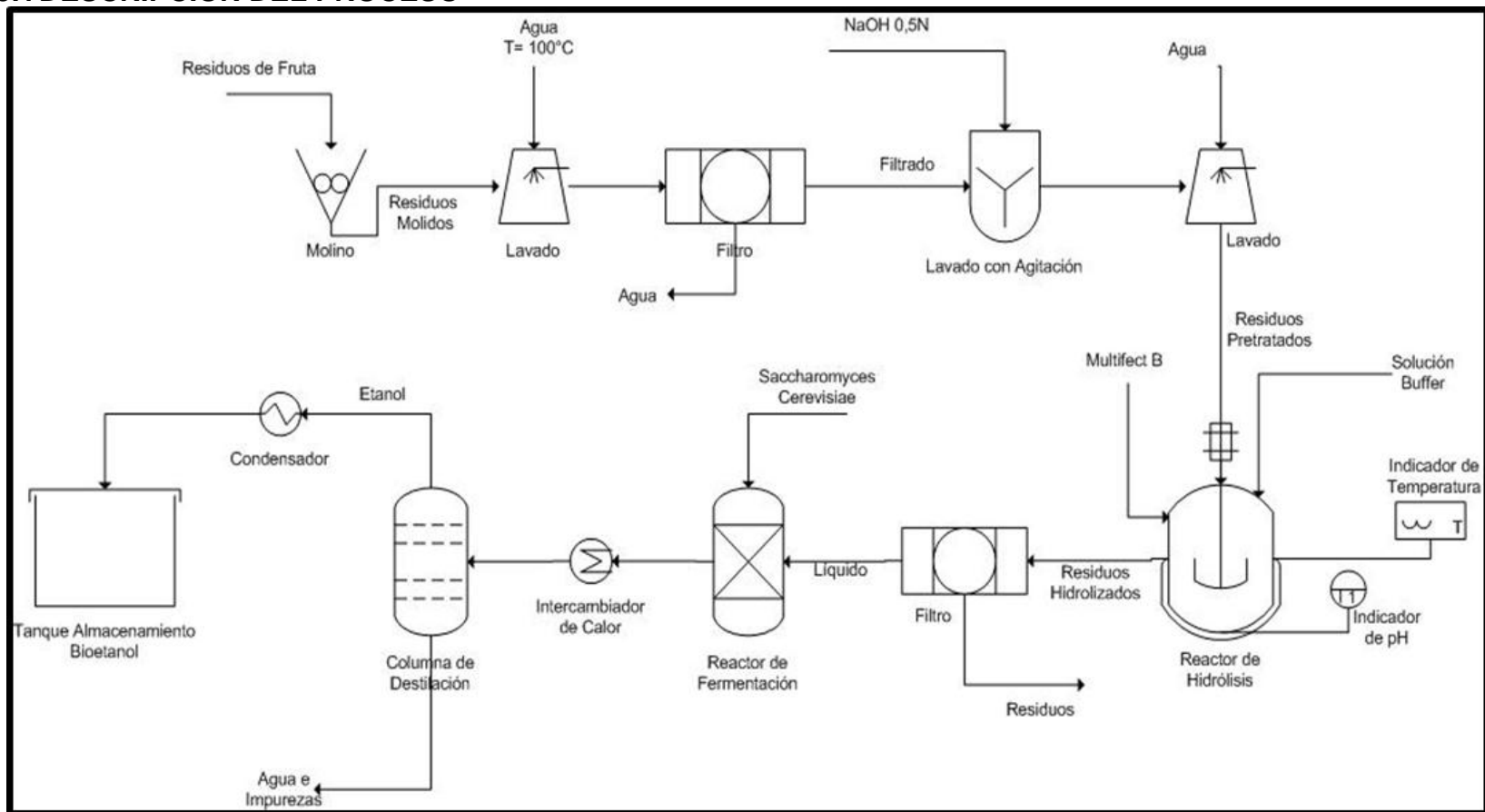
⁶⁷ Buitrago Estrada, Johanna Carol y Tenjo Camacho, Dolly Giselle. Obtención de un sustrato fermentable de origen vegetal y su evaluación con células libres de *Saccharomyces Cerevisiae*. Pontificia Universidad Javeriana.

⁶⁸ Ibid., p. 43.




5. ESTUDIO DE COSTOS PARA UNA PLANTA PILOTO

El último objetivo de este proyecto tiene como finalidad evaluar los costos que generaría llevar este proceso a una mayor escala, para esto se han considerado los costos fijos, directos e indirectos que produce la puesta en marcha de una planta piloto que produzca bioetanol, con el mismo diagrama de proceso y las mismas condiciones de operación que se trabajaron a escala banco, solo se cambiarán las dimensiones de los equipos.



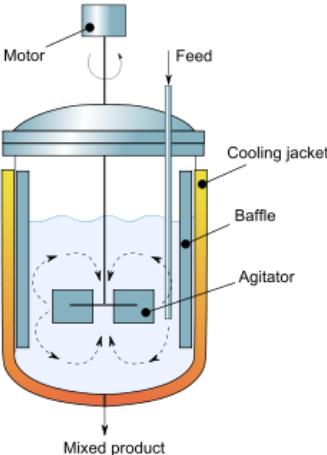
5.1 DESCRIPCIÓN DEL PROCESO






Cuadro 2. Descripción de los equipos y/o instrumentos utilizados en el proceso de obtención del bioetanol a nivel planta piloto.

Equipo y/o Instrumento	Condiciones de Operación	Datos Adicionales	Imagen
Trituradora	Capacidad Mínima: 2 Kg	Molino acoplado a motor de 1/2 HP con un peso de 35 kgs. Molino de Discos con un rendimiento de 60 Kgs/Hr.	
Primer Equipo de Lavado	Capacidad: 300 L Reactivo: Agua Temperatura: 90-110°C Presión atmosférica pH: 4-7	Tanque no requiere cubierta, lavado por aspersion con agua a temperatura entre 90 y 110°C, con banda o escalones de transporte para evacuación de solidos lavados y descarte de agua.	
Filtro Industrial	Capacidad 200L/h Reactivos: Agua, Enzima celulasa. Temperatura: Ambiente; 90-110°C	Para separar el líquido de la mezcla tratada y descartar los sólidos. Filtra la mezcla que sale del lavado con agua y la proveniente del reactor de Hidrolisis.	



Cuadro 2. (Continuación).

Equipo y/o Instrumento	Condiciones de Operación	Datos Adicionales	Imagen
Segundo Equipo Lavado (con NaOH)	Capacidad: 300 L Reactivo: NaOH Temperatura: Ambiente Presión atmosférica pH: 4-7 .	Tanque no requiere cubierta, agitación o turbulencia con 3 aspas con giro invertido durante 2 horas a temperatura ambiente, con banda o escalones de transporte para evacuación de sólidos hacia el próximo tanque.	
Tercer Equipo de Lavado	Capacidad: 300 L Reactivo: Agua Temperatura: Ambiente Presión atmosférica pH: 4-7	Tanque no requiere cubierta, lavado por aspersion con agua a temperatura ambiente, con banda o escalones de transporte para evacuación de solidos lavados y descarte de agua.	
Reactor de Hidrolisis	Capacidad: 300 L Reactivo: Agua, solución Buffer, Multifect B Temperatura: 40-60°C Presión atmosférica pH: 4-6	Tanque con recepción de mezcla y compuerta automática con sellado hermético. Resistencia sumergible para mantener temperatura. Control y visualizador de temperatura entre 40-60°C. Visualizador de pH. Agitación intermitente (pulsos) de 3 aspas con giro invertido. Tanque con revestimiento para mantener temperatura.	

Cuadro 2. (Continuación).

Equipo y/o Instrumento	Condiciones de Operación	Datos Adicionales	Imagen
Reactor de Fermentación	Capacidad: 300 L Reactivo: Etanol, Agua. Temperatura: Ambiente Presión atmosférica pH: 5-7	Fermentador de acero inoxidable de 1000L válvula de alivio de 0.2 a 2.2 bares Termómetro de 0-30°C. Válvula de salida.	
Columna de Destilación	Capacidad: 230 litros Reactivo: Líquido fermentado Temperatura: 70-80°C Presión atmosférica pH: 6-7	Se requiere llevar el líquido fermentado hasta punto de ebullición para destilar el etanol. EL producto destilado llega por gravedad al tanque de almacenamiento.	
Tanque Almacenamiento	Capacidad: 210 litros Reactivo: Bioetanol Temperatura: Ambiente Presión atmosférica pH: 6-7	Tanque cerrado con conexión al tanque de destilación	

Cuadro 2. (Continuación).

Equipo y/o Instrumento	Condiciones de Operación	Datos Adicionales	Imagen
Termómetro Bimetálico	-----	-----	
pHmetro	-----	-----	

5.2 COSTOS FIJOS

Los costos fijos son los recursos que se hacen necesarios adquirir para la realización del proceso y se convierten en un activo permanente, como los equipos e instrumentos utilizados en el proceso.

Tabla 46. Costo de los equipos a nivel planta piloto.

Equipos	Cantidad	Total, sin IVA (\$)
Trituradora	1	2.670.000
Banda Transportadora	4	14.000.000
Primer Equipo de Lavado	1	7.800.000
Segundo Equipo de Lavado	1	7.100.000
Tercer Equipo de Lavado	1	6.400.000
Reactor de Hidrolisis	1	12.650.000
Bomba para Sólidos	1	1.470.000
Módulos de Filtro	1	1.360.000
Bomba Hidráulica	2	1.500.000
Tanque de Fermentación	1	3.900.000
Columna de Destilación	1	6.750.000
Tanque de Almacenamiento	1	4.800.000
Sistema de Interconexión	1	4.200.000
Automatización	1	18.000.000
Total, sin IVA		92.600.000
TOTAL		107.416.000

5.3 COSTOS DIRECTOS

Los costos directos de un proceso son aquellos recursos que están asociados al desarrollo de la producción, como materia prima, mano de obra.

5.3.1 Materia Prima. La materia prima que se utiliza en el proceso son los residuos que se producen en Alimentos SAS S.A.S. por tanto se trata de una materia que no presenta ningún costo, sin embargo, también se consideran como materia prima los reactivos y microorganismos utilizados.

Tabla 47. Costo de la Materia Prima.

Materia Prima	Costo
Residuo de Frutas	0 \$/kg
Hidróxido de Sodio 0,5N	3.500 \$/kg
Solución Buffer	44.000 \$/L
Multifect B	98.000 \$/L

5.4 COSTOS INDIRECTOS

Son los costos que no están relacionados directamente con la producción pero que se originan como consecuencia del desarrollo esta, ejemplo de estos son el consumo de agua, luz y gas.

5.4.1 Consumo de Energía. El consumo energético de los equipos se determina de acuerdo a la cantidad que cada uno de estos consuma, teniendo en cuenta que el valor del kW/h en Bogotá para el sector industrial es de 436,06⁶⁹. Para esta planta piloto se considera un tiempo de operación de 12 horas diarias.

Tabla 48. Consumo de energía de equipos para el año 2016.

Equipos	Cantidad (kWh)	Horas Trabajadas al Mes	Total (\$)
Trituradora	1,125	180	392.454,00
Banda Transportadora	1,5	180	784.908,00
Primer Equipo de Lavado	15,375	150	1.005.663,38
Segundo Equipo de Lavado	3,375	150	220.755,38
Tercer Equipo de Lavado	3,375	90	132.453,23
Reactor de Hidrolisis	7,1	210	650.165,46
Bomba para Sólidos	1,875	180	147.170,25
Bomba Hidráulica	1,5	180	117.736,20
Columna de Destilación	0,024	210	641.008,20
TOTAL			4.092.314,09

⁶⁹ Tarifas de energía eléctrica (\$/kwh) reguladas por la comisión de regulación de energía y gas (creg) enero de 2016, En: [ps://www.google.com.co/search?q=valor+kwh+codensa+2016&oq=valor+Kw&aqs=chrome.2.69i57j0l5.4804j0j9&sourceid=chrome&ie=UTF-8](https://www.google.com.co/search?q=valor+kwh+codensa+2016&oq=valor+Kw&aqs=chrome.2.69i57j0l5.4804j0j9&sourceid=chrome&ie=UTF-8)

5.4.2 Consumo de Agua. Este costo es debido al uso de este recurso en los procesos de lavado y de hidrolisis. El consumo del agua se determina teniendo en cuenta que el valor del m³ en el sector industrial de Bogotá es de \$ 2.409⁷⁰.

Tabla 49. Consumo de agua de equipos para el año 2016.

Equipos	Cantidad (m³)	Total (\$)
Primer Equipo de Lavado	8,4	20.235,60
Segundo Equipo de Lavado	8,4	20.235,60
Tercer Equipo de Lavado	8,4	20.235,60
Reactor de Hidrolisis	7,2	17.344,80
TOTAL		78.051,60

5.5 Costos producción de etanol a escala banco.

A continuación, se describe el costo de producir bioetanol a escala banco en las condiciones del proyecto.

Tabla 50. Costo de producir bioetanol en el proyecto.

Proceso	Servicio ó Material	Cantidad	Costo Unitario (\$)	Costo Total (\$)
Pretratamiento Físico	Agua (L)	6	2,409	14,454
	Consumo energético (kWh)	18	436,06	7849,08
	Lavados (L)	8	2,409	19,272
Pretratamiento Químico	Agua (L)	4	2,409	9,636
	NaOH (g)	80	3,5	280
	Motorreductor (kWh)	23	436,06	10029,38
	Lavados (L)	16	2,409	38,544
	Buffer (mL)	100	44	4400
Hidrólisis	Multifect (mL)	3,86	196	756,56
	Agua (L)	6	2,409	14,454
	Calentamiento (kWh)	2	436,06	872,12

⁷⁰ Estructura tarifaria para los suscriptores atendidos en Bogotá d. c. por la empresa de acueducto. Tarifas alcantarillado año 2016 . En: <http://www.acueducto.com.co/>

Fermentación	Caldo de cultivo (g)	3	355	1065
Destilación	Calentamiento (kWh)	4	436,06	1744,24
TOTAL				\$ 27092,74

La cantidad invertida para realizar cada una de las fermentaciones es de \$27.093, como la cantidad de bioetanol producida no es la misma para cada muestra, se determina el costo de obtener 1mL de cada una de las muestras.

Tabla 51. Costo de producir 1mL de bioetanol en el proyecto.

Muestra	mL/kg	mL/2000 g residuos	\$/mL
Limón-Lulo	11,69	23,38	1158,8
Limón	8,06	16,12	1680,69
Maracuyá	10,04	20,08	1349,24
Mora	7,59	15,18	1784,77
Mora-Mango	6,86	13,72	1974,69
Marauyá-Lulo	8,8	17,6	1539,36
Lulo	6,10	12,2	2220,72
Maracuyá-Limón	8,44	16,88	1605,02
Mango	8,68	17,36	1560,64

El costo se expresa en unidades volumétricas debido a que comercialmente se maneja de esta manera, como se mencionó en el capítulo anterior la unidad de conversión utilizada fue la densidad (0,789 g/mL), determinada en laboratorio. Es notorio que el costo de producción de bioetanol por mL en este proyecto no es viable económicamente, teniendo en cuenta que el valor comercial de bioetanol es de \$2.033,98/L⁷¹. A pesar de ello, el costo es coherente para cada una de las muestras, puesto que claramente se observa que, a mayor rendimiento el costo es menor. La muestra limón-lulo presenta el menor costo, siendo esta la de mayor rendimiento, a pesar de ser el lulo (de manera individual) el residuo con mayor costo.

⁷¹ Federación Nacional de Biocombustibles en Colombia, En; <http://www.fedebiocombustibles.com/>

6. CONCLUSIONES

El trabajo realizado permite establecer las siguientes conclusiones.

- Las mezclas de los residuos se plantearon de acuerdo a la cantidad de celulosa presente en cada uno de estos, estableciendo combinaciones entre limón, maracuyá y lulo, los cuales tienen un porcentaje medio de celulosa en un rango de 7-9%. El mango y la mora por ser las muestras con mayor contenido de celulosa 17,85 y 16,43 respectivamente, fueron mezcladas.
- La enzima Multifect B tuvo una actividad enzimática sobre papel filtro de 40,187 $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{h}$, la cual es alta en comparación con la obtenida por otros autores. Sin embargo, esta enzima no obtuvo buenos rendimientos al hidrolizar los residuos de frutas, obteniendo del maracuyá el mayor grado de conversión, 0,461%.
- Para un proceso de hidrólisis enzimática entre 48°C y 52°C, con un pretratamiento alcalino de NaOH 0,5 N, la mezcla de residuos entre el limón y lulo obtuvo el mejor rendimiento de etanol con 9,63 g de etanol/kg de sustrato, entre todas las nueve muestras evaluadas individualmente y en mezcla.
- El crecimiento de la levadura en el proceso de fermentación de las nueve muestras tuvo una duración entre 72 y 108 horas. En las primeras 30 horas de la inoculación de los fermentados, no se presentaron crecimientos importantes, este tiempo se considera como la fase de adaptación, a partir de tiempos superiores a 48 se obtuvo la fase exponencial.
- El desarrollo de un proyecto industrial o comercial bajo estas condiciones de operación, no es económicamente viable debido a que los rendimientos son muy bajos (4,78 a 9,63 g de etanol/kg de sustrato) y el costo mínimo para producir etanol es de 1682,18 \$/mL mientras que comercialmente el bioetanol tiene un precio de 2033,98 pesos/L.

7. RECOMENDACIONES

El trabajo realizado permite realizar las siguientes recomendaciones:

- En el proceso de fermentación se recomienda controlar la entrada de aire desde el inicio hasta el final, proveer un sistema de toma muestra que impida la entrada de aire al momento de realizar recuento del crecimiento celular. Esto se hace llenando de forma completa el recipiente o incorporando al sistema una válvula air lock.
- En el pretratamiento químico se recomienda realizar pruebas a concentraciones menores del hidróxido de sodio, debido a que se observó que los residuos más ácidos tuvieron un mayor rendimiento en el proceso de hidrólisis, además aumentar el número de lavados después de este pretratamiento con el fin de disminuir el uso de solución buffer y disminuir la presencia de NaOH.
- Para la hidrólisis se recomienda evaluar el proceso a diferentes tiempos 12, 24, 48 y 72 horas, con el objetivo de establecer los tiempos con mayor rendimiento de azúcares reductores. De igual manera se recomienda evaluar el uso de una enzima diferente a la Multifect B.
- Para las mezclas y residuos de las cuales no se tuvo un buen rendimiento en la hidrólisis se recomienda hacer experimentaciones a nivel laboratorio, evaluando variables como el tipo de pretratamiento, el tiempo de hidrólisis, la enzima utilizada, con el fin de aumentar el grado de conversión de la celulosa.
- En la determinación de etanol producido se recomienda hacer pruebas más rigurosas como cromatografías, para tener un dato más exacto de la cantidad de etanol presente en las muestras fermentadas y además poder reconocer que otros compuestos están presentes en estas, para poder comparar la calidad del bioetanol obtenido.
- Para posteriores investigaciones se recomienda hacer experimentaciones a nivel laboratorio variando la proporción de residuos que se utilizan en las muestras, para determinar que residuos pueden aumentar o disminuir la producción de bioetanol. Además, se recomienda determinar la composición de las corrientes y subproductos que fueron desechadas y evaluar cómo podrían aprovecharse en otros procesos o como corrientes de recirculación en este mismo proceso.

BIBLIOGRAFÍA

ACOSTA ROMERO, Carolina. Evaluación De La Fermentación Alcohólica Para La Producción De Hidromiel. Universidad Nacional de Colombia, 2012. p. 6; 144.

ALIMENTOS SAS S.A.S. Quienes Somos. [Electronic(1)]. [Consultado el 05 de Septiembre2015]. Disponible en: <http://www.pulpas-de-frutas.com/quienes-somos-fruit-pulp-alimentosprocesados-exoticas.htm>

ANGULO VALENCIA, Alexandra E. Efectividad de microorganismos nativos en relación a *Aspergillus niger*, *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 y *Zymomonas Mobilis* para la producción de bioetanol a partir de residuos de sandía "citrullus lanatus" a escala piloto, Escuela politécnica del ejército, 2010. p. 40-45; 63.

ÁVILA Núñez, Ramona; RIVAS Pérez Bernarda; HERNÁNDEZ Motzezak, Rómulo; CHIRINOS Marluy; Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en Agave cocui Trelease; En: Multiciencias, vol. 12, núm. 2, abril-junio, 2012; p.131.

AULAR, Jesús y RODRÍGUEZ, Yecenia. Características físicas y químicas y pruebas de preferencia de tres tipos de mangos criollos venezolanos. En: BIOAGRO. vol. 17, no. 3, p. 171-176.

BENÍTEZ, Lesly Tejada, et al. Producción de bioetanol a partir de la fermentación alcohólica de jarabes glucosados derivados de cáscaras de naranja y piña. En: REVISTA EDUCACIÓN EN INGENIERÍA. vol. 5, no. 10, p. 120-125.

CAÑAR, Dubert Y. y CAETANO, Creuci M. Caracterización fisicoquímica preliminar como estrategia para promoción y conservación de tres frutales neotropicales. En: ACTA AGRONÓMICA. vol. 61, no. 5, p. 83.

CAZARIN, Cinthia Baú Betim, et al. Capacidade antioxidante e composição química da casca de maracujá (*Passiflora edulis*). En: CIÊNCIA RURAL. vol. 44, no. 9, p. 1699-1704.

CIRO, HÉCTOR J.; VAHOS, DIEGO L. y MÁRQUEZ, CARLOS JULIO. Estudio experimental de la fuerza de fractura en frutas tropicales: el tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* sendt). En: DYNA. vol. 72, no. 146, p. 55-64

CÓRDOBA, Maureen Daniela. Determinación del Efecto de la Concentración de la Base NaOH, de la Celulasa y Celobiasa en la Hidrólisis Para la Producción de Etanol a partir del Rastrojo de la Piña. Universidad de Costa Rica. Escuela de Ingenierías Industriales, 2011. p. 3.

DAMACENO, Marlene Nunes. Caracterización y Procesado De Kiwi y Fresa Cultivados Por Diferentes Sistemas. Universidad de Santiago de Compostela, 2007. p. 12.

DÍEZ, S. B. Obtención de Bioetanol 2G a partir de hidrolizados de paja de trigo: fermentación conjunta de los penta y hexa carbohidratos con *Pichia stipitis*. Universidad de Valladolid, Escuela de Ingenierías Industriales, 2013. p. 5 – 13; 30 31.

DOMINGUEZ, JOSE M. Efecto De Los Productos De Degradación Originados En La Explosión Por Vapor De Biomasa De Chopo Sobre "*Kluyveromyces Marxianus*". MADRID/ESPAÑA.: UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, 2003. p. 5.

DURANT, A., et al. Analysis of volatile compounds from solanum betaceum Cav. Fruits from panama by head-space micro extraction. En: REC NAT PROD. vol. 7, p. 15-26.

Elpais.com.co y Colprensa y El Universal. Producción De Biocombustibles En Colombia Crecerá En 2014. [Electronic(1)]. 17 de Febrero de 2014. [Consultado el 07 de Septiembre 2015]. Disponible en: <http://www.elpais.com.co/elpais/economia/noticias/produccion-biocombustibles-colombia-crecera-2014>.

FONSECA, Magda Carolina, et al. Caracterización fisicoquímica del fruto de cuque (*Solanum vestissimum* Dunal) durante la maduración. En: REVISTA COLOMBIANA DE CIENCIAS HORTÍCOLAS. vol. 6, no. 1, p. 31-40.

FORERO GÓMEZ, Fabian Enrique; LÓPEZ VELANDIA, Roberto Ribelino y MALAGÓN M., Martha Lucia. Obtención Del Etanol a Partir De Brócoli y Cáscara De Arveja Empleando La Enzima Multifect 720 De Carácter Básico a Nivel De Laboratorio. Bogotá, D. C: Fundación Universidad de América, 2008.

GALLINAR TERCERO; Ana Gabriel, Control robusto de columnas de destilación para mezclas binarias ideales, Universidad veracruzana, 2015. p. 22.

GARCÍA, R., Durán, M. A., & Riera, R. (2006). Producción de biomasa de *Trichoderma harzianum* por fermentación líquida. Fitosanidad, 10(4), p. 295-298.

GUIGOU, Marian. Producción de Bioetanol Combustible a partir de Boniato. Universidad de la Republica. Uruguay, 2011. p. 9.

HAMES, Bonnier, et al. Rapid biomass analysis. En: APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY. 03/01.vol. 105, no. 1-3, p. 5-16.

HERNÁNDEZ G.,Ruben. Respiracion - Librobotanicaonline - Respiracion [Print(0)]. [Consultado el 10/1/2015]. Disponible en:<http://www.forest.ula.ve/~rubenhg/respiracion/>

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. NTC 1486: presentación de tesis, trabajos de grado y otros trabajos escritos. Bogotá: ICONTEC 2008, 13p.

_____, Referencias bibliográficas, contenido, forma y estructura. NTC 4490, Bogotá: El instituto, 1998, 12 p.

_____, Referencias documentales, para fuentes de informaciones electrónicas. NTC 5613. Bogotá: El instituto. 1998, 8p.

JURI A., Sebastian A. Sacarificación y Fermentación Simultánea Para La Producción De Bioetanol De Segunda Generación, Mediante Pretratamientos Alternativos: Líquidos Iónicos Reciclados y Hongos De Pudrición Blanca. Santiago de Chile.: UNIVERSIDAD DE CHILE, 2011.

KOSSEVA, Maria R. Sources, Characterization, and Composition of Food Industry Wastes. En: [Anónimo] Food Industry Wastes: Assessment and Recuperation of Commodities. Academic Press, 2013. p. 37.

KULKARNI S.G., VIJAYANAND P.; Effect of extraction conditions on the quality characteristics of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* L.); 2010.

LANE, AG. Laboratory scale anaerobic digestion of fruit and vegetable solid waste. En: BIOMASS. vol. 5, no. 4, p. 245-259

LINSTROMBERG, Walter W. Carbohidratos. En Curso Breve de Química Orgánica. Reverte, 1977. p. 388.

MALAGÓN MICAN, Martha Lucia. Hidrólisis Enzimática De La Celulosa De Residuos Vegetales, Por Medio De Celulasas Para Producir Bioetanol.

MAMMA, Diomi; CHRISTAKOPOULOS Paul; Biotransformation of Citrus By-Products into Value Added Products; 2013.

MÁRQUEZ CARDOZO,Carlos Julio. Caracterización Fisiológica, Físicoquímica, Reológica, Nutracéutica, Estructural y Sensorial De La Guanábana (*Annona muricata* L. Cv. Elita) . Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, 2009.

MARUCHI,Alonso, et al. Caracterización de los frutos de cuatro cultivares de papaya del grupo solo, introducidos en Cuba. En: AGRONOMÍA COSTARRICENSE. vol. 32, no. 2, p. 169.

MILLER, Gail Lorenz; Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar; En: Analytical Chemistry Vol 31, 1959; p. 426.

MINAMBIENTE. Colombia Celebra Día Mundial Del Reciclaje. [Electronic(1)]. 15 de Mayo de 2015. [Consultado el 07 de Septiembre2015]. Disponible en:<https://www.minambiente.gov.co/index.php/component/content/article/2-noticias/1793-colombia-celebra-dia-mundial-del-reciclaje>.

MINAMBIENTE. Colombia Se Compromete a Reducir El 20% De Sus Emisiones De Gases De Efecto Invernadero Para El Año 2030. [Electronic(1)]. 21 de Julio de 2015. [Consultado el 07 de Septiembre2015]. Disponible en: <https://www.minambiente.gov.co/index.php/component/content/article/2-noticias/1913-colombia-se-compromete-a-reducir-el-20-de-sus-emisiones-de-gases-de-efecto-invernadero-para-el-ano-2030>.

MORALES, Madelaide, et al. Caracterización de la maduración del fruto de pina nativa (*Ananas comosus* L. Merrill) CV. India. En: AGRONOMÍA COLOMBIANA. vol. 18, no. 1-3, p. 63-69.

MULTIFECT B GENENCOR BETA GLUCANASE; Genencor; 2011. En www.genencor.com.

N. Abdullah; N. Ejaz; M. Abdullah; Alim Un Nisa; S. Firdous. Lignocellulosic degradation in solid-state fermentation of sugar cane bagasse by *termitomyces* sp. Colegio de Postgraduados (Campus Puebla, México). 2006. p. 2.

OLORUNNISOLA, Kola; PARVEEN, Jammal; Utilization of fruit peels as carbon source for white rot fungi biomass production under submerged state bioconversion; 2015.

ORTEGANO, Diana; Determinación de la sacarosa en una bebida gaseosa comercial y de etanol en una bebida alcohólica (aguardiente), mediante la aplicación de la refractometría; UNEXPO, 2015.

PASQUEL REÁTEGUI, José Luis, et al. Extraction of antioxidant compounds from blackberry (*Rubus* sp.) bagasse using supercritical CO₂ assisted by ultrasound. En: THE JOURNAL OF SUPERCRITICAL FLUIDS. 10.vol. 94, p. 223-233

PEREIRA, Sandra Cerqueira, et al. 2G Ethanol From the Whole Sugarcane Lignocellulosic Biomass. En: BIOTECHNOLOGY FOR BIOFUELS. 03/12.vol. 8, no. 1, p. 1-16.

Portafolio.co. Combustible Con Mezcla De 20% De Etanol Pasó Pruebas. [Electronic(1)]. 29 de Octubre de 2012. [Consultado el 07 de Septiembre 2015]. Disponible en: <http://www.portafolio.co/negocios/combustible-mezcla-20-etanol-paso-pruebas>

REINA G., Carlos Emilio; VARGAS C., Esther y WITZ S., Mónica. Manejo Postcosecha y Evaluación De La Calidad Para La Naranja (Citrus Sinences), Limón (Citrus Aurantifolia) y Mandarina (Citrus Reticulata) Que Se Comercializa En La Ciudad De Neivas). [Electronic(1)]: Neiva: Universidad Surcolombiana, 1995. p. 74.

REINA, Carlos Emilio; DUSSAN PARRA, Saúl y SÁNCHEZ S., Ricardo. Manejo Postcosecha y Evaluación De La Calidad De Maracuyá (Passiflora Edulissims) Que Se Comercializa En La Ciudad De Neiva. [Electronic(1)]: Neiva: Universidad Surcolombiana, 1999. p. 53.

RIVADENEIRA, M. y CÁCERES, P. Extracción de pectina líquida a partir de cáscaras de Maracuyá (Passiflora edulis) y su aplicación en el desarrollo de un producto de humedad intermedia.

RODRIGUEZ BARAHONA, Carmen María; SARABIA TRUJILLO, Cristina Isabel. Efecto del método de fermentación acética en las características físico-químicas y sensoriales en vinagre de naranja agria (Citrus x aurantium) y piña (Ananas comosus). Universidad Zamorano. 2012. p.7.

SAHEED, Olorunnisola Kola, et al. Utilization of fruit peels as carbon source for white rot fungi biomass production under submerged state bioconversion. En: JOURNAL OF KING SAUD UNIVERSITY-SCIENCE.

SÁNCHEZ MIGUEL; Anabel. Fermentación de malta empleando un sistema semicontinuo en el proceso de elaboración de cerveza. Universidad tecnológica de la mixteca. 2011. p. 16-17.

SPEIGHT, James G. Fermentation. En: [Anónimo] Chemical Process and Design Handbook. 2002. ISBN 9780071374330.

SUDHA, M. L., et al. Mango pulp fibre waste: characterization and utilization as a bakery product ingredient. En: JOURNAL OF FOOD MEASUREMENT AND CHARACTERIZATION. 09/01.vol. 9, no. 3, p. 382-388.

SUN-WATERHOUSE, Dongxiao, et al. Utilisation Potential of Feijoa Fruit Wastes as Ingredients for Functional Foods. En: FOOD AND BIOPROCESS TECHNOLOGY. vol. 6, no. 12, p. 3441-3455

TAIZ, L. y ZEIGER, E. Metabolitos Secundarios y Defensa En Las Plantas. En: Fisiología Vegetal. Universitat Jaume I, 2006. p. 549.

TORRES F., Nelly Rocío. Determinación Del Potencial Nutritivo y Nutraceutico De Cuatro Cultivares De Tomate De Árbol (*Solanum Betaceum*). Riobamba-Ecuador.: Escuela superior Politécnica de Chimborazo, 2006. p. 15-16.

TRIANA CARANTÓN, Cristian Fernando. Producción De Bioetanol a Partir De Residuos Provenientes Del Cultivo De Café. Universidad Nacional de Colombia - Sede Manizales, 2010. p. 35.

VANEGAS, Melissa; ZAPATA, Mónica; Aislamiento de Levaduras capaces de producir etanol a partir de macrofitas acuáticas extraídas mecánicamente de la laguna de Fúquene; Universidad Javeriana; Bogotá. P. 11, 39-42.

VILAR BARRIO, José Francisco; GOMEZ FRAILE, Fermin y TEJERO MONZÓN, Miguel. Las Siete Nuevas Herramientas Para La Mejora De La Calidad. FC Editorial, 1997. P. 69-92.

YEPES, Sandra Milena; MONTOYA NARANJO, Lina Johana Montoya; SANCHEZ, Fernando Orozco; Valorización de residuos agroindustriales – frutas – en Medellín y el sur del Valle de Aburrá, Colombia; 2008.

ZILLY, Adriana, et al. Solid-State Bioconversion of Passion Fruit Waste by White-Rot Fungi for Production of Oxidative and Hydrolytic Enzymes. En: FOOD AND BIOPROCESS TECHNOLOGY. 07/01.vol. 5, no. 5, p. 1573-1580.

ANEXO A
DATOS GENERALES DE LA EMPRESA

Tabla 1.1 Porcentaje de desecho de cada una de las frutas.

FRUTA	PORCENTAJE DE DESPERDICIO
CURUBA	25%
DURAZNO	20%
FEIJOA	25%
FRESA	5%
GUANABANA	10%
GUAYABA	25%
LIMON	50%
LULO	25%
MANDARINA	65%
MANGO	35%
MANZANA	25%
MARACUYA	77%
MORA	20%
NARANJA	45%
PAPAYA	25%
PERA	25%
PIÑA	35%
TAMARINDO	10%
TOMATE	25%
UVA	15%

Tabla A.2 Compra en kilogramos de cada una de las materias primas en 2012.

FRUTA	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEPT	OCT	NOV	DIC	TOTAL
ACEROLA PULPA MP					12250						12250		24500
CURUBA	10472						6454						16926
DURAZNO CONCENTR ADO				13335			7602			8588			29525
FEIJOA	3310	382	2168	3836	19488	7113	3823	4116	2455	1417	4769	7526	60403
FRESA	26290			3254	15014	20098	26285	20731	14476	17564	29380	32642	205734
GUANABANA COPOS SEMILLA MP	20641	18253	15600	26925	29470	16816	23468					14319	165492
GUAYABA	7362				13154	40597	18134	32195		4771			116213
LIMON		10622			4082	16655	21440	40533	21218		10702	21419	146671
LIMON CONCENTR ADO										17915,04			17915,04
LULO	4014	400	11430	29368	7557	29431	20408	31595	32512	42327	28552	19362	256956
MANDARINA CONCENTR ADO							2080			5200			7280
MANGO	5038			45211	204872	123127	8344				40477	46786	473855
MANZANA CONCENTR ADO 30/32 °BRIX				4977			8542			5707			19226
MARACUYA	89048	2770		52880	34673	64735	21447	64620	75604	31407	42528	93608	573320
MARACUYA PULPA CON SEMILLA									12000	6000			18000
MORA	21142			17413	33516	5711	25102	48688	20699	2488	21825	28172	224756
NARANJA									8000		5000		13000
NARANJA CONCENTR ADO	18900	25440		18900			21320					23400	107960
PAPAYA		3048	5313		579	6555		3435	5440	879	532	5623	31404
PERA		1430		4528		475	5463			4752			16648

CONCENTRADO													
PIÑA	7995	15920	3054	23637	21533	14843	46747	13758	51532	29457	28992	8344	265812
PIÑA CONCENTRADO									1325				1325
TAMARINDO PULPA MP			4944	9880									14824
TOMATE DE ARBOL					5620	11036	2489	9377	8766	11553	13748		62589
UVA FRUTA	5798	5336	1329	5849	6907		3505	11254	5570	1599	2857	3090	53094
TOTAL	220010	83601	43838	259993	408715	357192	272653	280302	259597	191624,04	241612	304291	2923428,04

Tabla A.3 Compra en kilogramos de cada una de las materias primas en 2013.

FRUTA	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEPT	OCT	NOV	DIC	TOTAL
ACEROLA PULPA MP					12250							12250	24500
BANANO PULPA MP									2070				2070
CURUBA	4137		5629	6486	5060				13126		1859	3592	39889
DURAZNO CONCENTRADO	8552	8591				6664	6410	19992	5721			2143	58073
FEIJOA	5552	5366	7370	8446	12784	3399	1288	1725	1632	710	1933	14082	64287
FRESA		1190	736	18462		22239	16882	32969	5711	25967		35297	159453
GUANABANA COPOS SEMILLA MP	37453	50085	1776	26191	9704	53183	30803	20473	16009	17749	10204		273630
GUAYABA		1683			9965	22991	18533		9222	16938	9389		88721
GUAYABA PULPA MP									3080				3080
LIMON		10365				10292	10805	46966	14283				92711
LULO	7622			1844	7919	3823	27577	12071	40843	24779	10791	24901	162170
MANDARINA ZUMO MP				1158		2508	2694		3868			4872,2	15100,2
MANGO	4185			67770	78633	100333	97986	34103	8395		54966	43685	490056
MANZANA CONCENTRADO 30/32 °BRIX	5743	5712				7613	5705		6687			5969	37429
MARACUYA	208106	31140		6313	35584	24374	16682	71079	51011	14382	148795	41787	649253
MARACUYA PULPA CON SEMILLA	7309												7309
MORA	32905			2998	12678	29408	37090	62259	35472	10590	7105	40244	270749
MORA PULPA MP					10000								10000
NARANJA CONCENTRADO			23355					23400		46800			93555

NARANJA ZUMO MP	3052			2318	5955	3102	8182		20481	4880	4052	5046	57068
PAPAYA			2123	6017		2508	4738	5687	4135	5842	4039		35089
PERA CONCENTRADO	4758	4771				4759	7138		6646			10954	39026
PIÑA		19565	4137	6676	7866	12678	17552		28872	9333	3920		110599
PIÑA CONCENTRADO	530	16695											17225
TAMARINDO PULPA MP									1572	8302			9874
TOMATE DE ARBOL			4534	9304		8440	11460	9793	7168	6381	14195	7474	78749
UVA FRUTA	9936	6251		3146	6250	11759	5350	11293	16323		10864	15006	96178
TOTAL	339840	161414	49660	167129	214648	330073	326875	351810	302327	192653	282112	267302,2	2985843,2

Tabla A.4 Compra en kilogramos de cada una de las materias primas en 2014.

FRUTA	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEPT	OCT	NOV	DIC	TOTAL
ACEROLA PULPA MP	0	0	0	0	0	24500	0	0	0	0	0	0	24500
CURUBA	26211	5890	0	0	0	0	12497	0	0	0	5063	13516	63177
DURAZNO CONCENTRADO	19034	0	0	0	0	0	0	0	18592	0	0		37626
FEIJOA	6389	0	4052	6239	14828	9010	9501	1539	0	2112	9592	18741	82003
FRESA	45161	0	0	0	8816	17911	14204	3704	16811	26071	22846	36452	191976
GUANABANA COPOS SEMILLA MP	10618	0	22722	16870	28894	41127	35646	35147	0	0	10268	12606	213898
GUAYABA	4974	3960	24498	42599	0	0	26538	15056	0	0	17170	7351	142146
GULUPA	0	398	2915	0	4402	0	3910	4276	0	0	0	0	15901
LIMON	23078	0	0	0	15627	26986	7040	11708	0	6161	22495	16260	129355
LIMON CONCENTRADO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7356	7356
LULO	21100	0	9374	14957	19787	21238	27580	13753	38710	14390	38774	52533	272196
LULO PULPA MP	0	10000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10000
MANDARINA	8148	0	1934	3474	6055	6728	11354	1971	0	0	0	4780	44444
MANDARINA CONCENTRADO	0	0	0	0	260	0	0	0	0	0	0	0	260
MANGO	0	0	0	216672	273062	104270	7175	4874	4673	0	26824	28467	666017
MANZANA CONCENTRADO 30/32 °BRIX	0	13598	0	0	0	9519	0	0	9551	0	0	0	32668
MARACUYA	67030	22405	4488	32783	210235	0	26646	7241	39372	59872	87481	218469	776022
MARACUYA PULPA CON SEMILLA	10731	0	4498	0	0	5325	0	0	0	0	0	0	20554
MORA	16561	0	26019	23225	8056	35400	36534	22238	52528	18763	9548	41374	290246
NARANJA	16966	0	9149	26483	18830	9571	5112	3918	8377	12045	0	16314	126765

NARANJA CONCENTRADO	0	23400	0	0	23400	0	0	23400	0	0	0	23400	93600
PAPAYA	0	2740	0	7364	5842	4133	3676	3803	0	3044	5404	3124	39130
PERA CONCENTRADO	0	5474	0	0	2380	9554	0	0	9538	0	0	2377	29323
PIÑA	4901	12639	6018	25198	0	16175	0	24951	0	24674	15143	22050	151749
PIÑA CONCENTRADO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15000	15000
TAMARINDO PULPA MP	0	0	0	3797	0	5408	0	0	0	0	0	9505	18710
TOMATE DE ARBOL	18653	3546	0	10074	7794	4304	4866	7864	10249	11308	6000	17997	102655
UVA FRUTA	7711	0	0	6390	5916	0	12347	0	8003	8772	7714	14939	71792
TOTAL	307266	104050	115667	436125	654184	351159	244626	185443	216404	187212	284322	582611	3669069

Tabla A.5 Producción en kilogramos de residuos en 2012.

FRUTA	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEPT	OCT	NOV	DIC	TOTAL
CURUBA	2618	0	0	0	0	0	1613,5	0	0	0	0	0	4231,5
FEIJOA	827,5	95,5	542	959	4872	1778,25	955,75	1029	613,75	354,25	1192,25	1881,5	15100,75
FRESA	1314,5	0	0	162,7	750,7	1004,9	1314,25	1036,55	723,8	878,2	1469	1632,1	10286,7
GUANABANA COPOS SEMILLA MP	2064,1	1825,3	1560	2692,5	2947	1681,6	2346,8	0	0	0	0	1431,9	16549,2
GUAYABA	1840,5	0	0	0	3288,5	10149,25	4533,5	8048,75	0	1192,75	0	0	29053,25
LIMON	0	5311	0	0	2041	8327,5	10720	20266,5	10609	0	5351	10709,5	73335,5
LULO	1003,5	100	2857,5	7342	1889,25	7357,75	5102	7898,75	8128	10581,7	7138	4840,5	64239
MANDARINA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MANGO	1763,3	0	0	15823,8	71705,2	43094,45	2920,4	0	0	0	14166,95	16375,1	165849,2
MARACUYA	68566,9	2132,9	0	40717,6	26698,21	49845,95	16514,19	49757,4	58215,08	24183,3	32746,56	72078,16	441456,4
MORA	4228,4	0	0	3482,6	6703,2	1142,2	5020,4	9737,6	4139,8	497,6	4365	5634,4	44951,2
NARANJA	0	0	0	0	0	0	0	0	3600	0	2250	0	5850
PAPAYA	0	762	1328,2	0	144,75	1638,75	0	858,75	1360	219,75	133	1405,75	7851
PIÑA	2798,25	5572	1068,9	8272,95	7536,55	5195,05	16361,45	4815,3	18036,2	10309,95	10147,2	2920,4	93034,2
TOMATE DE ARBOL	0	0	0	0	1405	2759	622,25	2344,25	2191,5	2888,25	3437	0	15647,25
UVA FRUTA	869,7	800,4	199,35	877,35	1036,05	0	525,75	1688,1	835,5	239,85	428,55	463,5	7964,1
TOTAL	87894,71	16599,1	7556	80330,55	131017,41	133974,65	68550,24	107480,95	108452,63	51345,74	82824,51	119372,81	995399,3

Tabla A.6 Producción en kilogramos de residuos en 2013.

FRUTA	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEPT	OCT	NOV	DIC	TOTAL
CURUBA	1034,25	0	1407,25	1621,5	1265	0	0	0	3281,5	0	464,75	898	9972,25
FEIJOA	1388	1341,5	1842,5	2111,5	3196	849,75	322	431,25	408	177,5	483,25	3520,5	16071,75
FRESA	0	59,5	36,8	923,1	0	1111,95	844,1	1648,45	285,55	1298,35	0	1764,85	7972,65
GUANABANA COPOS SEMILLA MP	3745,3	5008,5	177,6	2619,1	970,4	5318,3	3080,3	2047,3	1600,9	1774,9	1020,4	0	27363
GUAYABA	0	420,75	0	0	2491,25	5747,75	4633,25	0	2305,5	4234,5	2347,25	0	22180,25
LIMON	0	5182,5	0	0	0	5146	5402,5	23483	7141,5	0	0	0	46355,5
LULO	1905,5	0	0	461	1979,75	955,75	6894,25	3017,75	10210,75	6194,75	2697,75	6225,25	40542,5
MANDARINA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MANGO	1464,75	0	0	23719,5	27521,55	35116,55	34295,1	11936,05	2938,25	0	19238,1	15289,75	171519,6
MARACUYA	160241,62	23977,8	0	4861,01	27399,68	18767,98	12845,14	54730,83	39278,47	11074,14	114572,15	32175,99	499924,81
MORA	6581	0	0	599,6	2535,6	5881,6	7418	12451,8	7094,4	2118	1421	8048,8	54149,8
NARANJA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAPAYA	0	0	530,75	1504,25	0	627	1184,5	1421,75	1033,75	1460,5	1009,75	0	8772,25
PIÑA	0	6847,75	1447,95	2336,6	2753,1	4437,3	6143,2	0	10105,2	3266,55	1372	0	38709,65
TOMATE DE ARBOL	0	0	1133,5	2326	0	2110	2865	2448,25	1792	1595,25	3548,75	1868,5	19687,25
UVA FRUTA	1490,4	937,65	0	471,9	937,5	1763,85	802,5	1693,95	2448,45	0	1629,6	2250,9	14426,7
TOTAL	177850,82	43775,95	6576,35	43555,06	71049,8	87833,7	86729,8	115310,3	89924,22	33194,4	149804,75	72042,54	977647,9

Tabla A.7 Producción en kilogramos de residuos en 2014.

FRUTA	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEPT	OCT	NOV	DIC	TOTAL
CURUBA	6552,75	1472,5	0	0	0	0	3124,25	0	0	0	1265,75	3379	15794,25
FEIJOA	1597,25	0	1013	1559,75	3707	2252,5	2375,25	384,75	0	528	2398	4685,25	20500,75
FRESA	2258,05	0	0	0	440,8	895,55	710,2	185,2	840,55	1303,55	1142,3	1822,6	9598,8
GUANABANA COPOS SEMILLA MP	1061,8	0	2272,2	1687	2889,4	4112,7	3564,6	3514,7	0	0	1026,8	1260,6	21389,8
GUAYABA	1243,5	990	6124,5	10649,75	0	0	6634,5	3764	0	0	4292,5	1837,75	35536,5
LIMON	11539	0	0	0	7813,5	13493	3520	5854	0	3080,5	11247,5	8130	64677,5
LULO	5275	0	2343,5	3739,25	4946,75	5309,5	6895	3438,25	9677,5	3597,5	9693,5	13133,25	68049
MANDARINA	5296,2	0	1257,1	2258,1	3935,75	4373,2	7380,1	1281,15	0	0	0	3107	28888,6
MANGO	0	0	0	75835,2	95571,7	36494,5	2511,25	1705,9	1635,55	0	9388,4	9963,45	233105,95
MARACUYA	51613,1	17251,85	3455,76	25242,91	161880,95	0	20517,42	5575,57	30316,44	46101,44	67360,37	168221,13	597536,94
MORA	3312,2	0	5203,8	4645	1611,2	7080	7306,8	4447,6	10505,6	3752,6	1909,6	8274,8	58049,2
NARANJA	7634,7	0	4117,05	11917,35	8473,5	4306,95	2300,4	1763,1	3769,65	5420,25	0	7341,3	57044,25
PAPAYA	0	685	0	1841	1460,5	1033,25	919	950,75	0	761	1351	781	9782,5
PIÑA	1715,35	4423,65	2106,3	8819,3	0	5661,25	0	8732,85	0	8635,9	5300,05	7717,5	53112,15
TOMATE DE ARBOL	4663,25	886,5	0	2518,5	1948,5	1076	1216,5	1966	2562,25	2827	1500	4499,25	25663,75
UVA FRUTA	1156,65	0	0	958,5	887,4	0	1852,05	0	1200,45	1315,8	1157,1	2240,85	10768,8
TOTAL	104918,8	25709,5	27893,21	151671,61	295566,95	86088,4	70827,32	43563,82	60507,99	77323,54	119032,87	246394,73	1309498,74

Tabla A.8 Caracterización de los residuos de las seis frutas escogidas para la segunda matriz de selección

Residuos	Azúcar	Sólidos Solubles	pH
Limón⁷²	6.5 g	66.79 g	-----
Lulo	-----	-----	-----
Mango⁷³	5.7 g	30,92 g	-----
Maracuya⁷⁴	11.3 g	28,3 g	2.86
Mora	-----	-----	-----
Piña⁷⁵	7.8 g	47.53 g	-----

⁷² MAMMA, Diomi; CHRISTAKOPOULOS Paul; Biotransformation of Citrus By-Products into Value Added Products; 2013.

⁷³ YEPES, Sandra Milena; MONTOYA NARANJO, Lina Johana Montoya; SANCHEZ, Fernando Orozco; Valorización de residuos agroindustriales – frutas – en Medellín y el sur del Valle de Aburrá, Colombia; 2008.

⁷⁴ KULKARNI S.G., VIJAYANAND P.; Effect of extraction conditions on the quality characteristics of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* L.); 2010.

⁷⁵ OLORUNNISOLA, Kola; PARVEEN, Jammal; Utilization of fruit peels as carbon source for white rot fungi biomass production under submerged state bioconversion; 2015.

ANEXO B FICHA TÉCNICA MULTIFECT B.

Genecor Beta-Glucanase

DESCRIPTION

Multifect® B enzyme is a cellulase/β-glucanase complex derived from a selected strain of *Trichoderma reesei*. Typical application areas for Multifect® B enzyme include raw material processing, viscosity reduction and fermentation media hydrolysis with plant-derived cellulosic substrates. The Multifect® B enzyme is also effective in pulp and paper applications including fiber modification. The modification of fibers by the Multifect® B enzyme results in enhanced water removal from paper pulp processing. If refining follows the treatment, increased fibrillation can be observed due to enhanced beatability/refining of the fibers.

PERFORMANCE BENEFITS

The Multifect® B enzyme offers the following process benefits in pulp processing applications:

- Enhances efficiency of water removal (i.e. drainage of paper pulp finish)
- Reduces the energy requirement when used for refining chemical fibers
- Improves ink removal while enhancing brightness in the waste paper recycling process
- Results in softening of the fiber walls through hydrolysis and increases fibrillation

PRODUCT CHARACTERISTICS

Activity: 2,250 BGLU/ml (minimum)(*)

Appearance: Amber liquid

Grade: Food grade, Kosher

pH: 4.9 - 5.3

Specific Gravity: 1.2 - 1.3 g/ml

(*)The activity of Multifect® B enzyme is expressed in beta-glucanase units (BGLU) per milliliter. The BGL Unit quantifies the activity of hydrolysis of barley β-glucan under assay conditions. The assay method is available upon request.

pH DEPENDENCY

The pH range for the enzyme activity of Multifect® B enzyme is approximately 4.0 to 6.0, with an optimum performance at pH 5.0. The exact pH optimum will depend on process variables, including temperature, time, substrate concentration and substrate composition.

TEMPERATURE DEPENDENCY

The activity of Multifect® B enzyme is effective in the temperature range of 40°C (105°F) to 60°C (150°F), with an optimum performance at 50°C (120°F). The exact temperature optimum will depend on many process variables, such as pH, time, substrate concentration and substrate composition.

BIOCHEMICAL PARAMETERS

Enzyme type: Cellulase enzyme complex, standardized on β-glucanase

IUB#: 3.2.1.4

APPLICATION RECOMMENDATIONS

Multifect® B enzyme breaks down β-glucans, pentosans and related carbohydrates. Under raw material processing conditions Multifect® B will significantly reduce viscosity and improve processing efficiency.

INACTIVATION

Multifect® B enzyme can be inactivated by holding for 10 minutes at a temperature above 85°C (185°F).

DOSAGE RECOMMENDATIONS

In raw material processing applications, a typical Multifect® B enzyme dosage rate is 0.05 to 0.10% weight/weight substrate solids. In pulp and paper applications a typical Multifect® B enzyme dosage rate of 0.5 to 2.0 kg per ton of pulp is recommended as a starting point for determining the optimum performance.



ANEXO C

DETERMINACIÓN DE AZÚCARES POR EL MÉTODO DNS.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO.

El reactivo DNS se prepara disolviendo 0,8 g de NaOH en 25mL agua destilada, luego se añaden 15 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado hasta que se disuelve todo se cubre con papel aluminio el vaso de precipitado donde se está haciendo la mezcla y se agregan y 0,5 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico lentamente, se completa con 50mL de agua destilada⁷⁶.

CURVA DE CALIBRACIÓN.

Para realizar el método DNS el primer paso es preparar una solución de glucosa de 1g/L, es decir se disuelve 0,1g de glucosa en 100mL solución tampón. A partir de ésta solución patrón se preparan varias muestras diluyéndolas con cantidades diferentes de agua destilada en tubos de ensayo, a cada uno se le agrega 0,25mL de reactivo DNS se calientan para que se desarrolle la reacción de reducción e inmediatamente se dejan enfriar, se hace la lectura en el espectrofotómetro para calcular la absorbancia a una longitud de onda de 540nm. El blanco utilizado consiste en una solución de 0,25mL agua destilada y 0,25mL de reactivo DNS, el cual es calentado y luego enfriado adicionándole 2mL de agua destilada. Luego de leer la absorbancia de todas las muestras se traza la curva de calibración (Concentración de Glucosa g/L vs Absorbancia) y se obtiene la ecuación de la recta⁷⁷.

DETERMINACIÓN DE AZÚCARES.

Se toma cierta cantidad de la muestra a evaluar, de esta se desconoce la concentración de azúcar, se hace el mismo procedimiento 0,25 mL de la muestra, 0,25mL de reactivo DNS se calienta hasta la reducción, se enfría y se lleva al espectrofotómetro, se lee la absorbancia y la concentración de glucosa presente en la muestra es determinada reemplazando los valores en la ecuación de la recta obtenida anteriormente, la lectura se hace igualmente a 540nm de longitud de onda y el blanco es igual al utilizado en la curva de calibración.

⁷⁶ ÁVILA Núñez, Ramona; RIVAS Pérez Bernarda; HERNÁNDEZ Motzezak, Rómulo; CHIRINOS Marluy; Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en Agave cocui Trelease; En: Multiciencias, vol. 12, núm. 2, abril-junio, 2012; p.131.

⁷⁷ VANEGAS, Melissa; ZAPATA, Mónica; Aislamiento de Levaduras capaces de producir etanol a partir de macrofitas acuáticas extraídas mecánicamente de la laguna de Fúquene; Universidad Javeriana; Bogotá. P. 39-40.

ANEXO D DETERMINACIÓN DEL ETANOL POR EL MÉTODO DEL DICROMATO DE POTASIO.

Preparación de los Reactivos⁷⁸.

- **Solución Oxidante:** Se hacen reaccionar 4,165g de Dicromato de Potasio (97%) con 250mL de Ácido Sulfúrico (96%), en un balón aforado de 1000 mL y completar con agua destilada hasta el aforo.
- **Solución de Carbonato de Potasio:** Disolver 20g de Carbonato de potasio (98%) en un balón aforado de 100mL, llenando hasta el aforo.
- **Solución Final:** Se miden 4mL de la solución oxidante en un tubo de ensayo y se le va agregando 2mL de la solución de carbonato de potasio gota a gota, hasta finalizar el burbujeo.

Curva de Calibración.

Para realizar la curva de calibración se toman muestras de etanol a diferentes concentraciones (detalladas en la tabla A9), de cada una se toman 2mL y se hacen reaccionar con 2mL de la solución final se llevan a centrifugación, se calienta mediante un baño a 80°C durante 30 minutos, se deja enfriar a temperatura ambiente y se lee la absorbancia de cada uno a una longitud de onda de 440nm.

Tabla A9. Concentraciones de muestras para la curva de calibración.

Concentración g/L	Etanol (mL)	Agua Destilada (mL)
Blanco (Ácido Sulfúrico a 6N)	-----	-----
2,5	0,05	19,95
5	0,1	19,9
10	0,2	19,8
15	0,3	19,7
20	0,4	19,6
30	0,5	19,5

⁷⁸ Ibid., p. 11, 41-42.

ANEXO E

CERTIFICADO DE ANÁLISIS DEL MEDIO DE CULTIVO



Scharlab S.L.
 Tel. int.: +34 93 745 64 00
 Email: scharlab@scharlab.com

CERTIFICATE OF ANALYSIS

IDENTIFICATION

Product: SABOURAUD BROTH
Code: 02-165 **Production date:** 12/2014
Batch no.: 104404 **Expiration date:** 11/2019
Int. Batch: 104404

DEHYDRATED MEDIUM

Colour: Yellow **Remarks:**
Appearance: Homogeneous hygroscopic powder All raw materials of animal origin, which have been used to manufacture the culture media, come from animals free of BSE.
Granulometry: 0,6 - 0,45 mm
Additives: None

PREPARED MEDIUM

Directions: 30 g /L **Remarks:**
Clarity/Colour: Transparent (O.K.) -
Deposit: Correct (None)
Gel strength: Not applicable
pH after sterilization: 5,79 at 25 °C
Sterilization: Autoclaving at 121°C for 15 minutes

GROWTH CONTROL

Incubation temperature: 20-25 °C ± 2,0 **Incubation time:** 48h-5d
Remarks: 10-100 CFU (according to Eur. Pharm. harm. and ISO/TR 11133-1:2009 & ISO/TS 11133-2:2003)

Microorganism	Growth - Inoculum (CFU)	Remarks
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Good - 136	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	Good - 88	-
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	Good - 75	5 days, black sporulation
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Good - 103	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	Good - 39	-

Photos are not batch-specific.
 This certificate does not release the user from the reception control upon receipt of the good.
 You can get a copy of any of our COA from our website: www.scharlab.com

This certificate is an electronic copy of the certificate available in our laboratory and does not require signature
 Quality release date: 12/12/2014

ANEXO F
RECUENTOS DEL CRECIMIENTO DE LA LEVADURA

Tabla F1. Conteos de las células en cada una de los fermentados.

Tiempo (hora)	Limón-Lulo	Limón	Mora	Maracuyá	Mora-Mango	Maracuyá-Lulo	Maracuyá-Limón	Mango	Lulo
0	5	6	18	25	6	20	24	54	38
12	25	51	48	63	69	36	30	66	87
24	35	58	60	36	23	41	27	87	44
36	59	37	56	39	25	46	58	94	57
48	54	56	19	23	24	54	34	48	67
60	69	55	66	55	42	58	36	52	65
72	56	38	61	57	41	57	38	49	68
84	36	34	61	53	45				
96	28	41		55					
108	31								

Tabla F2. Concentración de las células en el fermentado de Maracuyá.

Tiempo (hora)	Conteos	Diluciones	Concentración (células/mL)	Log
0	25	0	250000	5,39
12	63	0	630000	5,80
24	36	1	3600000	6,56
36	39	1	3900000	6,59
48	23	2	23000000	7,36
60	55	2	55000000	7,74
72	57	3	570000000	8,76
84	53	3	530000000	8,72
96	55	3	550000000	8,740

Tabla F3. Concentración de las células en el fermentado de Limón-Lulo.

Tiempo (hora)	Conteos	Diluciones	Concentración (células/mL)	Log
0	5	0	50000	4,70
12	25	0	250000	5,40
24	35	0	350000	5,54
36	59	1	5900000	6,77
48	54	1	5400000	6,73
60	69	1	6900000	6,84
72	56	2	56000000	7,75
84	36	3	360000000	8,56
96	34	3	340000000	8,53
108	31	3	310000000	8,49

Tabla F4. Concentración de las células en el fermentado de Lulo.

Tiempo (hora)	Conteos	Diluciones	Concentración (células/mL)	Log
0	38	0	380000	5,58
12	87	0	870000	5,94
24	44	1	4400000	6,64
36	57	1	5700000	6,76
48	67	2	67000000	7,83
60	65	2	65000000	7,81
72	68	2	68000000	7,83

Tabla F5. Concentración de las células en el fermentado Mora-Mango.

Tiempo (hora)	Conteos	Diluciones	Concentración (células/mL)	Log
0	6	0	60000	4,78
12	69	1	6900000	6,84
24	23	1	2300000	6,36
36	25	2	25000000	7,40
48	24	2	24000000	7,38
60	42	3	420000000	8,62
72	41	3	410000000	8,61
84	45	3	450000000	8,65

Tabla F6. Concentración de las células en el fermentado de Limón.

Tiempo (hora)	Conteos	Diluciones	Concentración (células/mL)	Log
0	6	0	60000	4,78
12	51	1	5100000	6,71
24	58	1	5800000	6,76
36	37	2	37000000	7,57
48	56	2	56000000	7,75
60	55	2	55000000	7,74
72	38	3	380000000	8,58
84	40	3	400000000	8,60
96	41	3	410000000	8,61

Tabla F7. Concentración de las células en el fermentado de Maracuyá-Lulo.

Tiempo (hora)	Conteos	Diluciones	Concentración (células/mL)	Log
0	20	0	200000	5,30
12	36	0	360000	5,56
24	41	1	4100000	6,61
36	46	1	4600000	6,66
48	54	2	54000000	7,73
60	58	2	58000000	7,76
72	57	2	57000000	7,76

Tabla F8. Concentración de las células en el fermentado de Mora.

Tiempo (hora)	Conteos	Diluciones	Concentración (células/mL)	Log
0	18	0	180000	5,26
12	48	0	480000	5,68
24	60	0	600000	5,78
36	56	1	5600000	6,75
48	19	2	19000000	7,28
60	66	2	66000000	7,82
72	61	2	61000000	7,79
84	61	2	61000000	7,79

Tabla F9. Concentración de las células en el fermentado de Maracuya-Limón.

Tiempo (hora)	Conteos	Diluciones	Concentración (células/mL)	Log
0	24	0	240000	5,38
12	30	0	300000	5,48
24	27	1	2700000	6,43
36	58	1	5800000	6,76
48	34	2	34000000	7,53
60	36	2	36000000	7,56
72	38	2	38000000	7,58

Tabla E10. Concentración de las células en el fermentado de Mango.

Tiempo (hora)	Conteos	Diluciones	Concentración (células/mL)	Log
0	54	0	540000	5,73
12	66	0	660000	5,82
24	87	1	8700000	6,94
36	94	1	9400000	6,97
48	48	2	48000000	7,68
60	52	2	52000000	7,72
72	49	2	49000000	7,69

ANEXO G COTIZACIÓN DE LOS EQUIPOS UTILIZADOS A NIVEL PLANTA PILOTO.



Mantenimiento Preventivo y Correctivo de Equipos Médicos e Industriales
Compra y Venta de Equipos, Accesorios y Repuestos

COTIZACION No.00-96

Fecha de ~~09~~ Mayo 16 de 2016

Señorita
JUDITH SANTOS AGUILAR

ASUNTO: COTIZACION PLANTA BIOETANOL MEDIANA ESCALA

Es para nosotros un placer brindarle nuestros servicios para la realización de sus proyectos


A continuación, encontrara con detalle la descripción de los equipos necesarios para el montaje de su Proyecto, **PLANTA DE BIOETANOL A BASE DE RESIDUOS FRUTALES**, con el cual sabemos que está aportando al desarrollo de nuestra sociedad y a la conservación de nuestros recursos naturales.

Quedamos a su entera disposición

132

Telefono: (5) 584 2611 - Cel: 311 431 1633 - E-mail: edwrin21@hotmail.com - Valledupar - Cesar

RELACION DE EQUIPOS

ITEM	DETALLE	MARCA	MODELO	CLASIFICACION	CANTIDAD	VALOR UNITARIO	IVA	VALOR TOTAL
1	TRITURADOR DE FRUTA	TRADEMARK	PS-2.5 SERIES	EQUIPO INDUSTRIAL	1	\$ 2,670,000	16%	\$ 2,670,000
	IMAGEN							
	ESPECIFICACIONES	<p style="text-align: center;"> <small> Información Básica No. de Modelo: PS-2.5 Series Información Adicional Trademark: SAIMEI Backing-Export Standard Packages Standard: CE Certificate/ ISO9000: 9001 Origin: Jiangsu Bozhou, China Ho Code: 24 2111090 Production Capacity: 200 bottles/ hour to 24000 bottles Per Hour Descripción de Producto Triturador de la legumbre de fruta Se utiliza principalmente en la fractura de la manzana, melocotón, pera y así sucesivamente. 1/3 de la capacidad de producción Velocidad de torneado de 750 r/min Kilovatio de la potencia 2.2 Dimensión total (milímetros) 1050× 650× 1250 Peso 350 </small> </p>						

ITEM	DETALLE	MARCA	MODELO	CLASIFICACION	CANTIDAD	VALOR UNITARIO	IVA	VALOR TOTAL
	BANDA TRANSPORTADORA	CITALSA	9401386	EQUIPO INDUSTRIAL	4	\$ 3,500,000	16%	\$ 14,000,000
	IMAGEN							
		<p>Dimensiones: 1900 largo x 600 ancho útil. Altura acorde a equipos referenciados. Molino CPG 400 y tornillo transportador CSC 420. <u>Cozzini</u>. Contará con un ángulo de trabajo de 16°- 18° aproximadamente con la horizontal. No se tiene conocimiento sobre el máximo de inclinación con que se puede transportar el producto en cuestión. (se debe verificar). Producción: Velocidad ajustable por variador de velocidad según requerimiento. Características: Chasis: fabricado en tubo de 25x50x1.6mm con separadores horizontales en platina de 3/8x30mm cada 500mm aprox y verticalmente con tubos de 25x50 cada 600mmm aprox. Patas: fabricadas en tubo cuadrado de 50 x 50mm y atornilladas al chasis con ruedas giratorias de 6" montadas en tornillos niveladores hasta una altura de 50mm. Guías de desgaste: Fabricadas en polietileno de ultra alta de 25x25mm apoyadas simplemente sobre las platinas de 3/8 en unas cavidades maquinadas en ambos elementos.</p>						

ITEM	DETALLE	MARCA	MODEL O	CLASIFICACION	CANTIDAD	VALOR UNITARIO	IVA	VALOR TOTAL
3	LAVADORA DE FRUTAS	MAXIA	500 KG	EQUIPO INDUSTRIAL	1	\$ 7,800,000	16 %	\$ 7,800,000
	IMAGEN							
	ESPECIFICACIONES	<p> Lavado y desinfectado de frutas, vegetales y cualquier otro producto flotante. Opción de agregar banda transportadora desde la parte inferior para retirar productos no flotantes. Con recirculación de agua por medio de espumas, temperatura del agua programable con visualizador. Descarga por medio de banda transportadora con valvulas de ajuste de flujo de aire para permitir el avance del producto. De fácil operación con banda transportadora plastica grado alimenticio. Construcción en acero inoxidable 304. Características técnicas: Capacidad: 500 a 1.500 kg/ hr. Bomba de aire de 2 hp. bomba agua de 2 hp. Motor de transportador: 3/4 hp, Resistencia sumergible 12.000 Watts. Características eléctricas: 220V, 3 fases. Dimensiones de tanque de lavado : 2050 x900 x 1340mm </p>						

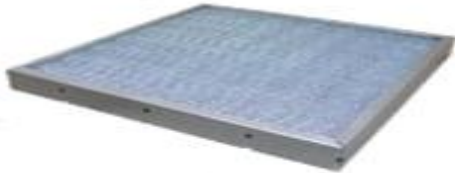
ITEM	DETALLE	MARCA	MODELO	CLASIFICACION	CANTIDAD	VALOR UNITARIO	IVA	VALOR TOTAL
b	LAVADORA DE FRUTAS	MAXIA	500 KG	EQUIPO INDUSTRIAL	1	\$ 7,100,000	16%	\$ 7,100,000
	IMAGEN							
	ESPECIFICACIONES	<p> Lavado y desinfectado de frutas, vegetales y cualquier otro producto flotante. Opción de agregar banda transportadora desde la parte inferior para retirar productos no flotantes. Con recirculación de agua por medio de <u>espresas</u>. Dosificador <u>Hidroxido de sodio</u> Descarga por medio de banda transportadora con válvulas de ajuste de flujo de aire para permitir el avance del producto. De fácil operación con banda transportadora plástica grado alimenticio Construcción en acero inoxidable 304 Características Técnicas Capacidad: 500 a 1,500 kg/h. Bomba de aire de 2 hp, bomba agua de 2 hp. Motor de transportador: ¼ hp, Bomba de engranaje externo Características eléctricas: 220V, 3 fases Dimensiones de tanque de lavado: 2050 x900 x 1340mm </p>						



ITEM	DETALLE	MARCA	MODELO	CLASIFICACION	CANTIDAD	VALOR UNITARIO	IVA	VALOR TOTAL
	LAVADORA DE FRUTAS	MAXIA	500 KG	EQUIPO INDUSTRIAL	1	\$ 6,400,000	16%	\$ 6,400,000
	IMAGEN							
	ESPECIFICACIONES	<p> Lavado y desinfectado de frutas, vegetales y cualquier otro producto flotante. Opción de agregar banda transportadora desde la parte inferior para retirar productos no flotantes. Con recirculación de agua por medio de <u>espumas</u>. Descarga por medio de banda transportadora con válvulas de ajuste de flujo de aire para permitir el avance del producto. De fácil operación con banda transportadora plástica grado alimenticio. Construcción en acero inoxidable 304. Características Técnicas Capacidad: 500 a 1,500 kg/ hr. Bomba de aire de 2 hp, bomba agua de 2 hp Motor de transportador: ½ hp, Características eléctricas: 220V, 3 fases Dimensiones de tanque de lavado : 2050 x900 x 1340mm. </p>						


ITEM	DETALLE	MARCA	MODELO	CLASIFICACION	CANTIDAD	VALOR UNITARIO	IVA	VALOR TOTAL
	REACTOR DE HIDROLISIS	MAKWELL	MWK 500L SPC	EQUIPO INDUSTRIAL	1	\$ 12,650,000	16%	\$ 12,650,000
	IMAGEN							
10	ESPECIFICACIONES	<p> Modelo--MWK 500L Volumen del diseño (L) 680 Volumen de funcionamiento (L) 500 Mezclador del raspador potencia (kilovatios) 2.2 Mezclador del raspador Velocidad (RPM) 50-80 Dispensor de alta velocidad potencia (kilovatios) 1.1 Dispensor de alta velocidad <u>Velocidad</u> (RPM) 0-960 Homogeneizador potencia (kilovatios) 4 Homogeneizador velocidad (RPM) 0-2900 Dosificador de Multifect B Dosificador de solución Buffer Compuerta superior de llenado con 2 brazos de cierre Válvula y tubería de 3" para descarga de mezcla Resistencia interna sumergible de 9000 watts Control de temperatura con visualizador Visualizador de PH Homogeneizador de 3 aspas en acero inoxidable con giro invertido </p>						

ITEM	DETALLE	MARCA	MODELO	CLASIFICACION	CANTIDAD	VALOR UNITARIO	IVA	VALOR TOTAL
11	BOMBA PARA SOLIDOS	LITTLE GIANT	18S-CIM	EQUIPO INDUSTRIAL	1	\$ 1,470,000	16%	\$ 1,470,000
	IMAGEN							
	ESPECIFICACIONES	<p>Conexión desde reactor de hidrolisis para transportar mezcla hacia módulo de filtrado</p> <p>Especificaciones: 18S-CIM. 160 GPM. 1.5 HP. 230 Volts. 3 Fases. 64 Pies. 27.7 PSI. Descarga 3" F</p> <p>Características: 1-1/2 HP motor con protección por sobrecarga. Diseñada para trabajo continuo. Impulsor vortex de bronce Rodamientos de bolas superiores e inferiores</p>						

ITEM	DETALLE	MARCA	MODELO	CLASIFICACION	CANT.	VALOR UNITARIO	IVA	VALOR TOTAL
12	MODULO DE FILTROS	N/P	N/P	EQUIPO INDUSTRIAL	1	\$1.360,000	16%	\$ 1,360,000
	IMAGEN							
	ESPECIFICACIONES	<p>Modulo vertical de filtros para mezcla hidrolizada Filtro con malla en acero inoxidable con apertura de 2 mm Filtro con malla en acero inoxidable con apertura de 1 mm Filtro con malla en acero inoxidable con apertura de 0,5 mm Tanque de reserva de líquidos en la parte inferior del modulo</p>						

ITEM	DETALLE	MARCA	MODELO	CLASIFICACION	CANTIDAD	VALOR UNITARIO	IVA	VALOR TOTAL
13	BOMBA HIDRAULICA	PEDROLLO	AL-RED 135m	EQUIPO INDUSTRIAL	2	\$ 750,000	16%	\$ 1,500,000
	IMAGEN							
	ESPECIFICACION	<p> Usos: abastecimiento de agua, sistemas de lavado, sistemas de tratamiento de agua, irrigacion de agua, sistemas de lavado, sistemas de tratamiento de agua, irrigacion Tipologia: superficie Familia: centrifugas Campo de prestaciones: Caudal hasta 180 l/min (10,8 m³/h) Altura manometrica hasta 32 m Limites de empleo: temperatura del liquido de -10 °C hasta +90 °C temperatura ambiente de -10 °C hasta +40 °C Altura de aspiracion manometrica hasta 7 m Presion max. en el cuerpo de la bomba 4 bar Funcionamiento continuo S1 </p>						

ITEM	DETALLE	MARCA	MODELO	CLASIFICACION	CANTIDAD	VALOR UNITARIO	IVA	VALOR TOTAL
14	TANQUE DE FERMENTACION	N/P	500 L	EQUIPO INDUSTRIAL	1	\$3,900,000	16%	\$ 3,900,000
	IMAGEN							
	ESPECIFICACIONES	Tanque de fermentación en acero inoxidable de 500 litros Tres capas de acero inoxidable Visualizador de temperatura Visualización de nivel de líquidos Entrada superior de líquido Salida inferior de líquido						

ITEM	DETALLE	MARCA	MODELO	CLASIFICACION	CANTIDAD	VALOR UNITARIO	IVA	VALOR TOTAL
16	Columna de destilación	N/P	N/P	EQUIPO INDUSTRIAL	1	\$ 6,750,000	16%	\$ 6,750,000
	IMAGEN							
	ESPECIFICACIONES	<p>Columna de destilacion de 250 litros en acero inoxidable renovable con resistencia sumergible de 74 watts seccion de despolvamiento seccion de material seccion de enriquecimiento Condensador or tanque de refujo de 10 litros</p>						

ITEM	DETALLE	MARCA	MODELO	CLASIFICACION	CANTIDAD	VALOR UNITARIO	IVA	VALOR TOTAL
17	TANQUE ALMACENAMIENTO	N/P	500 L	EQUIPO INDUSTRIAL	1	\$ 4.800.000	16%	\$ 4.800.000
	IMAGEN							
	ESPECIFICACIONES	<p> Tanque en acero inoxidable triple capa de 500 litros Apertura rápida boca. Varios tipos de CIP limpiadores. Sanitaria campana de ventilación para defenderse vuela insectos. Patas desmontables, con ruedas. Tubos de alimentación desmontable. Termómetro (de acuerdo a los requerimientos del cliente). Escalera (según las necesidades del cliente). Paddle licuadora. Medidor de nivel y controlador de nivel (de acuerdo a los requerimientos del cliente). Anti-vortex placa. </p>						

ITEM	DETALLE	MARCA	MODELO	CLASIFICACION	CANTIDAD	VALOR UNITARIO	IVA	VALOR TOTAL
18	SISTEMA DE INTERCONEXION	N/P	N/P	N/P	1	\$ 4.200.000	16%	\$ 4.200.000
	ESPECIFICACIONES	<p style="text-align: center;"> Tuberías Uniones Codos Válvulas manuales para limpieza Conexiones proyectadas para 50 metros cuadrados de área Nota: Si desea realizar la instalación en un área mayor estará sujeta a previa verificación por personal de instalación </p>						
ITEM	DETALLE	MARCA	MODELO	CLASIFICACION	CANTIDAD	VALOR UNITARIO	IVA	VALOR TOTAL
19	AUTOMATIZACION	N/P	N/P	N/P	1	\$ 18.000.000	16%	\$ 18.000.000
	ESPECIFICACIONES	<ol style="list-style-type: none"> 1. Programación de tiempo de hidrólisis (Reactor) 2. Programación de tiempo de fermentación 3. Ajuste en dosificaciones automáticas 4. Ajuste de temperaturas de trabajo 5. Ajuste de tiempos de lavado 6. Encendido inicial seguido: 7. Triturado de material 8. Transporte a tanque de lavado # 1 9. Lavado en agua a temperatura de $\pm 100^{\circ}\text{C}$ 10. Evacuación de agua y salida de material a banda transportadora 11. Traslado en banda transportadora a tanque de lavado # 2 12. Dosificación de NaOH 13. Lavado por agitación con 3 espas giro invertido 14. Tiempo programado 2 horas 15. Salida a banda transportadora 16. Traslado en banda transportadora a tanque # 3 17. Lavado por aspersión con agua 18. Evacuación de agua y salida a banda transportadora 19. Traslado en banda transportadora a Reactor de hidrólisis (Sellado y activación manual) 20. Dosificación de Multifect B y solución Buffer 21. Agitación de mezcla con 3 espas con giro invertido 22. Calentamiento a $\pm 50^{\circ}\text{C}$ con visualizador de temperatura 23. Programación de tiempo de hidrólisis 24. Salida a módulo de filtrado por bombeo de sólidos 25. Evacuación manual de residuos sólidos en módulo 26. Desplazamiento de líquido por motobomba a tanque de fermentación 27. Programación de tiempo de fermentación 28. Transporte por motobomba de tanque de fermentación a columna de destilación 29. Salida de Bioetanol a tanque de reserva 30. Fin de ciclo (Alarma sonora) 						



Mantenimiento Preventivo y Correctivo de Equipos Medicos e Industriales
Compra y Venta de Equipos, Accesorios y Repuestos

SUBTOTAL	\$ 92,600,000
IVA	\$ 14,816,000
TOTAL	\$ 107,416,000

CONDICIONES COMERCIALES

Tiempo de entrega: Sujetos a importaciones del fabricante
Forma de pago: 50 % anticipado y 50 % después de instalado
Validez de la Oferta: Cuarenta y cinco (45) días

INCLUYE:

Un (1) mantenimiento preventivo durante la garantía del sistema
Los equipos se entregan en el servicio, instalados y con capacitación al personal sobre su uso

GARANTIA: Un año directamente con casa matriz

No aplica por mal uso de los equipos, eventos adversos y fallas eléctricas

Cordialmente,

MARY PORTELA CATAÑO
GERENTE