



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
Facultad de Ingeniería y Ciencias Hídricas
Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química

PROCESOS DE TRATAMIENTO Y VALORIZACIÓN DE EFLUENTES LÍQUIDOS DE LA INDUSTRIA CERVECERA

Lisandro Gabriel Seluy

Tesis remitida al Comité Académico del Doctorado
como parte de los requisitos para la obtención
del grado de
DOCTOR EN INGENIERIA
Mención Ambiental
de la
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
2015

Comisión de Posgrado, Facultad de Ingeniería y Ciencias Hídricas, Ciudad Universitaria, Paraje "El Pozo", S3000, Santa Fe, Argentina.

Agradecimientos

A mi amiga, novia, esposa, pero por sobre todo compañera de la vida, y a nuestra hermosa hija Emma que llego para llenarnos de alegría.

A mis papas y mis suegros, porque siempre estuvieron y siempre están, en esta etapa que tiene sus vaivenes académicos y emocionales.

A mis amigos, por convertir la rutina en momentos especiales.

A mis compañeros del laboratorio, donde tuve la oportunidad de encontrar segundas mamás, y grandes compañeros que no dudaron en dejar sus tareas cuando alguien necesitaba una oreja.

A mi director, no solo por su tarea académica, sino por ser un consejero de vida, del cual aprendí y sigo aprendiendo día a día.

Al Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química, INTEC, y a la Facultad de Ingeniería y Ciencias Hídricas, FICH por permitirme desarrollar mi Tesis en sus instalaciones.

Índice General

<i>Agradecimientos.....</i>	<i>i</i>
<i>Índice General.....</i>	<i>ii</i>
<i>Resumen.....</i>	<i>vii</i>
<i>Palabras clave:</i>	<i>ix</i>
<i>Capítulo 1. Introducción. Aspectos generales.....</i>	<i>1</i>
<i>Reseña histórica de la cerveza</i>	<i>1</i>
<i>Ingredientes</i>	<i>1</i>
<i>Proceso de producción.....</i>	<i>3</i>
<i>Efluentes generados en la industria cervecera.</i>	<i>5</i>
Residuos	6
Aguas residuales.....	6
Otros efluentes.....	9
<i>Valorización de efluentes de la industria cervecera</i>	<i>12</i>
Antecedentes.....	12
Descripción del caso de estudio	15
Procesos propuestos y estudiados en esta Tesis para el tratamiento y valorización del excedente de levaduras y cerveza de descarte.	16
<i>Motivación</i>	<i>22</i>
<i>Estructura de la tesis.....</i>	<i>22</i>
<i>Capítulo 2. Identificación y caracterización de efluentes.</i>	<i>27</i>

Introducción	27
Materiales y métodos	27
Relevamiento de los efluentes provenientes de la industria cervecera.....	27
Caracterización de los efluentes. Determinaciones analíticas	28
Resultados.....	37
Efluentes generados en el sector de fermentación y maduración	37
Efluentes generados en el sector de envasado	40
Efluentes generados en el sector de expedición y descarga	41
Efluentes generados debido a lotes retenidos por políticas de calidad	41
Resumen de los efluentes excedente de levadura y descarte de cerveza generados.....	42
Caracterización de la fracción líquida de los distintos efluentes.....	42
Discusión	45
<i>Capítulo 3: Recuperación de etanol a partir de efluentes de cervecería.</i>	48
Introducción	48
Materiales y métodos	49
Separación de los componentes volátiles por destilación.....	49
Simulación del proceso de recuperación de etanol por destilación.....	50
Determinación de la DQO de la fracción líquida de los efluentes antes y después de la separación del etanol	51
Evaluación económica	51
Resultados.....	53
Separación de los componentes volátiles por destilación.....	53
Simulación del proceso de recuperación de etanol	54
DQO de los efluentes antes y después de la separación del etanol	60

Evaluación económica	60
Conclusiones parciales	62
Capítulo 4: Fermentación alcohólica de los carbohidratos presentes en vinazas de cervecería como proceso alternativo para la reducción de la DQO.....	64
Introducción	64
Materiales y métodos	65
Obtención de la vinaza	65
Caracterización de la vinaza	66
Fermentación alcohólica	66
Hidrólisis de los carbohidratos presentes en la vinaza	72
Efecto del precipitado formado durante la neutralización sobre la fermentación alcohólica posterior.	76
Modelado cinético de la fermentación alcohólica	76
Impacto de la remoción de etanol sobre la DQO de la vinaza.	77
Simulación de la hidrólisis y de la recuperación de etanol de las vinazas fermentadas	77
Evaluación económica	78
Resultados.....	79
Caracterización de la vinaza	79
Hidrólisis ácida de los carbohidratos presentes en la vinaza	80
Efecto de las bases utilizadas en la neutralización sobre la fermentación posterior	91
Efecto de la concentración de azúcares iniciales sobre el rendimiento en etanol	102
Modelado cinético de la fermentación alcohólica.	108
Efecto del precipitado formado en la neutralización sobre la fermentación alcohólica.	111
Simulación de la hidrólisis y de la recuperación de etanol de las vinazas fermentadas	113
Impacto de la remoción de etanol sobre la DQO de la vinaza.	119

Evaluación económica	119
Conclusiones parciales	122
Capítulo 5: Producción de ácido acético a partir de efluentes de cervecería.....	124
Introducción	124
Materiales y métodos	126
Microorganismos y medio de cultivo	126
Efluentes estudiados	127
Fermentación acética	128
Exigencias del Código Alimentario Argentino para el vinagre de cerveza.....	128
Determinaciones analíticas	129
Reactores utilizados.....	132
Evaluación económica	138
Resultados.....	140
Conservación y recuperación de bacterias acéticas	140
Efecto de conservantes presentes en los efluentes	141
Producción de (vinagre de cerveza) a partir de efluentes de cervecería	152
Reactor piloto	164
Evaluación económica	171
Conclusiones parciales	173
Capítulo 6: Proceso integrado para el tratamiento de efluentes de la industria	
cervecera.	174
Capítulo 7: Conclusiones generales y trabajos futuros.....	183
Capítulo 8: Bibliografía	186

<i>ANEXO I: Especificaciones del Código Alimentario Argentino para el Etanol.....</i>	<i>195</i>
<i>ANEXO II: Manual Sensor Fígaro TGS 2620</i>	<i>199</i>
<i>ANEXO III: Exigencias del Código Alimentario Argentino para vinagres.</i>	<i>201</i>

Resumen

En la industria alimenticia, el sector cervecero ocupa una posición central, con una producción mundial superior a los 1500 millones de hL por año, siendo la cerveza la quinta bebida más consumida.

El proceso de producción de cerveza se divide principalmente en 3 etapas, en la primera el almidón contenido en el grano de cebada (u otros como el arroz, trigo, etc.) es convertido en azúcares fermentables obteniendo un líquido azucarado denominado mosto. En la segunda etapa, el mosto es fermentado por levaduras para convertir los azúcares a etanol y otros compuestos minoritarios, obteniendo la cerveza y en la tercera, la cerveza obtenida es clarificada, filtrada y envasada.

Los principales efluentes generados durante todas las etapas del proceso consisten en el agua utilizada para el lavado de tanques, botellas, máquinas y pisos, y se generan de 6 a 8 hL de efluentes por cada hL de cerveza envasada, con una Demanda Química de Oxígeno (DQO) de 2000-6000 mgO₂/L. Los procesos de tratamiento de éstas corrientes se han abordado intensamente en la literatura, siendo los más relevantes, la combinación de sistemas anaeróbicos, usualmente reactores de manto de lodos de flujo ascendente (UASB), y/o aeróbicos, como plantas de "Barros Activados" o secuencia de reactores batch. Hay estudios que señalan esta combinación como la mejor alternativa para este tipo de efluentes, permitiendo alcanzar los estándares de volcado establecidos por las legislaciones, con remociones de DQO superiores al 80%.

Sin embargo, ciertos subproductos como el bagazo, el excedente de levadura, la tierra de diatomeas usada, los turbios (sólidos retenidos en la filtración del mosto) y las etiquetas desechadas, generan grandes inconvenientes cuando se mezclan con la corriente principal de efluentes, tornando variable la eficiencia de estos procesos.

El bagazo y los turbios, normalmente son mezclados y vendidos como alimento para ganado, o utilizados como materia prima en otros procesos productivos por su contenido de xilosa. La tierra de diatomeas agotada, puede ser regenerada, pero normalmente es desechada, pagando un costo por su disposición final.

El excedente de levadura consiste en una suspensión de levaduras en cerveza en distintos estadios de fermentación, con una concentración de sólidos cercana al 10% m/m. Su volumen puede alcanzar de un 1-3% del volumen de cerveza producida y es vendida a la industria de alimentación animal en la mayoría de las cervecías. No obstante, su utilización es objeto de intensa investigación a escala laboratorio para obtener productos con valor agregado. A modo de ejemplo podemos citar su uso para la producción de oligosacaridos, de celulosa bacteriana, de bioetanol, su co-digestión con los efluentes de lavado en reactores anaeróbicos de alta carga para incrementar la producción de metano, y su utilización como alimento para peces.

Sin embargo hay ciertos efluentes que comparten características similares y que no son tomados en consideración en las alternativas antes mencionadas y que se pueden agrupar como "cerveza de descarte". Esta comprende la cerveza derramada durante el envasado, la cerveza rechazada internamente por estar fuera de especificación y la cerveza que es devuelta del mercado por estar próxima a la fecha de vencimiento. Esta corriente puede representar un 0,6-1% del volumen de cerveza producida y deben ser dosificados a los sistemas de tratamiento debido su elevada DQO (120000-150000 mg O₂/L).

Si bien hay estudios que abordan parcialmente la utilización del excedente de levaduras como materia prima en procesos productivos, ninguno enfoca de manera integral el tratamiento de estas corrientes, (excedente de levaduras, y descarte de cerveza), utilizando dichas corrientes como materia prima de procesos

productivos, con el objetivo de disminuir la carga orgánica a ser tratada en las plantas convencionales, y con ello los costos de inversión y operativos.

En esta tesis se estudiaron los aspectos técnicos y económicos de los siguientes procesos: La recuperación de etanol a partir de la fracción líquida del excedente de levaduras y de la cerveza de descarte; La producción de bioetanol por fermentación alcohólica de los carbohidratos remanentes en la vinaza obtenida del proceso anterior; y la producción de ácido acético (vinagre de cerveza) por fermentación en cultivo sumergido de la fracción líquida del excedente de levaduras y de la cerveza de descarte.

Los resultados obtenidos demostraron la factibilidad de los procesos propuestos. La recuperación de etanol, seguido de la hidrólisis y fermentación de la vinaza, permitió una reducción de la carga orgánica de los efluentes en un 88%, resultando a su vez un proceso económicamente rentable, con un período de recupero del capital de 24 meses. El proceso que utiliza la fracción líquida de los efluentes como medio para producir vinagre de cerveza a través de un cultivo sumergido, prácticamente elimina las necesidades de tratamiento, resultando en un proceso sumamente rentable con un período de recupero del capital de 2 meses.

Palabras clave:

Tratamiento de efluentes, Cervecerías, Etanol, Vinagre de cerveza

Capítulo 1. Introducción. Aspectos generales

Reseña histórica de la cerveza

Con el desarrollo de la agricultura entre el 10000 a. C. y el 6000 a. C. comenzaron a descubrirse los productos elaborados a partir de sus frutos, lo que hace que la cerveza probablemente haya sido descubierta en ese tiempo. El descubrimiento de la "fermentación baja" hacia el siglo XV y la introducción del lúpulo acercó la cerveza a los consumidores haciéndola comercialmente más atractiva. Este último, prevaleció sobre las demás hierbas y especies debido a que mejoró su conservación y por consiguiente su traslado y comercialización, además de influir en el cuerpo y sabor de la cerveza. En 1883, Carlsberg Brewery comenzó la producción industrial de cerveza "lager" con una cepa de levadura previamente aislada en medios sólidos. Este evento se convirtió en un hito de la revolución industrial, ya que significaba la transición de la elaboración de cerveza artesanal de pequeña escala a la moderna producción a gran escala. Esto fue pronto seguido por otras compañías, convirtiéndose en los siguientes años en una técnica estándar en Europa y América del Norte, provocando un crecimiento exponencial de la producción de cerveza. Hoy la industria cervecera ocupa una posición central en la industria alimenticia a nivel mundial, con una producción superior a los 1500 millones de hL por año, siendo la cerveza la quinta bebida más consumida en el mundo (Fillaudeau et. al., 2006; Preedy, 2009).

Ingredientes

Los principales ingredientes utilizados en el proceso de producción de cerveza son: agua, malta, lúpulo y levaduras. El agua es el principal componente de la cerveza, por lo que muchas cervecerías acondicionan el agua para obtener las

condiciones de pH, concentración de minerales, alcalinidad, etc., acordes a su proceso productivo.

El segundo ingrediente más importante desde el punto de vista cuantitativo para la producción de cerveza es la cebada. Ésta se germina en condiciones controladas de humedad y temperatura, para impulsar la formación de enzimas, las que son responsables luego de la hidrólisis del almidón y de las proteínas contenidas en el grano, para dar origen a los azúcares y compuestos nitrogenados asimilables por las levaduras durante la fermentación. La cebada germinada se seca durante distintos períodos de tiempo y finalmente se muele, para obtener la malta. Como fuente alternativa de carbohidratos, suelen utilizarse sustitutos de malta, como trigo, arroz, o maíz, los cuales representan interés no sólo por su contribución especial al aroma y color de la cerveza, sino por su disponibilidad y rentabilidad que aplican al proceso.

El lúpulo le confiere a la cerveza su amargor y aroma típico. Tradicionalmente se añade durante la elaboración de la cerveza, debido también a sus efectos conservantes. El lúpulo influye en el sabor y aspecto de la cerveza.

Por último las levaduras utilizadas generalmente en la producción de cerveza son del género *Saccharomyces*. Las levaduras son las responsables de convertir los azúcares contenidos en el cereal en etanol y dióxido de carbono. Los principales criterios en la selección de una buena levadura de cerveza son: el tipo de fermentación (lager o baja; ale o alta), las características de floculación, el rendimiento de la fermentación, la producción y degradación de productos secundarios (desarrollo del aroma, eliminación de di-acetilo, etc.) (Hough, 1990; Kunze, 1999; Briggs et al., 2004; Eblinger, 2012).

Proceso de producción

El proceso de elaboración de cerveza se puede dividir en 3 etapas principales, presentadas en la figura 1: elaboración del mosto, fermentación y maduración, y finalmente la filtración y envasado.

La elaboración del mosto comienza con la germinación de la cebada en condiciones controladas, de manera de obtener una germinación uniforme en todos los granos, el secado de los mismos a diferentes tiempos y temperaturas para obtener maltas (grano de cebada seco) con mayores o menores actividades enzimáticas, y la molienda de la malta, ya sea en forma húmeda o seca. La harina obtenida se mezcla con agua previamente acondicionada y esta mezcla se calienta por distintos tiempos y temperaturas óptimas para que las enzimas contenidas en la malta hidrolicen el almidón presente en la harina liberando azúcares simples como glucosa, fructosa, maltosa y malto-triosa. Al mismo tiempo las enzimas proteolíticas producen compuestos nitrogenados como aminoácidos y oligopéptidos que son la principal fuente de nitrógeno a ser utilizadas por las levaduras durante la fermentación. El líquido resultante de esta operación, que contiene todos los azúcares y compuestos nitrogenados solubilizados se denomina "mosto". Éste es clarificado para eliminar los restos de cereal y es enviado a la sala de cocimientos, donde es llevado a ebullición para eliminar microorganismos indeseados y ajustar las concentraciones de los distintos componentes. En esta etapa se agrega el lúpulo de manera de que libere las sustancias que le otorgan el aroma y sabor característico a la cerveza. El mosto finalmente es enfriado y enviado a los tanques de fermentación.

La fermentación de los azúcares contenidos en el mosto es realizada con levaduras. Éstas transforman los azúcares principalmente en etanol y dióxido de carbono, como así también en otros compuestos minoritarios que forman parte del aroma y sabor característicos de cada cerveza. Cuando la mayor parte de los

Capítulo 1 – Introducción. Aspectos Generales

azúcares fueron consumidos, en los procesos de fermentación baja, las levaduras sedimentan y son separadas del fondo de los tanques de fermentación, generalmente cónicos. Esta primera etapa de fermentación suele durar entre 7 y 10 días dependiendo el tipo de cerveza. Posteriormente la cerveza es enviada a los tanques de maduración, en los cuales se baja la temperatura a valores cercanos a 0°C, para favorecer la precipitación de complejos de proteínas y polifenoles y de otras sustancias responsables de formar turbidez, las cuales son separadas por el fondo de los tanques. En esta etapa que suele durar en 3 y 20 días según el tipo de cerveza producida, se suelen agregar compuestos para favorecer la precipitación (bentonita, polivinil-polipirrolidona PVPP, etc.) los que son separados junto con los sólidos que precipitan naturalmente. La cerveza con un bajo contenido de sólidos es enviada a la etapa de filtración y envasado.

Por último, la cerveza es filtrada utilizando tierra de diatomeas, o a través de tecnología de membranas de manera de obtener una cerveza clara y brillante, la cual es emvasada, empacada y comercializada (Hough, 1990; Kunze, 1999; Briggs et al., 2004; Eblinger, 2012).

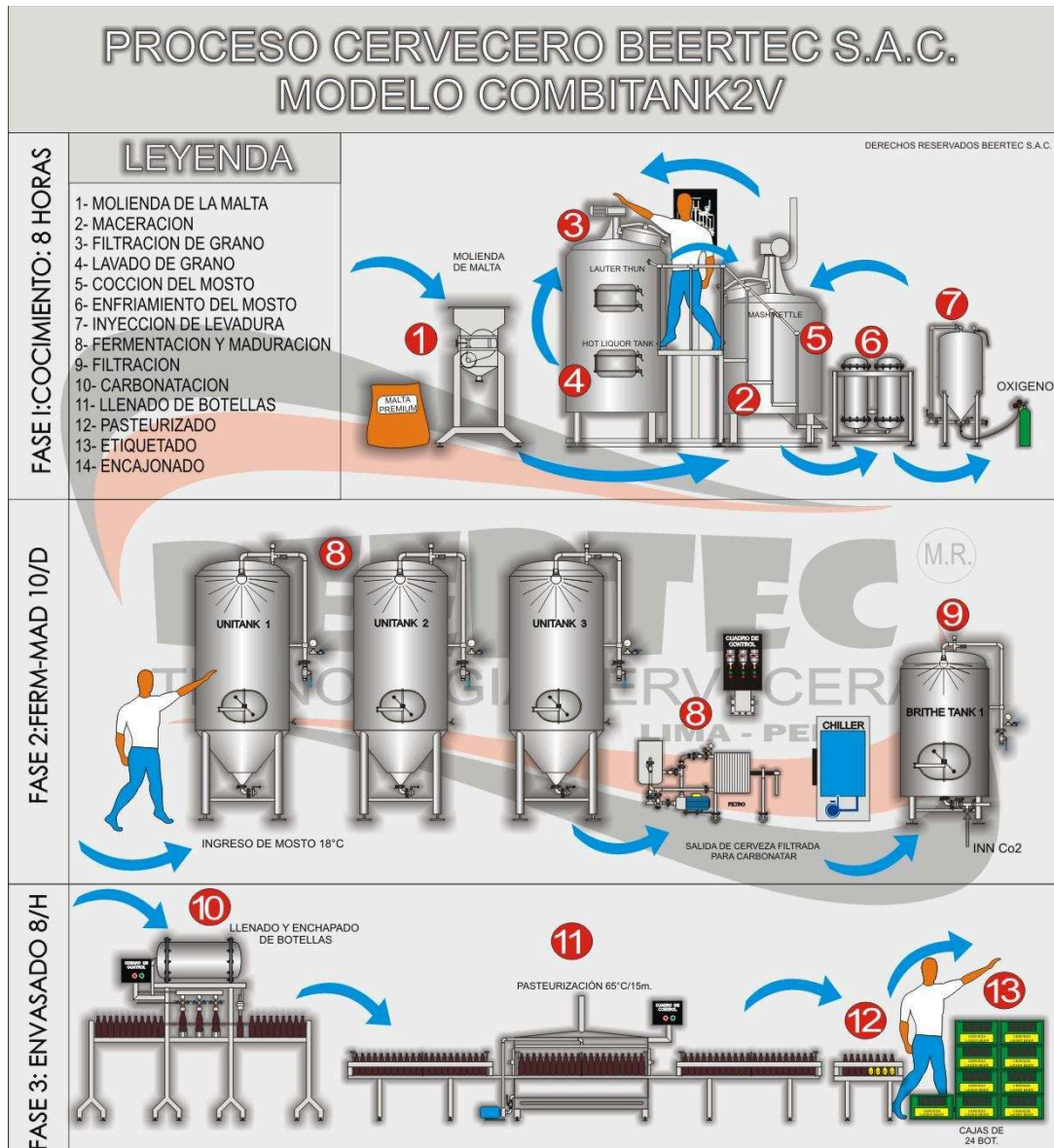


Figura 1: Proceso de producción de cerveza. Etapas principales. Fuente: Bertec-Tecnología Cervecera. Imagen recuperada de <http://beertec.galeon.com/>

Efluentes generados en la industria cervecera.

Durante el proceso de producción de cerveza se generan diversos tipos de efluentes, que se pueden dividir en tres grandes grupos según su composición y el destino que reciben:

- Residuos
- Aguas residuales
- Otros efluentes

Residuos

Los residuos comprenden todos los materiales domésticos generados en las distintas áreas de la industria. Entre ellos pueden citarse: vidrio, cartón, plástico, metales, aceites usados, tubos fluorescentes, solventes, residuos de envases peligrosos, etc.). Estos residuos se reciclan en mayor o menor medida dentro de la industria, o son eliminados a través de los canales locales para este fin (Fillaudeau et al., 2006; Simate et al., 2011).

También puede incluirse dentro de la clasificación de residuos, a la de tierra de diatomea utilizada y los sólidos provenientes de purgas de las plantas de tratamiento de efluentes (biomasa). Éstos normalmente son enviados a rellenos sanitarios, representando un costo de disposición para la industria cervecera (Hrycyk, 1997; Brito et al., 2007).

Aguas residuales

En la industria cervecera, además de los residuos y subproductos, la limpieza de tanques, botellas, máquinas y plantas produce grandes cantidades de aguas residuales. Para producir 1 L de cerveza, se generan de 3 a 10 L de aguas residuales, dependiendo del consumo específico en cada industria (Fillaudeau et al., 2006). Los aportes de carga orgánica son muy disímiles entre las distintas fuentes donde se generan. Así la limpieza de tanques involucrados en las primeras etapas del proceso productivo (elaboración del mosto, fermentación y maduración), representan el mayor aporte de carga orgánica, mientras que el lavado de botellas, máquinas y planta aporta el mayor volumen, con una carga orgánica menor (Simate et al., 2011). En la tabla 1 se puede observar la composición promedio de las aguas residuales generadas en una cervecería.

Capítulo 1 – Introducción. Aspectos Generales

Tabla 1: Rango promedio de valores para aguas residuales de cervecería (Simate et al., 2011).

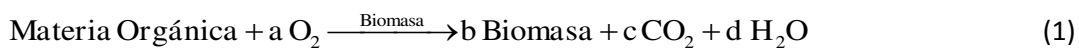
Parámetros	Rango de valores
pH	3-12
Temperatura (°C)	18-40
DQO (mgO ₂ /L)	2000-6000
DBO (mgO ₂ /L)	1200-3600
Ácidos grasos volátiles (mg/L)	1000-2500
Fosfatos (PO ₄ ³⁻) (mg/L)	10-50
Nitrógeno <u>kjeldahl</u> (mg/L)	25-80
Sólidos totales (mg/L)	5100-8750
Sólidos suspendidos totales (mg/L)	2900-3000
Sólidos disueltos totales (mg/L)	2020-5940

Como se puede observar de la tabla 1, la composición de las aguas residuales de cervecería es muy variable, tanto en su composición como en sus propiedades fisicoquímicas, debido a que el aporte de cada sector de la empresa, (lavado de equipos, lavado de planta, etc.) se produce en diferentes momentos. El pH, por ejemplo, puede variar en un amplio rango si el lavado CIP (Cleaning in place) de los equipos está en funcionamiento, dado el uso de bases y ácidos fuertes (Driessen & Vereijken, 2003; Brito et al., 2007). Debido a estas características, un tratamiento de estos efluentes debe ser realizado para llevarlos a especificación de volcado. Debido a que la carga orgánica se debe principalmente a restos de cereal, almidón, levaduras, etanol, etc., compuestos fácilmente biodegradables, la reducción de la carga orgánica se realiza principalmente por métodos biológicos.

El sistema de tratamiento de efluentes en este tipo de industria ha sido profusamente estudiado (Driessen & Vereijken, 2003; Brito et al., 2007; Rodrigues et al., 2001; Simate et al., 2011; Olajire, 2012; Sharda et al., 2013). Generalmente comprende un pre-tratamiento (físico o físico-químico) denominado "tratamiento primario", donde puede o no ser eliminada parte de la carga orgánica de los mismos, pero cuyo objetivo principal es acondicionar el efluente para el

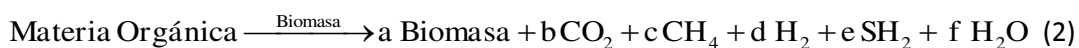
tratamiento biológico denominado "tratamiento secundario". El fundamento del tratamiento biológico de efluentes es transformar la materia orgánica disuelta en compuestos fácilmente separables del medio, tales como gases que se separan espontáneamente y biomasa, la cual puede separarse por métodos físicos (sedimentación, centrifugación, filtración, etc.). Los procesos biológicos más utilizados para el tratamiento de este tipo de efluentes, se los puede dividir en *procesos aeróbicos* y *procesos anaeróbicos*.

En los procesos aeróbicos de tratamiento, un consorcio de microorganismos consume la materia orgánica en presencia de oxígeno, y la transforma principalmente en dióxido de carbono y más microorganismos. En la ecuación 1, se resume este proceso de forma simplificada:



De esta manera, la materia orgánica disuelta es convertida en dióxido de carbono, gas que escapa libremente del efluente y microorganismos, los cuales pueden ser separados por métodos físicos previo al vertido del efluente.

En los procesos anaeróbicos en cambio, la materia orgánica es utilizada por un consorcio de microorganismos en ausencia de oxígeno, los cuales la transforman principalmente en CH₄, CO₂, H₂ y SH₂, además de formar más microorganismos durante el proceso, tal como se muestra en forma simplificada en la ecuación 2:



En este caso, los gases escapan del efluente; y la biomasa de microorganismos, usualmente es separada dentro del mismo proceso, previo al vertido del efluente. En la tabla 2 se presentan algunas características de los procesos aeróbicos y anaeróbicos de tratamiento.

Capítulo 1 – Introducción. Aspectos Generales

Tabla 2: Comparación de las características de los procesos aeróbicos y anaeróbicos de tratamiento (Driessen & Vereijken, 2003).

Variables	Procesos aeróbicos	Procesos anaeróbicos
Consumo de energía	elevado	Bajo
Producción de energía	no	si
Producción de biomasa	elevado	bajo
Remoción de DQO	90-98 %	70-85 %
Remoción de Nitrógeno y fósforo	elevado	bajo
Requerimiento de espacio	elevado	bajo
Operación discontinua	difícil	fácil

Como puede observarse, si bien los procesos aeróbicos permiten obtener una mayor reducción en la carga orgánica de los efluentes, presentan algunas desventajas, siendo las tres principales las siguientes: a) presentan un mayor consumo de energía; b) generan mayor cantidad de biomasa, la que debe ser retirada del sistema y dispuesta de manera adecuada; y c) no producen ningún compuesto que pueda ser utilizado para producir energía (Driessen & Vereijken, 2003; Simate et al., 2011).

Los procesos anaeróbicos, en cambio, si bien permiten una menor reducción de la carga orgánica, y la calidad del efluente generado puede no ser adecuada para verter directamente, tienen la ventaja de producir compuestos como el CH₄, que pueden ser utilizados para producir energía. Si bien parte de la energía producida es utilizada para mantener la temperatura en el reactor, el excedente puede ser utilizado para disminuir los requerimientos energéticos de la industria (Driessen & Vereijken, 2003; Simate et al., 2011).

Otros efluentes

La mayor parte de los efluentes generados en las distintas etapas del proceso de producción son de carácter orgánico. Algunos pueden ser considerados

como subproductos, ya que pueden ser aprovechados por otras industrias, fundamentalmente alimenticias, (alimentación humana, alimentación animal, etc.).

Durante la etapa de elaboración del mosto se produce el bagazo. Éste representa el mayor volumen en la industria cervecera, y comprende los restos de cereal que se separan durante la filtración del mosto. En esta misma etapa del proceso, más específicamente durante la cocción y enfriamiento del mosto, se genera un precipitado, principalmente de proteínas provenientes del cereal, denominado "hot trub" o "trub". Estos subproductos se comercializan como alimento para el ganado (Kunze, 1999; Briggs et al., 2004; Fillaudeau et al., 2006; Nigam y Pandey, 2009; Eblinger, 2012; Olajire, 2012).

Excedente de levaduras

Durante la etapa de fermentación y maduración de la cerveza, se generan ciertos efluentes que corresponden a purgas de los tanques donde se llevan a cabo estas etapas, que se realizan con el objeto de separar las levaduras hacia el final de la fermentación, y separar una mezcla de levaduras y otros compuestos precipitados (complejos proteína-polifenoles, agentes precipitantes, etc.) durante la etapa de maduración. Las purgas de fermentación son reutilizadas para inocular posteriores fermentaciones, pero su uso está restringido a un número limitado de veces, dada la necesidad de conservar la estabilidad de la cepa y la calidad del producto obtenido. Una vez que son reutilizadas el número de veces, estipulado en el protocolo de cada producto, se mezclan con las purgas de maduración originando el efluente denominado "excedente de levadura" o "levadura líquida". Este efluente puede representar el 1,5-3% del volumen de cerveza producida y posee una carga orgánica 50 a 100 veces superior a la de las aguas residuales, debido principalmente al contenido de levaduras, etanol y carbohidratos remanentes de la fermentación (Kunze, 1999; Briggs et al., 2004; Fillaudeau et al., 2006; Eblinger,

2012). Actualmente, cuando existen interesados, se comercializa como alimento para ganado, mezclado o no con el bagazo y el "trub".

Dada la elevada carga orgánica que poseen estos subproductos, debe tomarse especial precaución en no mezclarlos con las corrientes de aguas residuales, dado que como se mencionó anteriormente uno de los factores clave para el correcto funcionamiento de las instalaciones de tratamiento, es la estabilidad en la composición del efluente que ingresa al mismo (Houg, 1990)

Cerveza de descarte

Además de los efluentes antes mencionados, existen otros descartes dentro de la industria cervecera, que no han recibido atención en la bibliografía. Durante el proceso de envasado de la cerveza, si el equipo detecta inconvenientes en alguna botella, (por mal llenado, presión incorrecta, etc.), descarta un lote comprendido por 10 a 20 unidades anteriores y posteriores a la botella defectuosa. Este descarte de cerveza suele ser derramado dentro de las mismas instalaciones de envasado, comprende un potencial subproducto (cerveza), que si bien difícilmente puede reciclarse en el proceso productivo, puede ser recuperado para otros fines. Por otro lado, la cerveza que una vez producida no cumple con los estándares de calidad establecidos dentro de la empresa, es rechazada. Si bien este tipo de situaciones es indeseada dentro del ámbito industrial, en las industrias fermentativas, donde el medio que se utiliza es una solución azucarada, se presenta con frecuencia, ya que cualquier error u operación inadecuada en las etapas de limpieza y esterilización de equipos genera condiciones favorables para las contaminaciones por microorganismos indeseados, modificando las condiciones organolépticas del producto final. Estas corrientes, que se pueden agrupar como *cerveza rechazada*, por políticas de calidad o por ser derramada en la etapa de envasado, pueden representar hasta el 0,5-1% de la producción de cerveza (esta información

suministrada por comunicación personal concuerda con la reportada por Kunze, 1999).

Otro descarte en la industria cervecera comprende el producto que retorna del mercado por estar cerca de la fecha de vencimiento, el cual es retirado por la empresa productora como parte de su política de calidad. Este descarte también puede representar hasta un 0,5-1% del volumen de cerveza producida.

Para dar una idea del poder contaminante de estas corrientes, que consisten principalmente en cerveza, cabe decir que presentan una Demanda Química de Oxígeno (DQO) unas 50 veces superior a la de las aguas residuales.

Estos efluentes representan un serio inconveniente para la industria cervecera, ya que la elevada carga orgánica de los mismos constituye un problema para los sistemas de tratamiento, especialmente en los períodos de alta producción (primavera-verano).

Valorización de efluentes de la industria cervecera

Antecedentes

El aprovechamiento de los *residuos* generados en la industria cervecera, dentro de los cuales pueden citarse los residuos domésticos, restos de etiquetas y gomas, lodos provenientes de la planta de tratamiento de efluentes como así también la tierra de diatomeas usada, no ha recibido mayor atención en la literatura, mencionándose como principal destino la disposición final de los mismos (Fillaudeau et al., 2006).

El tratamiento de las *aguas residuales* es abordado por varios autores, sugiriendo que la combinación de un tratamiento anaeróbico con producción de metano, parte del cual puede ser aprovechado para generar energía en la industria, seguido de un tratamiento aeróbico necesario para alcanzar los estándares de volcado de los efluentes, es la alternativa más utilizada en este tipo de industrias

(Driessen & Vereijken, 2003; Brito et al., 2007; Rodrigues et al., 2001; Simate et al., 2011; Sharda et al., 2013).

El bagazo es el mayor subproducto de la industria cervecera. Distintos autores han estudiado su uso en alimentación humana, pero la textura e inestabilidad microbiológica son factores limitantes para su almacenamiento, lo que desalienta cualquier proceso que así lo requiera. Además se ha estudiado su uso como combustible, pero como el bagazo es el residuo obtenido en la filtración del mosto, su elevado contenido de humedad junto a las posibles emisiones de gases de nitrógeno y azufre, limitan su utilización para este fin (Mussatto et al., 2006). El *bagazo* es rico en carbohidratos, proteínas asociadas y minerales, lo que lo convierte en un sustrato de alto valor biotecnológico. Ha sido estudiado su uso como sustrato de fermentaciones en estado sólido para la producción de enzimas, biomasa de hongos, y también como materia prima en la producción de xilitol (Fillaudeau et al., 2006; Mussatto et al., 2006; Nigam y Pandey, 2009). No obstante, su venta para la formulación de piensos utilizados en alimentación animal, principalmente como alimento para el ganado lechero, sigue siendo una práctica instalada en este tipo de industrias, lo que es apoyado no sólo por la literatura, sino por comunicaciones personales (Fillaudeau et al., 2006).

El *excedente de levadura* se compone principalmente de una suspensión de levaduras en cerveza inmadura o cerveza joven, que dependiendo de la etapa del proceso en que es retirada, hacia el comienzo o final de la fermentación o maduración posee diferentes concentraciones que oscila entre 6-10 % p/v (Briggs et al., 2004). Este efluente representa un inconveniente para la industria cervecera, sobre todo por su elevado contenido de humedad y su alto contenido de materia orgánica biodegradable, lo que lo torna inestable desde el punto de vista microbiológico. Actualmente el principal destino comercial que recibe este efluente es como alimento para el ganado vacuno y porcino, sin embargo la intermitencia en

su generación (en función de las purgas programadas en cada uno de los procesos), provocan que no siempre pueda ser comercializado con este fin, siendo necesario su tratamiento antes del vertido a un cuerpo receptor. Esta práctica representa un impacto negativo en la industria, no sólo por los costos asociados al tratamiento, sino que usualmente los sistemas de tratamiento no están dimensionados para tratar este subproducto junto con las aguas residuales, lo que obliga a dosificar el efluente o a sobredimensionar las plantas de tratamiento aumentando los costos de inversión y operativos (Fillaudeau, 2006). Hay abundantes estudios que abordan el aprovechamiento de este efluente tanto por su contenido de levaduras como por la composición de la fracción líquida (cerveza). Las levaduras son una fuente importante de proteínas, vitaminas del complejo-B, otras vitaminas, ácidos nucleicos y minerales. Para aprovechar su valor nutricional, normalmente se realiza una hidrólisis con ácido clorhídrico o por autólisis de las mismas levaduras, y posteriormente el hidrolizado es deshidratado y comercializado en polvo, o comercializado en forma líquida. Este extracto líquido o en polvo se ha utilizado como suplemento en alimento para peces, suplemento para medios de cultivo de microorganismos y como suplementos para humanos, líquidos o en polvo y en pastillas (Ferreira et al., 2010). Otros autores reportan la utilización de la biomasa de levaduras de efluentes de cervecería como agente para la remoción de metales pesados, dada la capacidad de adsorción de estos metales sobre los componentes de la pared celular (Soares y Soares, 2013). Por otro lado, se ha estudiado la utilización de la fracción líquida de este efluente como materia prima en diferentes procesos. Entre ellos puede destacarse su utilización como medio de cultivo para la producción de oligosacáridos (Khan et al., 2007); los autores ensayaron diferentes diluciones del efluente y diferentes condiciones fisicoquímicas del cultivo, obteniendo una productividad 100 veces superior que cuando se utiliza un medio definido. Otros autores evaluaron la utilización del efluente para la

producción de celulosa bacteriana (Ha et al., 2008). También se estudió la producción de etanol utilizando la fracción líquida y el efluente completo (excedente de levaduras) aprovechando el contenido de enzimas capaces de hidrolizar almidón, de modo de aumentar la concentración de glucosa del medio a través de un aporte externo de carbohidratos, utilizando las mismas levaduras presentes en el efluente (Ha et al., 2011). Finalmente, un estudio reporta la utilización de la fracción líquida del excedente de levadura para la producción de vinagre con aroma a cerveza, mediante una fermentación mixta llevada a cabo con levaduras formadoras de ésteres y bacterias acéticas. Los autores partieron de un efluente previamente procesado, realizaron una digestión enzimática de la fracción líquida del efluente, la llevaron a ebullición y finalmente lo enfriaron y lo filtraron previo a la fermentación (Jiang et al., 2013).

La mayoría de estos estudios fueron realizados a escala laboratorio, y hoy en día el principal destino de éste subproducto sigue siendo de su venta como alimento para ganado.

Por otra parte, como se mencionó anteriormente, no se ha abordado en la literatura el estudio del aprovechamiento o valorización de la cerveza de descarte, la cual es habitualmente enviada a la planta de tratamiento convencional existente en la industria y puede representar hasta un 1% del volumen de cerveza producida.

Descripción del caso de estudio

Todos los ensayos y resultados presentados en esta tesis se realizaron sobre efluentes reales provenientes de una empresa local, la cual se adoptó como caso de estudio para los análisis de factibilidad técnica y económica de los procesos propuestos y estudiados. La empresa produce principalmente 4 clases de cervezas, con una capacidad anual de producción de 260 millones de litros.

La planta de tratamiento de efluentes cuenta con un Reactor UASB (“Upflow Anaerobic Sludge Blanket”) como unidad principal donde se lleva a cabo el tratamiento biológico anaeróbico de los efluentes para reducir su carga orgánica desde su valor inicial hasta el correspondiente valor de volcado. Actualmente la mayoría de los residuos y otros efluentes son tratados en este reactor o comercializados a terceros para su uso o disposición final. Sin embargo, con frecuencia se dificulta la comercialización del excedente de levaduras y éste es derivado al sistema de tratamiento, lo que ocasiona serios inconvenientes, dado que éste no fue diseñado para absorber la elevada carga orgánica que aporta esa corriente. Inconvenientes similares son ocasionados por la cerveza de descarte, ya que no hay un sistema diseñado para su recolección. En este caso la sobrecarga puede ser notoria, ya que los volúmenes involucrados (falla en los sistemas de envasado, gran retorno de cerveza del mercado o descartes de lotes fuera de especificación) pueden ser muy importantes. Los principales sectores donde se producen los efluentes de interés son: a) los sectores de fermentación y maduración, donde se genera el excedente de levaduras; b) el sector de envasado, expedición y descarga, donde se generan derrames de cerveza y el retorno de la cerveza del mercado; y c) la cerveza que es retenida por políticas de calidad y debe ser descartada directamente desde los tanques de fermentación y/o maduración.

Procesos propuestos y estudiados en esta Tesis para el tratamiento y valorización del excedente de levaduras y cerveza de descarte.

La reducción de los efluentes dentro de la industria cervecera sin duda impacta positivamente sobre el proceso productivo, no sólo desde el punto de vista económico, sino también desde el punto de vista ambiental. En el caso de los principales subproductos, el bagazo actualmente encuentra principal destino en la alimentación animal; en cambio para el excedente de levadura, si bien hay estudios

que incluyen su uso como materia prima en ciertos procesos productivos, sigue representando un problema para este tipo de industrias y no hay trabajos que apunten específicamente a la reducción de la carga orgánica de éstos a través de procesos productivos. Por otra parte, no se han encontrado estudios que incluyan el aprovechamiento o valorización de la cerveza retenida por políticas de calidad, la cerveza derramada durante el proceso de envasado y la cerveza que retorna del mercado por estar próxima a su fecha de vencimiento.

En la presente tesis se estudió el tratamiento de la fracción líquida de estos efluentes (excedente de levadura, cerveza retenida por políticas de calidad, cerveza derramada durante el proceso de envasado y cerveza que retorna del mercado), utilizándolos como materia prima en diferentes procesos productivos, analizando la factibilidad técnico-económica de cada uno de ellos.

Concretamente, se estudió el tratamiento de la fracción líquida de estos efluentes, a través de la conversión de los carbohidratos contenidos en dióxido de carbono y etanol, ambos compuestos fácilmente separables, respetando el principio básico del tratamiento biológico de efluentes, de convertir la materia orgánica disuelta difícil de remover, en compuestos que se separen espontáneamente o que puedan ser fácilmente separados. Por otra parte, aprovechando el contenido de etanol inicial de los efluentes, se estudió la producción ácido acético (vinagre) como proceso de tratamiento utilizando como medio el mismo efluente. Dado que en este caso todo el efluente pasa a formar parte del producto, vinagre de cerveza, prácticamente se eliminan las necesidades de tratamiento posteriores.

Etanol

El etanol se emplea principalmente como biocombustible pudiendo sustituir parcialmente el consumo de combustibles fósiles tradicionales (petróleo y carbón). Constituye una fuente de energía renovable y tiene bajo impacto ambiental. Además, el reemplazo de los combustibles fósiles por biocombustibles en el sector

de transporte automotor puede ser realizado con bajos costos, debido a que no se requieren grandes cambios de la tecnología actualmente utilizada, ni tampoco del sistema de distribución (Molina, 2009; Lamers et al., 2008; Kaparaju et al., 2009; Nigam y Singh, 2011). En la República Argentina, la sanción de la Ley 26.093 ("Régimen de Regulación y Promoción para la Producción y Uso Sustentable de Biocombustibles) y de su Decreto Reglamentario 109/2007, establecen que todo combustible caracterizado como nafta (gasolina), comercializado en el territorio nacional, deberá ser mezclado con un porcentaje del 5% de bioetanol a partir del año 2010. A través del Programa de Biocombustibles de la Secretaría de Energía de la Nación se prevé destinar anualmente alrededor de 450 mil toneladas de caña para la producción de aproximadamente 300 mil metros cúbicos (240 mil toneladas) de bioetanol y satisfacer el corte de las naftas del 5%. Por el momento, debido a que la industria azucarera no pudo realizar las reformas técnicas necesarias para abastecer el mercado interno, se aceptó un corte del 2%. Producir bioetanol a partir de caña de azúcar requiere un incremento en la capacidad productiva de los ingenios azucareros y el crecimiento del área sembrada, evento que originaría elevadas demandas sobre los recursos naturales y competencia por la tierra que podría ser utilizada para la producción de alimentos. Además, la mayor demanda de biocombustibles puede producir un aumento en el precio de los cultivos energéticos y de los productos que compiten por insumos con ellos como es la carne (Comisión Interamericana del Etanol, 2007; International Energy Agency, 2004; Cámara Argentina de Energías Renovables, 2010) mientras que los subproductos de la producción de biocombustibles disminuirían su valor en el mercado, como es el caso de la glicerina en el caso del biodiesel (Martínez, 2007; CEPAL, 2007; FAO, 2007).

Además de su utilización como biocombustible, el etanol tiene diversas aplicaciones, por lo que reviste interés para diversas industrias, entre las cuales pueden mencionarse::

- Farmacéutica: excipiente de algunos medicamentos y cosméticos, antiséptico, elaboración de perfumes y fragancias de uso personal o de ambiente.

- Alimenticia: para la elaboración de bebidas alcohólicas (licores y otras bebidas espirituosas),

- Química: solventes, anticongelantes, desinfectantes, medio para recristalizaciones, materia prima para la síntesis de diversos productos (acetato de etilo, éter dietílico, entre otros), disolvente de lacas y barnices, rebajante de thinner y adelgazador de tintas tipográficas, desinfectante y anticongelante) (Dupont y col., 2007).

En este sentido, el bioetanol producido a partir de estos efluentes no tendría inconvenientes en ser total y fácilmente absorbido por los diferentes mercados existentes.

Si bien hay estudios que abordan la utilización de la fracción líquida del excedente de levaduras y el efluente completo para la producción de bioetanol (Ha et al., 2011; Khattak et al., 2013), éstos se basan en aprovechar la capacidad de las enzimas remanentes del proceso de producción de cerveza, presentes en estas fracciones, como de las que se puedan producir durante la autólisis de las levaduras, para hidrolizar almidón (provisto por fuentes adicionales de carbohidratos), siendo las mismas levaduras presentes en el efluente las responsables del aumento en la concentración de etanol. En estos trabajos no se realiza un análisis de la reducción de la carga orgánica obtenida a través de los procesos, los cuales involucran largos períodos de calentamiento y de fermentación posterior, ni un análisis económico de los mismos.

En la presente Tesis se estudió el tratamiento de la cerveza de descarte y de la fracción líquida del excedente de levaduras mediante la producción de etanol, prestando especial atención a la reducción de la carga orgánica remanente en los efluentes. Se planteó un proceso compuesto inicialmente por una etapa de destilación con el doble objetivo de reducir la carga orgánica a través de la remoción del etanol contenido en los efluentes y obtener una vinaza libre de microorganismos, que permita almacenarla para la utilización posterior de los carbohidratos contenidos en ella. Posteriormente se propuso llevar a cabo una hidrólisis ácida de los carbohidratos presentes en la vinaza obtenida, para su conversión a etanol a través de una fermentación alcohólica. Si la vinaza hidrolizada se conserva adecuadamente, puede ser almacenada independientemente de las condiciones de almacenamiento previo de los efluentes, lo que le confiere flexibilidad al proceso propuesto. Se caracterizaron los efluentes y se simularon los procesos de recuperación de etanol. Se estudiaron las variables que afectan la hidrólisis de los carbohidratos presentes en la vinazas a azúcares fermentables, como así también la necesidad de suplementar las vinazas con sales fuentes de micro y macro nutrientes, previo a la fermentación alcohólica, de modo de maximizar la conversión de la materia orgánica a compuestos fácilmente separables como CO₂ y etanol, reduciendo al mínimo la carga orgánica remanente en los efluentes.

Ácido acético (vinagre)

El vinagre se emplea tradicionalmente como condimento de mesa, siendo el vinagre de alcohol, de vino y de manzana los denominados "tradicionales" y más consumidos en Argentina. Según fuentes del mercado (comunicación personal), el consumo de vinagre en Argentina alcanza los 30 millones de litros al año, a lo que hay que sumarle un 10% más, correspondiente al consumo de acetos y otras variantes. Sin embargo, en los últimos años hay un esfuerzo de las grandes

empresas (Ej: Porta Hnos.) en hacer crecer tanto en volumen como profundidad el mercado de vinagres, innovando con nuevos productos, pensando el vinagre como un ingrediente central en la cocina y no un condimento de segunda línea.

Hay numerosos artículos que abordan el estudio del proceso de producción de ácido acético a partir del etanol contenido en el vino, para obtener vinagre de vino (Romero et al., 1994; Garrido-Vidal et al., 2003; Jiménez-Hornero et al., 2009). Sin embargo, la utilización de la fracción líquida del excedente de levaduras y la cerveza de descarte para producir ácido acético, vinagre de cerveza no ha sido de gran atención en la literatura. Recientemente Jiang et al. (2013), publicó un trabajo que apunta a la utilización de la fracción líquida del excedente de levaduras, mediante un proceso complejo que incluye un largo pretratamiento del mismo, utilizando una digestión enzimática, seguido de la ebullición del efluente a distintos tiempos y temperaturas, para finalmente enfriar y filtrar el mismo previo a la fermentación acética.

En la presente tesis se propuso y estudió el tratamiento de la cerveza de descarte y de la fracción líquida del excedente de levaduras utilizándolos como medio para la producción de ácido acético, aprovechando su contenido de etanol inicial. Se estudió la factibilidad de utilizar los efluentes provenientes de distintas variedades de cerveza. Se estudiaron las principales variables que afectan al proceso de fermentación acética, en distintas escalas, realizando ensayos en erlenmeyer y un reactor piloto diseñado y construido en el marco de esta tesis, obteniendo un modelo cinético que permite ajustar los resultados experimentales.

Finalmente se realizó un estudio de factibilidad técnico-económica de los procesos estudiados y se propusieron distintos esquemas para la aplicación de estos procesos para el tratamiento de estas corrientes a nivel industrial.

Motivación

Este trabajo estuvo motivado por el interés de diseñar y evaluar alternativas tecnológicas de alta eficiencia técnica, económica y ambiental para el tratamiento y valorización de estos subproductos, considerando un deseable equilibrio entre aspectos básicos y tecnológicos, permitiendo desarrollar conocimientos y ofrecer al medio productivo tecnologías innovadoras para la elaboración de productos de valor agregado en forma competitiva, promoviendo un desarrollo económico y medioambiental sostenible al utilizar materias primas renovables que hasta el presente han sido considerados desechos industriales y que no sólo tienen un costo nulo sino que además requieren de inversiones y gastos para su tratamiento previo a la disposición final. Además, los resultados de la presente tesis permitirían abrir posibilidades para la implantación de emprendimientos productivos a nivel local.

Estructura de la tesis

La tesis se compone de 8 capítulos. La primera parte está dedicada a abordar una introducción general al tema de estudio y a la formulación del problema de investigación, así como a la motivación y estructura de la tesis. Estos aspectos se incluyen en el **capítulo 1**.

En el **capítulo 2** se aborda la identificación, cuantificación y caracterización de las distintas corrientes que componen los efluentes estudiados, más específicamente el análisis de los volúmenes y momentos en que éstos son producidos tomando como caso de estudio una cervecería con una producción anual de 2,6 Millones de hectolitros de cerveza; además se presenta la caracterización de los mismos, con los valores de las principales variables de interés para los procesos propuestos.

En el **capítulo 3** se presenta el análisis y simulación de diferentes esquemas propuestos para la recuperación del etanol contenido en los efluentes estudiados,

tomando en cuenta las especificaciones necesarias para que el etanol obtenido pueda ser utilizado como materia prima en otros procesos productivos, o ser comercializado según la normativa vigente. Se presenta también un análisis económico de las alternativas estudiadas.

En el **capítulo 4** se presenta el estudio de factibilidad de utilizar los carbohidratos que permanecen en las vinazas luego de la recuperación del etanol contenido en los efluentes, como materia prima para la producción de etanol adicional. Se aborda el estudio de las variables que afectan al proceso de hidrólisis ácida utilizado para convertir estos carbohidratos a azúcares fermentables, susceptibles de ser utilizados por levaduras para su conversión a etanol, como así también el estudio del efecto sobre el rendimiento en etanol, de suplementar las vinazas hidrolizadas con diferentes sales fuentes de macro y micronutrientes. Finalmente presenta una simulación del proceso y un análisis económico del mismo.

En el **capítulo 5** se presenta el estudio de factibilidad de utilizar la fracción líquida de los efluentes como materia prima para la producción de ácido acético (vinagre de cerveza). Se incluye además la descripción del diseño y construcción de un fermentador aeróbico de 6 L con un sistema de control de temperatura, velocidad de agitación, llenado y vaciado automático que fue utilizado para el estudio a escala piloto de las variables que afectan el proceso de fermentación acética, como así también el efecto de diferentes conservantes presentes en los efluentes. El mismo cuenta además con una turbina auto aspirante, diseñada en el marco de esta tesis, a través de la combinación y mejora de diseños disponibles en el mercado. Todo lo referente al diseño del reactor y la turbina, la caracterización del equipo (régimen de flujo, transferencia de oxígeno) y el estudio experimental de las variables antes mencionadas se presentan en este capítulo.

En el **capítulo 6** se presenta el análisis de un proceso integral para el tratamiento de efluentes líquidos de la industria cervecera, basado en los tres

procesos estudiados: separación del etanol por destilación, producción de etanol por fermentación de los carbohidratos remanentes en las vinazas y producción de ácido acético a partir de la fracción líquida de los efluentes.

Finalmente en el **capítulo 7**, se presentan las conclusiones generales y trabajos a futuro. Y en el **capítulo 8** la bibliografía.

En el marco de esta tesis, se llevaron a cabo las siguientes publicaciones, patentes y convenios de desarrollo con el sector socio-productivo:

- *Producción de bioetanol, levaduras y ácido acético a partir de efluentes de cervecerías.* Miguel A. Isla, María T. Benzzo, Fernando Birri, Lisandro Seluy, Paulina Jacob y Fernando Aguer. Exposición oral. 1ª Feria Internacional y 6º Congreso Regional del Ambiente, Rosario, Santa Fe, Argentina, junio de 2010.
- Miembro del Grupo Ejecutor del trabajo: Análisis de factibilidad de procesos no convencionales para el tratamiento y/o valorización de los efluentes líquidos y semisólidos de las plantas industriales de producción de cerveza de Compañía Industrial Cervecera S.A. Convenio CICSA – UNL. Departamento de Medio Ambiente, FICH, UNL (Nov 2010- Jun 2011).
- *Un proceso de tratamiento de efluentes de la industria cervecera con producción simultánea de bioetanol, biomasa de levaduras, vinagre de cerveza y de alcohol.* Solicitud de patente INPI 20110103904: Titular: Universidad Nacional del Litoral. Octubre de 2011.

- *Tratamiento de vinazas utilizando levaduras como agentes biológicos.* Lisandro Seluy, Miguel A. Isla. Exposición oral. Congreso de Ciencias ambientales COPIME 2011, CABA, Argentina, Octubre de 2011. Tercer Premio en el Eje Tecnología Ambiental.
- *Impacto de la hidrólisis de azúcares no-reductores en la producción de etanol a partir de vinazas de cervecerías.* Lisandro Seluy, Paula Firman, Miguel A. Isla. VII Congreso de Medio Ambiente de la AUGM, Mayo 2012.
- Miembro del Grupo Ejecutor del trabajo: Desarrollo de un Fermentador Piloto y su Aplicación para Optimizar Condiciones Operativas en la Producción de Vinagre a Partir de Subproductos de la Cervecería Santa Fe. Convenio CICSA – UNL. Departamento de Medio Ambiente, FICH, UNL (Junio - Sep 2012).
- *Optimización de la producción de etanol a partir de vinazas de cervecería como estrategia para disminuir la carga orgánica de los efluentes.* Lisandro Gabriel Seluy, María Carolina Goró. XXI Jornadas de Jóvenes Investigadores de AUGM, Octubre 2013.
- *A process to treat high-strength brewery wastewater via ethanol recovery and vinasse fermentation.* Lisandro G. Seluy, Miguel A. Isla. 2014. *Industrial Engineering Chemical Research* 53, 17043–17050.

Por otra parte, la experiencia adquirida en materia de procesos fermentativos en el marco de esta tesis, habilitó la participación en estudios de procesos de valorización de efluentes de la industria de bebidas azucaradas, dando origen a las siguientes publicaciones:

- *Producción de bioetanol a partir de efluentes de la industria de gaseosas.* Raul N. Comelli, Dino L. Ingaramo, Kevin J. Schanton, Lisandro Seluy, Miguel A. Isla. *II Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos, Mayo 2012.*
- *Producción sustentable de bioetanol a partir de efluentes industriales.* Raúl N. Comelli, Lisandro G. Seluy, Dino L. Ingaramo, María Florencia D'Andrea, Miguel A. Isla. HYFUSEN 2013, 5to. Congreso Nacional-- 4to. Congreso Iberoamericano Hidrógeno y Fuentes Sustentables de Energía, Córdoba, Argentina, junio de 2013.
- *Wastewater from the soft drinks industry as a source for bioethanol production.* Miguel A. Isla, Raúl N. Comelli, Lisandro G. Seluy. 2013. *Bioresource Technology* 136 140–147.

Capítulo 2. Identificación y caracterización de efluentes.

Introducción

A lo largo del proceso de elaboración de cerveza se generan efluentes sólidos, líquidos, y gaseosos. En la presente tesis se abordó el estudio de procesos de tratamiento alternativo de los efluentes líquidos, mediante la obtención de productos con valor agregado. Los efluentes líquidos se generan en diferentes sectores dentro de la industria cervecera, presentando además características muy diversas, tanto en composición como en cantidad.

En este capítulo se presenta un relevamiento de los distintos efluentes generados en la industria, información obtenida a partir de la empresa local adoptada como caso de estudio.

Además se presenta una caracterización de los mismos, a los cuales se les determinó el valor de las variables de interés para los procesos de tratamiento propuestos.

Materiales y métodos

Relevamiento de los efluentes provenientes de la industria cervecera

Se realizó un relevamiento de los efluentes que presentan un elevado contenido de etanol y/o carbohidratos, susceptibles de ser utilizados en los procesos de tratamiento estudiados para la obtención de productos con valor agregado. Por esta razón no se tuvieron en cuenta los efluentes líquidos generados antes del proceso de fermentación, ni los provenientes del lavado de equipos. Se consideraron aquellos provenientes del sector de fermentación y maduración, agrupados como "excedente de levadura", como así también la cerveza retenida por políticas de calidad, la cerveza derramada en el sector de envasado y la cerveza

que es devuelta del mercado, denominados en conjunto como "cerveza de descarte".

La empresa adoptada como caso de estudio produce principalmente 4 clases de cervezas. El sector de fermentación y maduración, es el que genera mayor cantidad de efluentes, denominado excedente de levadura, por lo que para este sector se realizó un relevamiento por clase de cerveza. Para los demás sectores donde el efluente es esencialmente cerveza, denominado en su conjunto como cerveza de descarte, se relevó la producción total de efluentes en cada uno.

Caracterización de los efluentes. Determinaciones analíticas

En la presente tesis se abordó el estudio del tratamiento de la fracción líquida de los distintos efluentes. El excedente de levaduras, fue provisto cordialmente por la empresa. La fracción líquida de este efluente, el cual posee un contenido de sólidos, principalmente levaduras, del orden del 10 %m/m, se obtuvo luego de centrifugar el mismo durante 15 minutos a 3000 rpm, utilizando una centrifuga Cavour VT 3216. El sobrenadante obtenido se almacenó en frascos estériles a -20°C hasta su uso posterior.

Los efluentes provenientes de los sectores de expedición y descarga, como así también los lotes retenidos por políticas de calidad, son esencialmente cerveza y no contienen sólidos en suspensión. En estos casos se utilizó cerveza comercial para su caracterización y para los estudios realizados, la cual fue obtenida del mercado local.

La fracción líquida de ambos efluentes se caracterizó determinando su contenido de etanol, azúcares totales, azúcares reductores, nitrógeno alfa-amino libre (FAN, por sus siglas en inglés), proteínas totales, glicerol y DQO.

Reactivos

Todos los reactivos utilizados, soluciones, ácidos y bases, extracto de levadura, peptona de carne, azúcares, agar-agar, etc., se adquirieron a proveedores locales de las marcas Cicarelli, Britania, Sigma-Aldrich y Merck. Se utilizó agua *Milli-Q* para preparar las soluciones y/o medios de cultivo.

Etanol

El contenido de etanol en los efluentes de interés fue estimado a partir del valor provisto por la empresa, o reportado en los rótulos de las cervezas adquiridas en el mercado local. Estos valores fueron corroborados por información técnica suministrada por la empresa, como así también por ensayos de picnometría efectuados luego de su separación por destilación. La técnica utilizada para las determinaciones de etanol realizada en los ensayos posteriores se detalla en el capítulo 3.

Azúcares totales

La determinación azúcares totales se realizó mediante la técnica colorimétrica del fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956), con ligeras modificaciones. La técnica utiliza una solución de 50 g/L de fenol en agua destilada, y ácido sulfúrico concentrado comercial (> 99,8 % de pureza). El fenol en medio ácido, reacciona con los azúcares. La reacción da un característico color amarillo-anaranjado, estable durante varias horas que puede determinarse en espectrofotómetro y presenta un pico de absorción a 490 nm para las hexosas o 480 nm para las pentosas y ácidos urónicos. Para determinar la concentración de azúcares totales en una muestra, previamente se realizó una curva de calibrado a partir de soluciones patrón de glucosa de concentraciones conocidas. Se observó que la linealidad entre la respuesta de absorción y la concentración de carbohidratos de las soluciones patrón se mantuvo para valores comprendidos entre 0 y 60 mg/L,

por lo que las muestras obtenidas durante las fermentaciones se diluyeron apropiadamente con agua destilada estéril pH 7.0 para su determinación. Para las determinaciones se utilizaron los siguientes equipos y reactivos:

- Solución de Fenol (5% m/v)
- Ácido sulfúrico comercial (99,8% m/m)
- Glucosa
- Baño termostático
- Espectrofotómetro Hach
- Vortex (Thorbel)
- Viales de vidrio con tapa a rosca Hach

Para la determinación se agregó 1 ml de muestra diluida en viales de vidrio, 0,5 mL de la solución de fenol y 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado, se mezcló en vórtex y se llevó a un baño a 70 °C durante 5 min. Posteriormente se dejó en reposo durante 30 min en baño a 30° C. Finalmente se leyó su absorbancia a 490 nm, llevando a cero el equipo con agua destilada. Para cada serie de determinaciones se realizó un blanco de reactivos, agregado la misma agua utilizada en la dilución de las muestras, en reemplazo de la muestra diluida. La construcción de la curva de calibrado se llevó a cabo de la misma manera, agregando soluciones de glucosa de concentración conocida y creciente en lugar de la muestra diluida.

Azúcares reductores.

Los azúcares denominados "reductores" son aquellos que poseen un grupo carbonilo libre formando un grupo hemiacetal, el cual les confiere la característica de poder reaccionar con otros compuestos. La glucosa y la fructosa son azúcares reductores, dado que poseen su grupo carbonilo disponible, mientras que las dextrinas sólo presentarán poder reductor correspondiente al monosacárido terminal, ya que los demás están enlazados a través del grupo carbonilo, no

estando disponible para ejercer su poder reductor. La determinación de azúcares reductores se realizó mediante la técnica colorimétrica descrita por Miller (1959), con ligeras modificaciones. Esta técnica también se conoce como "método del DNS", haciendo referencia al reactivo utilizado en la misma, el ácido 3,5-dinitrosalicílico. Éste reactivo es capaz de oxidar los azúcares reductores dando un producto coloreado. La reacción presenta un pico de absorción a 540 nm y puede determinarse en espectrofotómetro. Para determinar la concentración de azúcares reductores en las muestras se elaboró una curva de calibrado utilizando soluciones de glucosa de concentraciones conocidas y crecientes. Se estableció que el rango en el cual se mantenía la linealidad entre la absorbancia de las muestras y la concentración de glucosa fue de 0 a 1,2 g/L, por lo que las muestras fueron diluidas adecuadamente antes de su determinación. Los reactivos y equipos utilizados fueron:

- Solución de DNS (1% m/v DNS y 1% m/v NaOH)
- Glucosa
- Baño termostático
- Espectrofotómetro Hach
- Vortex (Thorbel)
- Viales de vidrio con tapa a rosca Hach

Para la determinación, en un vial se colocaron 335 μ L de solución de DNS y 335 μ L de muestra previamente diluida para ingresar en el rango de la curva de calibrado. Se mezcló con ayuda de un vórtex y se llevó a ebullición en un baño durante 5 minutos. Luego, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y se les agregó 3,3 mL de agua destilada. Finalmente, las muestras se homogeneizaron en vórtex y se procedió a la lectura de su absorbancia a 540 nm. El equipo se llevó a cero con agua destilada, mientras que para el blanco de reactivos se utilizó agua destilada en lugar de la muestra diluida. La construcción de la curva de calibrado se

llevó a cabo de la misma manera, agregando soluciones de glucosa de concentración conocida y creciente en lugar de la muestra diluida.

Nitrógeno alfa-amino libre (FAN)

La técnica que se utilizó para determinar los compuestos nitrogenados, que poseen un extremo alfa-amino libre, fue la técnica establecida como método estándar por la EBC (Lie, 1973) y se basa en la capacidad de la ninhidrina de reaccionar con estos compuestos a pH 6,7 a 100 °C. En la figura 2 se muestra el mecanismo de reacción entre la ninhidrina y los compuestos con nitrógeno alfa-amino libre.

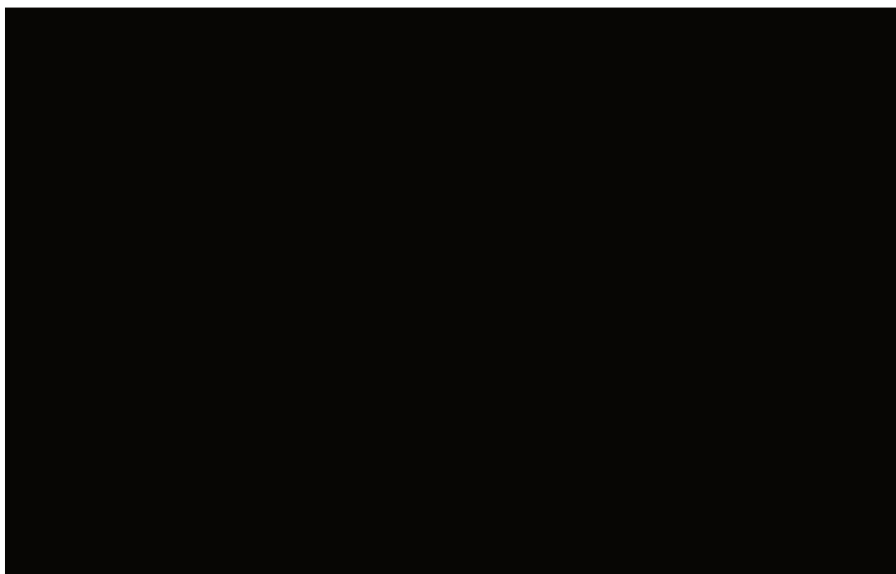


Figura 2: mecanismo de reacción entre la Ninhidrina y los compuestos que presentan un nitrógeno amoniacal en la posición alfa.

La ninhidrina es un agente oxidante que provoca una descarboxilación oxidativa de los alfa-aminoácidos, liberando CO₂ y un aldehído con un carbono menos del que tenía el compuesto original. La ninhidrina reducida, unida al amonio liberado, reacciona con la ninhidrina oxidada, formando un complejo azul-violeta, proporcional a la concentración de compuestos nitrogenados alfa-amino libre. El complejo formado tiene un pico de absorción a 570 nm y puede determinarse en

espectrofotómetro. Para determinar la concentración de las muestras se utilizó el método de un testigo, utilizando una solución de glicina como patrón, tomando en consideración que el rango es lineal entre 0 y 3 mg/L de compuestos nitrogenados alfa-amino libre. Para las determinaciones se utilizaron los siguientes reactivos y equipos:

- Solución de ninhidrina
- Solución de yodato de potasio
- Solución estándar de glicina
- Agua destilada
- Baño termostático
- Espectrofotómetro Hach
- Vortex (Thorbel)
- Viales de vidrio con tapa a rosca Hach

Para la determinación se colocó 0,5 mL de solución de ninhidrina y 0,5 mL de muestra previamente diluida para ingresar en el rango de la curva de calibrado en un vial de vidrio. Se mezcló con ayuda de un vórtex y se llevó a ebullición en un baño termostático durante 16 minutos. Transcurrido este tiempo, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y se les agregó 5 mL de solución de yodato de potasio. Finalmente, las muestras se homogeneizaron en vórtex y se procedió a la lectura de su absorbancia a 570 nm. El equipo se llevó a cero con agua destilada, mientras que para el blanco de reactivos se utilizó agua destilada en lugar de la muestra diluida. Se preparó un estándar cada vez que se realizó la técnica, partiendo de una solución de glicina correspondiente a 2 mg/L de nitrógeno alfa-amino libre, procesándolo de la misma manera que las muestras.

Proteínas totales

Se utilizó la técnica de Bradford para determinar la concentración de proteínas totales (Bradford, 1976). Ésta se basa en la capacidad del colorante

Capítulo 2 - Identificación y caracterización de efluentes.

Coomassie Brilliant Blue G-250 de unirse a las proteínas, formando un complejo de color azul, que posee un máximo de absorción a 595 nm y puede determinarse en espectrofotómetro. De esta manera, a través de la construcción de una curva de calibrado utilizando como patrón una solución de albumina sérica bobina (BSA por sus siglas en inglés), se puede establecer una correlación y determinar la concentración de proteínas totales de una muestra. El rango lineal utilizado fue de 0 y 25 µg de proteína. Se utilizaron los siguientes reactivos y equipos:

- Solución de Comasie Brilliant Blue G-250
- Solución estándar de BSA
- Agua destilada
- Espectrofotómetro Hach
- Viales de vidrio con tapa a rosca Hach

Para las determinaciones, en cada vial se colocaron 10 µL de solución de Comasie Brilliant Blue G-250, y 0.5 mL de muestra diluida para caer en el rango establecido preestablecido por la curva de calibrado (0-25 µg de proteínas). La mezcla se homogeneizó por inversión y se dejó reposar por 2 minutos. Luego se agregaron 3 mL de agua destilada. Finalmente, las muestras se homogeneizaron invirtiendo los viales y se procedió a la lectura de su absorbancia en espectrofotómetro a 595 nm. El equipo se llevó a cero con agua destilada, mientras que para el blanco de reactivos se utilizó agua destilada en lugar de la muestra diluida. La curva de calibrado se construyó de la misma manera, utilizando en lugar de las muestras, soluciones patrón de albumina sérica bobina (BSA), de concentraciones crecientes, para obtener valores entre 0 y 25 µg de proteínas.

Glicerol

El glicerol es uno de los principales subproductos de la fermentación alcohólica y uno de los mayores componentes de la cerveza luego del etanol y de los carbohidratos remanentes de la fermentación. Para su determinación se utilizó

un kit enzimático (Sociedad de Bioquímicos, Santa Fe, Argentina). Este consiste en un conjunto de enzimas que permiten oxidar el glicerol a di-hidroxiacetona-fosfato, produciendo además peróxido de hidrogeno en forma proporcional al glicerol presente. El peróxido reacciona con 4-aminofenazona y 4-clorofenol, para formar una quinoneimia con un típico color rojo. El compuesto formado tiene un pico de absorción a 510 nm y puede determinarse en espectrofotómetro. Para determinar la concentración de las muestras se utilizó el método de un testigo, utilizando una solución de estándar provista por el mismo kit enzimático, como patrón. El rango lineal descrito por el fabricante fue de 0 a 10 g/L. Se utilizaron los siguientes reactivos y equipos:

- Solución de enzimas (provista por el fabricante)
- Solución estándar (provista por el fabricante)
- Agua destilada
- Baño termostático
- Espectrofotómetro Hach
- Tubos de hemolisis

Para las determinaciones, en un tubo de hemólisis se colocaron 0,75 mL de solución de enzimas, y 20 μ L de muestra diluida de modo de caer en el rango (0-10 g/L). La mezcla se homogeneizó invirtiendo las muestras, y se llevo durante 5 minutos a baño termostático a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se agregó 1,25 mL de agua destilada y se homogeneizaron nuevamente por inversión. Finalmente se procedió a la lectura de su absorbancia a 510 nm. El equipo se llevó a cero con agua destilada. El blanco de reactivos se preparó de la misma manera, utilizando agua destilada en lugar de la muestra diluida. Se preparó un estándar cada vez que se realizó la técnica, partiendo de la solución estándar provista por el fabricante correspondiente a 2 g/L de glicerol, procesándolo de la misma manera que las muestras.

Demanda química de oxígeno (DQO)

La DQO es una medida indirecta del oxígeno necesario para oxidar toda la materia orgánica presente en una muestra. La técnica que se utilizó es la establecida por Eaton et al. (2005). Esta técnica se basa en el uso de un agente oxidante fuerte, dicromato de potasio, el cual por acción de la temperatura y en medio ácido, es capaz de oxidar toda la materia orgánica presente en la muestra, mientras que el ion Cr^{+6} de color anaranjado, se reduce a Cr^{+3} , de color verde, el cual tiene un máximo de absorción a 600 nm. De esta manera, a través de la construcción de una curva de calibrado utilizando como solución patrón el ftalato ácido de potasio, el cual tiene una DQO conocida y estable, se puede establecer una correlación y determinar la concentración de oxígeno equivalente de una muestra. Se construyó una curva de calibrado con concentraciones crecientes de ftalato ácido de potasio y se estableció que el rango lineal se mantuvo entre 0 y 1000 mg O_2/L . Para las determinaciones se utilizaron los siguientes reactivos y equipos:

- Solución de ácido para DQO
- Solución de dicromato de potasio para DQO
- Solución estándar de ftalato ácido de potasio
- Agua destilada
- Espectrofotómetro Hach
- Vortex (Thorbel)
- Viales de vidrio con tapa a rosca Hach
- Digestor de DQO

Para la determinación, en un vial de vidrio se colocó 1,5 mL de solución de dicromato de potasio para DQO, 3,5 mL de solución de ácido para DQO y 2,5 mL de muestra previamente diluida para ingresar en el rango de la curva de calibrado. Se mezcló con ayuda de un vórtex y se llevó al digestor de DQO, a 150 °C durante 2 h. Transcurrido este tiempo, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y se

procedió a la lectura de su absorbancia en espectrofotómetro a 600 nm. El equipo se llevó a cero con agua destilada, mientras que para el blanco de reactivos se utilizó agua destilada en lugar de la muestra diluida. Para la construcción de la curva de calibrado se opero de la misma forma, utilizando soluciones de concentraciones conocidas de ftalato acido de potasio en lugar de la muestra.

Resultados

Efluentes generados en el sector de fermentación y maduración

Cerveza #1

En el caso de la cerveza #1, durante el proceso fermentativo se realizan 4 extracciones (purgas) de los fermentadores:

- Purga de "Cold Trub"
- Purga para control
- Purga "Balling"
- Cosecha de levadura

A diferencia del "hot trub", precipitado que se forman durante la cocción del mosto, el "Cold Trub" se genera al enfriar el mosto dentro de los fermentadores, y su composición en base seca comprende un 50% de proteínas combinadas con un 15-25% de polifenoles y un 20-30% de carbohidratos de alto peso molecular. Pueden formarse de 150 a 300 mg/L de cerveza (Eblinger, 2012). Esta purga se realiza al poco tiempo de llenado el fermentador. Las purgas para control del proceso y las purgas de "Balling" son periódicas. La cosecha de levadura se realiza al final de la fermentación, y posee un contenido de sólidos de aproximadamente el 50%, principalmente levaduras. De esta purga, normalmente 1/3 se utiliza como inóculo para subsiguientes fermentaciones, descartándose el resto. La fracción

líquida de la purga descartada (efluente) posee un tenor alcohólico entre 6,5 y 7% v/v y representa 12 hL/tanque de fermentación (comunicación personal).

Luego la cerveza es enviada a reposo. En este proceso se realizan dos extracciones (purgas):

- Purga para control
- Purga de proceso

La purga para control importa un total de 1,8 hL/tanque de reposo, mientras que la fracción líquida de la purga de proceso comprende un total de 37,1 hL/tanque de reposo. Ambas contienen un tenor alcohólico de 6,5-7%v/v (comunicación personal).

Finalmente, la cerveza es enviada a estabilización. En esta etapa se realizan purgas cuya fracción líquida representa 5 hL/tanque de estabilización.

Se relevaron datos durante los años 2010 y 2011, y el promedio semanal de mermas de los procesos de fermentación, reposo y estabilización para la cerveza #1, fue de 540 hL. La fracción líquida de estas purgas, afectadas por un promedio de 30%v/v de sólidos, representa un volumen de 380 hL/semana.

Cerveza #2

En este caso sólo se realizan 2 purgas durante la fermentación

- Purga para control
- Purga "Balling"

Estas extracciones del tanque de fermentación son periódicas y se hacen con fines de control del proceso. A diferencia del proceso para la cerveza #1, no se realiza purga de "Cold trub", y la cosecha de levaduras se realiza durante el reposo. Durante el reposo se realizan las siguientes extracciones:

- Cosecha de Levadura

Capítulo 2 - Identificación y caracterización de efluentes.

- Purgas para análisis de laboratorio
- Purga "Balling"
- Purga de proceso

La cosecha de levadura posee un contenido de sólidos del 42%. Un tercio se reutiliza para inocular próximas fermentaciones, descartándose el resto, lo que representa una fracción líquida de 27 hL/tanque de reposo. La purga "Balling" y de control son periódicas. Finalmente la purga de proceso contiene en promedio un 30% de sólidos, y representa una fracción líquida de 77 hL/tanque de reposo. El tenor alcohólico de estas purgas está comprendido entre el 6.5 y el 7 %.

Se relevaron datos durante los años 2010 y 2011 y el promedio semanal de mermas de los procesos de fermentación y reposo para la cerveza #2, fue de 270 hL. La fracción líquida de estas purgas representa en promedio un volumen de 190 hL/semana.

Cerveza #3 y #4

Los procesos productivos de las cervezas 3 y 4 son muy similares. Durante la fermentación se realizan 5 extracciones:

- Purga para control
- Purga "Balling"
- Purga de "Cod Trub"
- Cosecha de Levadura
- Purga de Trasiego

Las extracciones para control y "Balling" se realizan periódicamente con fines de control del proceso. La purga "Cold Trub", se realiza horas después de llenado el fermentador.

La suma de las purgas cosecha de levadura y trasiego, descontando lo que se reutiliza para otras fermentaciones, representa 71,5 hL/tanque de fermentación, y

posee un tenor alcohólico de entre 6,5-7% v/v. Luego de la fermentación la cerveza se envía al reposo, donde se realizan dos extracciones:

- Purga para control
- Purga de proceso

La corriente para control se hace periódicamente. La fracción líquida de la purga de proceso representa 21 hL/tanque de reposo.

Se relevaron datos durante los años 2010 y 2011 y el promedio semanal de mermas de los procesos de fermentación y reposo para la cerveza #3 fue de 320 hL. La fracción líquida de estas purgas representa en promedio un volumen de 220 hL/semana.

Se relevaron datos durante los años 2010 y 2011 y el promedio semanal de mermas de los procesos de fermentación y reposo para la cerveza #4 fue de 500 hL. La fracción líquida de estas purgas representa en promedio un volumen de 350 hL/semana.

Efluentes generados en el sector de envasado

El llenado de las botellas comprende: la realización de vacío a las botellas, presurizado con CO₂ (a igual presión que la que se inyecta la cerveza), inyección de cerveza y posteriormente el despresurizado. Finalmente se inyecta agua para desalojar el oxígeno remanente y se tapa. Aquellos envases que tengan algún defecto pueden explotar en el proceso de presurizado o de llenado. Las máquinas llenadoras poseen un programa automático que al detectar la explosión de una botella, realiza en las siguientes tres vueltas un semi-llenado de las botellas anteriores y posteriores a la válvula en donde estalló la botella, lavando con agua las válvulas con posibles restos de vidrio. Los pasos siguientes son pasteurizado, etiquetado e impresión de datos en la etiqueta (número de lote, fecha de elaboración y fecha de vencimiento) de las botellas. A continuación el envase es

controlado por un inspector automático, el cual descarta las botellas con algún faltante de alguna de las etiquetas, botellas conteniendo menor nivel de cerveza o botellas con pérdida o menor presión en su interior. Finalmente las botellas que se encuentran en buenas condiciones, se empacan. Las latas siguen un proceso similar.

Las botellas o latas que no cumplen algunas de las condiciones previstas (mal llenado, etiquetas mal colocadas, botellas con baja presión, latas deformadas, etc.) son separadas por los detectores correspondientes. Estos descartes se agrupan como cerveza de descarte o "derrames" dentro de la empresa, y actualmente son enviados al sistema convencional de tratamiento de efluentes.

Se realizó un relevamiento durante los años 2010-2011 y el promedio de cerveza derramada en la sección de envasado fue de 1100 hL por mes, lo que representa 262 hL/semana.

Efluentes generados en el sector de expedición y descarga

Este sector recibe y almacena la cerveza denominada "de devolución", que consta de los productos que abandonan la planta pero que, o bien por haberse detectado algún problema con posterioridad, o por encontrarse cercana o pasada su fecha de vencimiento retornan a la misma, de manera de seguir la política de calidad de la empresa. Se relevaron datos del año 2010-2011, y la cerveza que retorna fue en promedio de 210 hL por mes, lo que representa 50 hL/semana.

Efluentes generados debido a lotes retenidos por políticas de calidad

Los efluentes denominados "Lotes dados de baja" dentro de la empresa, consisten en cerveza ya envasada, que suscitados diferentes problemas, tales como calidad del producto, tiempo de pasteurización excedido, latas deformadas luego de envasadas, etc., se dan de baja y nunca abandonan la cervecería, siendo enviadas a la planta de tratamiento convencional de efluentes.

Capítulo 2 - Identificación y caracterización de efluentes.

Se recolectaron datos durante el período 2009-2010, y el promedio de cervezas dadas de baja, alcanzo los 300 hL por mes, lo que representa 71 hL/semana.

Resumen de los efluentes excedente de levadura y descarte de cerveza generados

En la tabla 3 se presenta un resumen de los volúmenes de excedente de levaduras y descartes de cerveza.

Tabla 3: Resumen de los volúmenes de subproductos excedente de levaduras y descarte de cerveza, generado en la industria cervecera adoptada como caso de estudio.

Efluente	Sector	Clase de cerveza	Fracción líquida [hL/semana]
Excedente de levadura	Fermentación, maduración y estabilización	Cerveza #1	380
		Cerveza #2	190
		Cerveza #3	220
		Cerveza #4	350
		Total excedente de levadura	1140
Descarte de cerveza	Envasado	Todas	262
	Expedición y descarga	Todas	50
	Lotes retenidos	Todas	71
	Total descarte de cerveza	383	

Caracterización de la fracción líquida de los distintos efluentes

En la tabla 4 se presenta el contenido de etanol, azúcares totales, azúcares reductores, FAN, proteínas, glicerol y DQO de la fracción líquida de los efluentes estudiados.

Capítulo 2 - Identificación y caracterización de efluentes.

Tabla 4: Resumen de la caracterización de la fracción líquida de los subproductos estudiados

Efluentes		Parámetros de interés					
Clases	Etanol	Azúcares	Azúcares	FAN	Proteínas	Glicerol	DQO
	(%v/v)	totales (g/L)	reductores (g/L)	(mg/L)	totales (g/L)	(g/L)	(mgO ₂ /L)
Excedente de levaduras	6,9	42,1±1,4	12,5±0,5	123±20	0,454±0,028	11,8±0,4	167600±1250
Cerveza de descarte	#1	5	26,4±1,3	8,8±0,7	97±18	0,365±0,007	9,0±0,2
	#2	4,9	26,6±2,4	6,6±0,4	89±14	0,297±0,012	8,8±0,2
	#3	4,7	33,6±2,6	9,6±0,4	89±11	0,335±0,029	8,6±0,2
	#4	4,7	27,2±1,7	8,1±0,7	85±7	0,295±0,026	8,6±0,3

Capítulo 2: Caracterización de efluentes

De los valores obtenidos en la caracterización de los diferentes efluentes, se observa que el componente mayoritario, después del agua, es el etanol. Le siguen en concentración los carbohidratos remanentes de la fermentación y por último el glicerol, generado como producto secundario durante la fermentación alcohólica.

Los valores de DQO de la fracción líquida de estos efluentes, 167600 mgO₂/L y 120900 mgO₂/L para el excedente de levaduras y la cerveza de descarte respectivamente, representan entre 30 y 50 veces el valor de DQO promedio que poseen las aguas residuales de este tipo de industria (Filladeau, 2006). Si se tiene en cuenta además que estos efluentes (excedente de levaduras y cerveza de descarte), se generan de manera discontinua, e incluso con picos que pueden triplicar los caudales promedio diarios o semanales, el tratamiento de estas corrientes en conjunto con las aguas residuales representa un problema para las instalaciones de tratamiento, dando origen además a la necesidad de ecualizar los caudales en volúmenes suficientemente grandes de modo que la DQO de ingreso a la planta de tratamiento (aeróbica o anaeróbica) no se vea modificada significativamente.

En la tabla 5 se presentan los caudales y la carga orgánica anual de las fracciones líquidas de éstos efluentes, generados en la industria adoptada como caso de estudio.

Tabla 5: Carga orgánica anual de la fracción líquida de los subproductos estudiados

	Caudal	DQO	Carga Orgánica
	(L/año)	(mgO₂/L)	(TonO₂/año)
Excedente de levadura	5928000	167600	994
Descarte de cerveza	1991600	120900	241
Totales			1235

Finalmente, en la tabla 6 se presenta el aporte teórico a la DQO de los distintos compuestos mayoritarios presentes en los efluentes.

Capítulo 2: Caracterización de efluentes

Tabla 6: Aporte teórico de cada uno de los compuestos a la DQO total de la fracción líquida de los efluentes en estudio

Compuestos	DQO teórica (mgO ₂ /mg compuesto)	Excedente de levaduras		Cerveza de descarte (promedio)	
		Aporte (mgO ₂ /L)	%	Aporte (mgO ₂ /L)	%
		Etanol	2,086	113500	65
Azúcares totales	1,066	44900	26	30300	25
Glicerol	1,217	14300	8	10700	9
Proteínas y FAN*	1,476	800	1	650	1
Totales		173500	100	121050	100

*la composición media utilizada para establecer la DQO teórica de proteínas y FAN, expresada como porcentaje del peso fue: C (52%), O (24%), N (16,6%) e H (7,4%).

Discusión

Los valores obtenidos para la caracterización de la fracción líquida de los efluentes "excedente de levaduras" y "cerveza de descarte" en la industria cervecera adoptada como caso de estudio, coinciden con valores previamente reportados en la literatura (Hough, 1990; Kunze, 1999; Briggs et al., 2004; Preedy, 2009; Eblinger, 2012).

Éstos poseen un elevado contenido de fuentes de carbono, fácilmente biodegradables, como etanol, carbohidratos y glicerol. Estas características permiten analizar estas corrientes desde dos puntos de vista:

1. Como un efluente: visión que predomina hoy en la mayoría de las industrias cerveceras. Dado su alta carga orgánica fácilmente biodegradable, estos podrían ser tratados por métodos biológicos, pero las instalaciones inadecuadas sumado a la estacionalidad de su generación, lleva a que las industrias intenten desprenderse de estos efluentes, fundamentalmente comercializándolos como alimento para ganado,

Capítulo 2: Caracterización de efluentes

evitándose de esta forma problemas en el funcionamiento de sus instalaciones de tratamiento.

2. Como materia prima para distintos procesos productivos: su elevado contenido de fuentes de carbono, permite visualizar estas corrientes como medio de cultivo en procesos fermentativos que generen productos con valor agregado fácilmente separables, y de esta manera eliminar o reducir los compuestos que aportan carga orgánica, de modo que los efluentes resultantes de estos nuevos procesos productivos puedan ser tratados sin inconvenientes en las instalaciones convencionales de este tipo de industria.

El primer proceso propuesto y estudiado en esta tesis fue la recuperación del etanol contenido en los efluentes. Dado que éste es el responsable del 65 % de la DQO de los mismos, la sola remoción del etanol permitiría reducir la carga orgánica drásticamente, obteniendo simultáneamente un producto con valor agregado. Este proceso no contempla la utilización de los demás compuestos orgánicos.

Los carbohidratos remanentes de la fermentación representan el segundo compuesto tanto en concentración, como en aporte a la DQO total del efluente. Teniendo esto en cuenta, el segundo proceso estudiado fue la utilización de estos carbohidratos para la producción de etanol. Si éstos pudieran ser convertidos a etanol, y luego removidos del medio, se podría lograr una reducción cercana al 90 % de la DQO de estas corrientes, obteniendo productos con valor agregado.

Finalmente, el tercer proceso estudiado fue la producción de ácido acético a partir del etanol contenido en estos subproductos. Si bien esta alternativa utiliza parcialmente los demás compuestos orgánicos (carbohidratos, glicerol), la totalidad de la fracción líquida forma parte del producto obtenido, vinagre de cerveza, reduciendo e incluso eliminando las necesidades de tratamiento de estas corrientes.

Capítulo 2: Caracterización de efluentes

Cabe destacar que las industrias comercializan estos subproductos principalmente por su contenido de levaduras; y que los procesos estudiados en la presente tesis utilizan la fracción líquida de estos subproductos, separando previamente los sólidos, principalmente levaduras, por lo que éstos procesos no sustituyen el posible beneficio económico obtenido por la venta de los subproductos, sino que lo complementan, recuperando y produciendo nuevos productos con valor agregado.

Capítulo 3: Recuperación de etanol a partir de efluentes de cervecería.

Introducción

El etanol representa el 65% de la DQO de la fracción líquida de los efluentes excedente de levaduras y descarte de cerveza. El estudio de los procesos para separar el etanol a partir de medios donde el agua representa más del 90% de la fracción líquida, se ha abordado profusamente en la literatura científica (Ahmetović et al., 2010; Kiss et al., 2012; Martín y Grossman, 2013)

Entre las principales estrategias utilizadas para la separación del etanol a partir de soluciones acuosas o medios de fermentación pueden citarse: destilación, separación por corriente de vapor, per-vaporación, adsorción, extracción líquido-líquido, separación por corriente de gas (Vane, 2008). De todas estas tecnologías, la destilación tiene algunas ventajas como:

- Alta recuperación de etanol, generalmente superior al 99%
- Alto factor de concentración
- Eficiencia energética adecuada
- No presenta inconvenientes de escalado.
- El estudio y comprensión del proceso se encuentra en estadios que permiten la simulación de los mismos a través de software específicos, con resultados muy próximos a la realidad observada a nivel industrial.

En este capítulo se presenta el estudio de factibilidad de recuperar el etanol contenido en la fracción líquida de los efluentes (cerveza de descarte y fracción líquida del excedente de levaduras), y su impacto sobre la reducción de la DQO de estas corrientes. Dado que durante la fermentación alcohólica se generan otros subproductos volátiles en bajas concentraciones, se realizaron ensayos experimentales en un equipo de

destilación a escala laboratorio para extraer todos los componentes volátiles de los efluentes y establecer la composición de los mismos. Con los resultados obtenidos se analizaron distintos esquemas de destilación, similares a los existentes en las industrias de producción de bioetanol a partir de caña o cereales, y se realizaron simulaciones de los mismos para obtener alcoholes de distintas calidades, que podrían ser utilizados como materia prima en otros procesos productivos, o ser comercializados. Finalmente se realizó un estudio de factibilidad técnico-económico de los procesos propuestos y del impacto de la remoción del etanol sobre la reducción en la carga orgánica de la fracción líquida de los subproductos.

Materiales y métodos

Separación de los componentes volátiles por destilación

Para establecer la concentración de compuestos volátiles que acompañan al etanol en los subproductos estudiados, se utilizó un dispositivo de destilación "batch". Considerando la similitud de la fracción líquida de los efluentes en cuanto a su composición porcentual, y el posible mezclado previo al tratamiento de recuperación de etanol a nivel industrial, se adoptó una mezcla compuesta por un 75% correspondiente a la fracción líquida del excedente de levaduras y un 25% a la cerveza de descarte. Esta proporción se basó en los datos relevados sobre la generación de estos subproductos en la industria adoptada como caso de estudio.

El dispositivo de destilación constó de una manta calefactora de AFCARO MCR 2000 M, balones de destilación de 500 mL y 2 L, una columna de fraccionamiento, un condensador de dedo frío responsable de establecer un reflujo para favorecer la separación de los compuestos volátiles, un condensador y un recipiente colector del destilado.

Tres muestras de la mezcla de efluentes se destilaron en el equipo, hasta que la temperatura de tope de la columna alcanzó los 100°C. El destilado se conservó en frascos estériles hasta su análisis posterior.

La composición del producto así obtenido se analizó en el Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV) por cromatografía gaseosa.

Simulación del proceso de recuperación de etanol por destilación

A partir de los datos obtenidos en el análisis del destilado, se reconstituyó la composición de la fracción líquida de la mezcla de los subproductos, teniendo en cuenta los compuestos de interés en el proceso de separación del etanol por destilación. Para las simulaciones, se adoptó un caudal 7920000 kg/año, operando la planta 24 h al día, con 330 días de operación por año.

Para la simulación preliminar de las diferentes columnas de destilación se empleó el módulo DSTWU de Aspen Plus, el cual utiliza un método aproximado basado en las ecuaciones y correlaciones de Winn-Underwood-Gilliland. Este módulo proporciona además una estimación inicial del número mínimo de etapas teóricas, de la relación mínima de reflujo, de la localización de la etapa de alimentación y de la distribución de los componentes. El cálculo riguroso de las condiciones de operación en las columnas de destilación se llevó a cabo con el módulo RADFRAC basado en el método "inside-out" que utiliza las ecuaciones MESH, el cual implica la solución simultánea de las ecuaciones de balance de masa (M), las ecuaciones de equilibrio de fases (E), las expresiones para la sumatoria de las composiciones (S) y las ecuaciones de balance de calor (H) para todos los componentes en todas las etapas de la columna de destilación. Para la especificación de los parámetros de operación de las columnas de destilación se emplearon, además de los resultados arrojados por el módulo DSTWU, datos reportados por proveedores de sistemas de destilación locales, utilizados frecuentemente a nivel industrial.

Capítulo 3 - Recuperación de etanol a partir de efluentes de cervecería.

Se propusieron y simularon 3 Esquemas para la recuperación de etanol, que permiten obtener como producto, soluciones de etanol-agua con un contenido de etanol de: 30-40 %m/m (esquema 1), 92% m/m (esquema 2) y alcohol potable o grado alimentario (esquema 3). En el Anexo I, se presentan las especificaciones requeridas para el etanol potable, por el Código Alimentario Argentino.

Todos los esquemas se simularon de manera de obtener una recuperación del etanol en cada columna, superior al 99 %. Se utilizaron los resultados de simulación para estimar el consumo energético de cada esquema.

Determinación de la DQO de la fracción líquida de los efluentes antes y después de la separación del etanol

Para establecer la reducción en la carga orgánica, dado que el proceso de destilación cambia el volumen de efluentes, se determinó la DQO y el volumen de la fracción líquida antes y después de la destilación

Evaluación económica

Para establecer los costos operativos involucrados en los procesos de separación de etanol (consumo de energía y servicios auxiliares), se utilizaron los datos de consumos de la salida de simulación para cada caso evaluado (Bayramoglu et al., 2004; Martin y Grossmann, 2012; Moncada et al., 2013). Si bien los esquemas simulados parten de la fracción líquida de la mezcla de efluentes, en la evaluación económica se contempló el consumo de energía de una centrífuga (tipo decanter) necesaria para separar los sólidos del excedente de levaduras. Se estimó un gasto en electricidad por el consumo en este equipo de \$50000/año, valor común en todos los esquemas estudiados. El costo de inversión de capital se estimó en \$385000, valor obtenido a partir de presupuestos solicitados por la empresa.

Capítulo 3 - Recuperación de etanol a partir de efluentes de cervecería.

Se contemplaron además, los costos de capital correspondientes a las distintas instalaciones de destilación y los tanques necesarios para el funcionamiento del sistema, también proporcionados por proveedores locales.

En la evaluación económica se contempló también el costo operativo del tratamiento de efluentes de las corrientes que siguen este destino en cada caso. Se consideró una remoción del 100% de la carga orgánica de los efluentes. Se analizaron 2 escenarios, uno que contempla la inversión de capital necesaria para montar una planta de tratamiento anaeróbico, similar a la instalada en la empresa adoptada como caso de estudio, con un costo de 8550 \$/m³, valor provisto por proveedores locales, y otro donde se asume que el efluente del proceso sería tratado en las instalaciones convencionales que dispone la empresa. Se considero una producción de metano de 0.3 m³/Kg de DQO removida, y un beneficio de 0.29 \$/m³ metano, valor obtenido de la tarifa industrial en argentina para industrias. No se consideró la inversión de capital necesaria para proveer los servicios (Gas, vapor, electricidad, agua, etc.), asumiendo que los mismos son provistos por los sistemas existentes en la empresa adoptada como caso de estudio.

Los costos de los servicios, como así también del tratamiento de efluentes fueron obtenidos por comunicación personal a partir de los costos afrontados en la empresa adoptada como caso estudio y se presentan en la tabla 7. Se utilizó un factor de conversión de 1 U\$D = 8.55 \$ Argentinos.

Tabla 7: Costos de las materias primas y de los principales equipos utilizados en el análisis económico de los procesos propuestos.

Costos variables		
Reactivos/Servicios/otros	Unidad	Costo unitario (\$)
H ₂ SO ₄	ton	2030 ^a
KOH	ton	3485 ^a
Vapor de baja presión	ton	145
Electricidad	KWh	0.5
Tratamiento de efluentes	ton O ₂ removida	610
Empleados	mes	17420

Beneficios		
Etanol	L	8.5 ^b
Gas (metano)	m ³	0.29
Inversiones de capital		
Centrífuga (decanter)		410000 ^c
Tratamiento anaeróbico	m ³	8550 ^c
Hidrólisis y fermentación		2885000 ^d
Sistema destilación (esquemas 1 y 4)		695000 ^c
Sistema destilación (esquemas 2 y 5)		1070000 ^c
Sistema destilación (esquemas 3 y 6)		1440000 ^c
Tanques	m ³	2670 ^c

^aPrecios internacionales; ^bPrecio correspondiente al publicado por la Secretaría de energía de la Nación multiplicado por un factor de seguridad de 0.9; ^cPrecios obtenidos de proveedores locales; ^dPrecio estimado según (Fredeick et al., 2008).

Resultados

Separación de los componentes volátiles por destilación

En la tabla 8 se presenta la composición de la mezcla destilada:

Tabla 8: Concentración relativa de los compuestos volátiles que acompañan al etanol en la fracción líquida de los subproductos.

Compuesto	Concentración (mg/g _{et})	Concentración para una concentración de etanol del 6,38 %v/v a 20°C (mg/L)
Acetaldehído	0,311 ± 0,109	15,7 ± 5,5
Acetato de etilo	0,867 ± 0,307	43,7 ± 15,5
Metanol	0,043 ± 0,040	2,2 ± 2,0
Propanol	0,327 ± 0,010	16,5 ± 0,5
Iso-butanol	0,308 ± 0,011	15,5 ± 0,5
Alcohol Iso-amilico	1,568 ± 0,774	79,1 ± 39,1

Capítulo 3 - Recuperación de etanol a partir de efluentes de cervecería.

Los valores reportados en la tabla, obtenidos a partir de la destilación batch del efluente, se cotejaron con valores obtenidos en el laboratorio de análisis de calidad de la empresa.

Simulación del proceso de recuperación de etanol

El primer esquema presentado en la figura 3, se compone de una bomba que impulsa el efluente desde el tanque de almacenamiento hasta una columna despojadora de etanol con re-hervidor y condensador, encargada de recuperar el etanol presente en los efluentes, con el objetivo de obtener por el tope un producto con una concentración de etanol de 30-40 %m/m. Previo al ingreso a la columna, el efluente intercambia calor con la descarga. La alimentación se realiza en el primer plato.

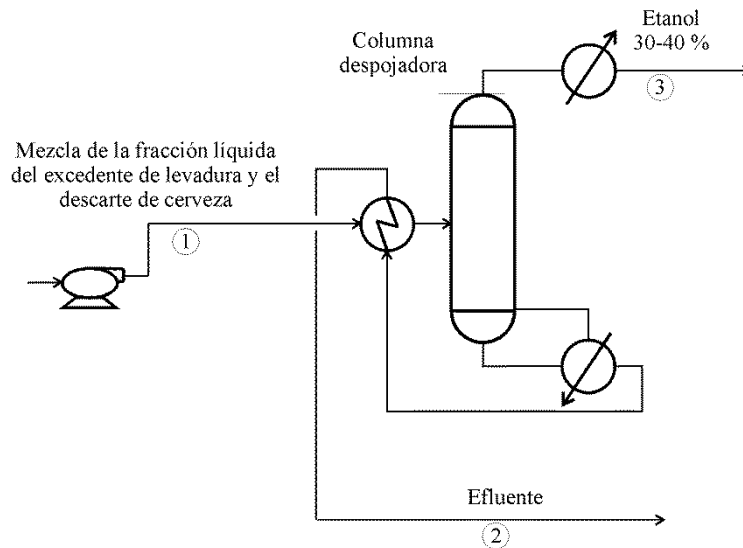


Figura 3: esquema 1 para la recuperación del etanol a partir de la fracción líquida de los subproductos estudiados.

En la tabla 9 se muestra la composición de las principales corrientes obtenidas de la salida de simulación.

Capítulo 3 - Recuperación de etanol a partir de efluentes de cervecería.

Tabla 9: Flujos máxicos de las principales corrientes obtenidas de la simulación de la recuperación de etanol del esquema 1.

Compuestos	Flujo máxico de las corrientes (Kg/h)		
	1	2	3
Agua	949,37	859,87	89,50
Etanol	50,39	0,13	50,26
Acetaldehído	0,02	0,00	0,02
Acetato de etilo	0,04	0,00	0,04
Metanol	0,00	0,00	0,00
Propanol	0,02	0,00	0,02
Isobutanol	0,02	0,00	0,02
Butanol	0,07	0,00	0,07
Alcohol isoamílico	0,08	0,00	0,08
Temperatura (°C)	5,00	37,00	30,00
Caudal (kg/h)	1000,00	860,00	140,00

El esquema simulado permite obtener un producto con una concentración de etanol de 35.9 %m/m. El consumo de calor en el re-hervidor de la columna en estas condiciones fue 78107 kcal/h, mientras que el consumo de electricidad para las bombas fue 9.70E-3 KW. Con la configuración simulada se logra obtener una recuperación superior al 99,5% del etanol que ingresa al sistema, con un consumo específico de 1554 Kcal/kg etanol anhidro, valor acorde a los rangos mencionados en la literatura (Marriaga, 2009).

El segundo esquema analizado presentado en la figura 4, a diferencia del primer esquema, posee una primer columna despojadora que envía la corriente de tope en forma de vapor a una segunda columna, rectificadora, la cual es encargada de elevar la concentración de etanol por encima del 92 %m/m, separando por una extracción lateral los alcoholes superiores.

Capítulo 3 - Recuperación de etanol a partir de efluentes de cervecería.

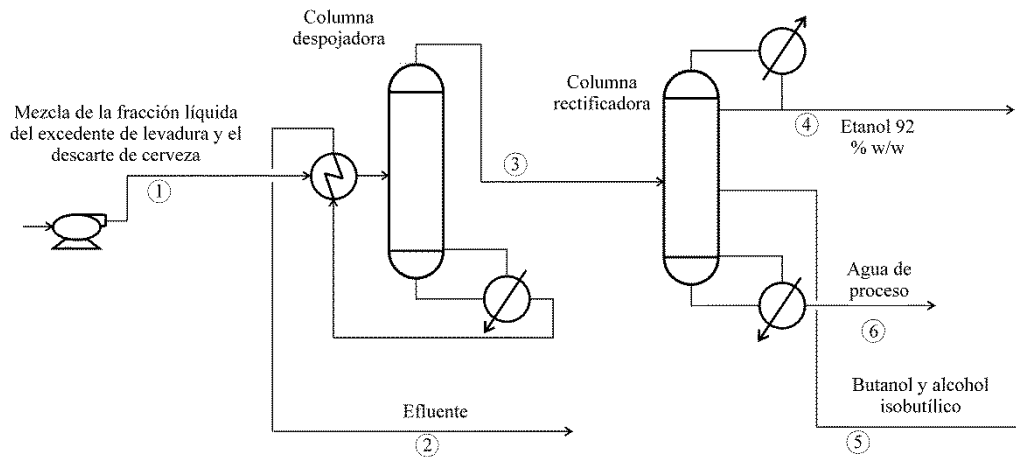


Figura 4: esquema de recuperación de etanol 92 %m/v a partir de la fracción líquida de los subproductos estudiados.

En la tabla 10 se muestra la composición de las principales corrientes obtenidas de la salida de simulación.

Tabla10: Flujos máxicos de las principales corrientes obtenidas de la simulación de la recuperación de etanol 92% m/v.

Compuestos	Flujo máxico de las corrientes (Kg/h)					
	1	2	3	4	5	6
Agua	949,37	860,00	89,37	4,34	0,52	84,52
Etanol	50,39	0,00	50,39	50,18	0,13	0,08
Acetaldehído	0,02	0,00	0,02	0,02	0,00	0,00
Acetato de etilo	0,04	0,00	0,04	0,04	0,00	0,00
Metanol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Propanol	0,02	0,00	0,02	0,02	0,00	0,00
Isobutanol	0,02	0,00	0,02	0,00	0,01	0,00
Butanol	0,07	0,00	0,07	0,00	0,07	0,00
Alcohol isoamílico	0,08	0,00	0,08	0,00	0,08	0,00
Temperatura (°C)	25	37	95	30	87,85	99,9
Caudal kg/h	1000	860	140	54,6	0,8	84,6

Capítulo 3 - Recuperación de etanol a partir de efluentes de cervecería.

El esquema simulado permite obtener un producto con una concentración de etanol de 91,90 %m/m, en el cual son removidos por la extracción lateral el 80 % del isobutanol, el 97 % del butanol y el 100 % del alcohol isoamílico. El consumo de calor de los re-hervidores de las columnas despojadora y rectificadora, fue de 78005 y 24601 Kcal/h respectivamente, totalizando 102606 Kcal/h, mientras que el consumo de electricidad en la bomba fue 9.70E-3 KW. Con la configuración simulada se logra obtener una recuperación de etanol superior al 99,5% del que ingresa al sistema, con un consumo específico de 2044 Kcal/kg etanol anhidro, valor que cae en los rango recomendados.

El tercer esquema estudiado presentado en la figura 5, además de las columnas de destilación contempladas en el esquema 2 comprende una tercera columna encargada de elevar la concentración de etanol a valores superiores al 95%v/v, para obtener alcohol potable o de uso alimentario. Esta posee una extracción lateral para completar la separación de los alcoholes superiores hasta los valores de especificación.

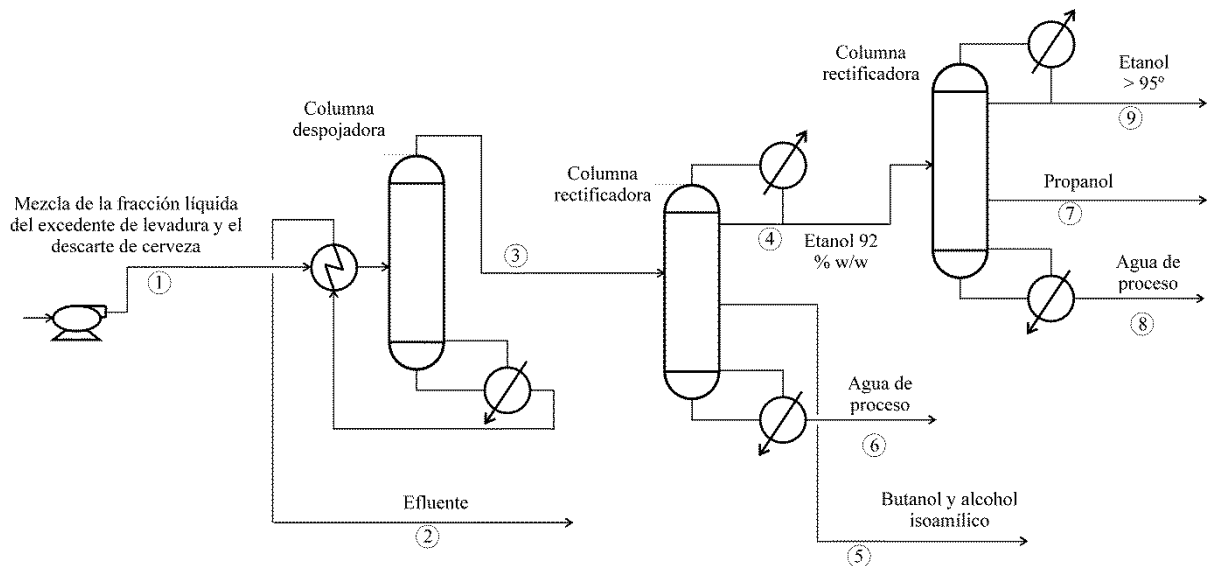


Figura 5. Esquema de recuperación de alcohol potable a partir de la fracción líquida de los subproductos estudiados.

Capítulo 3 - Recuperación de etanol a partir de efluentes de cervecería.

El esquema simulado permite obtener un producto con una concentración de 94 %m/m, logrando una separación del 60% del propanol y el remanente de butanol e isobutanol mediante una extracción lateral, cumpliendo las especificaciones para el alcohol de uso alimentario.

El consumo de calor obtenido en los re-hervidores de las columnas despojadora y rectificadoras, fue de 78005, 24600 y 48980 Kcal/h respectivamente, totalizando un consumo de 151585 Kcal/h, mientras que el consumo de electricidad para las bombas fue $9.70E-3$ KW. Con la configuración simulada se logra obtener una recuperación superior al 99,5% del etanol que ingresa al sistema, con un consumo específico de 3021 Kcal/Kg etanol anhidro.

En la tabla 11 se muestra la composición de las principales corrientes obtenidas de la salida de simulación.

Capítulo 3 - Recuperación de etanol a partir de efluentes de cervecería.

Tabla 11: Flujos másicos de las principales corrientes obtenidas de la simulación de la recuperación de etanol potable.

Compuestos	Flujo másico de las corrientes (Kg/h)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Agua	949,37	859,93	89,44	4,35	0,50	84,60	0,08	1,10	3,16
Etanol	50,39	0,07	50,32	50,17	0,15	0,00	0,00	0,00	50,17
Acetaldehído	0,02	0,00	0,02	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02
Acetato de etilo	0,04	0,00	0,04	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04
Metanol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Propanol	0,02	0,00	0,02	0,02	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01
Isobutanol	0,02	0,00	0,02	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
Butanol	0,07	0,00	0,07	0,00	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00
Alcohol isoamílico	0,08	0,00	0,08	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00
Temperatura (°C)	25,00	37,00	95,01	78,20	175,18	100,00	89,36	100,00	30,00
Caudal kg/h	1000,00	860,00	140,00	54,60	0,80	84,60	0,10	1,10	53,40

DQO de los efluentes antes y después de la separación del etanol

Se realizó la destilación de la mezcla de efluentes, y se determinó la DQO antes y después de la separación del etanol y otros compuestos volátiles.

Tabla 12: DQO y carga orgánica de la mezcla de las fracciones líquidas adoptadas para la destilación y de la vinaza obtenida en la columna despojadora.

Parámetros	Valores
DQO inicial (mgO ₂ /L)	155900 ± 1200
DQO Final (mgO ₂ /L)	72150 ± 1100
Volumen inicial (mL)	1000 ± 10
Volumen final (mL)	860 ± 10
Remoción DQO (%)	53,72
Remoción carga orgánica (%)	60,20

De la tabla se puede observar que la separación del etanol por destilación permite obtener una reducción de la DQO de un 53.72 % y una reducción de la carga orgánica del 60 %, mediante la obtención de un producto con valor agregado como el etanol.

Evaluación económica

Se realizó un análisis económico teniendo en cuenta el costo operativo de los diferentes esquemas simulados y la producción de etanol en cada caso. El costo de electricidad consumida en las bombas es despreciable frente a los otros costos considerados, no así el costo de separación de los sólidos iniciales, que se mencionó anteriormente en materiales y métodos. Se tuvo en cuenta además el costo de 4 empleados (1 por turno de 8 horas y un encargado general). Se consideraron además para todas las alternativas 2 tanques, uno con capacidad para 2 días de almacenamiento de efluente y otro para 7 días de almacenamiento de etanol. El tanque de almacenamiento de efluente fue igual para las tres alternativas, de un volumen de 50

Capítulo 3 - Recuperación de etanol a partir de efluentes de cervecería.

m³, los tanques de almacenamiento de producto fueron de 24, 9.5 y 9 m³ para los esquemas 1, 2 y 3 respectivamente.

En la tabla 13 se resumen los costos operativos y de inversión de capital para cada una de las alternativas evaluadas, incluyendo una amortización en un período de 15 años para los equipos contemplados en la inversión de capital.

Se determinó el valor actual neto (VAN) y el período de recupero del capital, como principales indicadores económicos, analizando un lapso de 15 años con períodos de pago anual y una tasa de descuento igual a la tasa del banco nación para créditos a empresas, del 19%, 0.19. Es de destacar que un periodo de 4 años (48 meses), el plazo máximo de recupero del capital adoptado por industriales para llevar adelante una inversión de capital (comunicación personal).

Tabla 13: resumen de la evaluación económica de las alternativas propuestas para la recuperación del etanol de la fracción líquida de los subproductos estudiados.

	Esquema 1	Esquema 2	Esquema 3
<i>Costos variables</i>	\$/año	\$/año	\$/año
Vapor	174000	235650	351220
Tratamiento de efluentes	300000	300000	300000
Empleados	836100	836100	836100
Electricidad	50000	50000	50000
<i>Otros costos</i>			
Amortización sin UASB	86839	109257	133969
Amortización con UASB	175189	197607	222319
Total anual	1622128	1728614	1893608
<i>Crédito</i>			
Etanol	4321290	4321290	4321290
Gas (metano)	44754	44754	44754
Utilidad anual sin UASB	2919105,3	2835037	2694755
Utilidad anual con UASB	2830755,3	2746687	2606405
<i>Inversión de capital</i>	\$	\$	\$
Reactor UASB	1325250	1325250	1325250

Capítulo 3 - Recuperación de etanol a partir de efluentes de cervecería.

Centrífuga Decanter	410000	410000	410000
Sistema destilación	695000	1070000	1442000
Tanques	197580	158860	157530
Total sin UASB	1302580	1638860	2009530
Total con UASB	2627830	2964110	3334780
<i>Variables económicas</i>			
Sin UASB			
TIR (anual)	224 %	173%	134%
VAN	10866031 \$	10238983 \$	9350565 \$
Recupero del capital (meses)	5	7	9
Con UASB			
TIR (anual)	108%	93%	78%
VAN	9390374 \$	8763326 \$	7874907\$
Recupero del capital (meses)	11	13	15

Como se puede observar de la tabla, las tres alternativas analizadas presentan un VAN mayor a cero, incluso en los escenarios donde se contempla la inversión para un UASB donde tratar el efluente generado. Todas las TIR, son ampliamente superiores al costo de oportunidad del capital (19 % anual), lo pone de manifiesto la gran rentabilidad de los procesos propuestos en los esquemas 1, 2 y 3. Como se mencionó anteriormente, aún en el caso más complejo, el período de recupero del capital es de 15 meses, valor muy inferior a los 4 años requeridos como mínimos para llevar adelante una inversión.

Conclusiones parciales

- Se estudió y demostró la factibilidad técnica de recuperar el etanol contenido en la fracción líquida de los subproductos excedente de levaduras y cerveza de descarte, mediante destilación convencional.
- La remoción del etanol contenido permitió disminuir un 60 % la carga orgánica de éstas corrientes.

Capítulo 3 - Recuperación de etanol a partir de efluentes de cervecería.

- Se determinaron los compuestos que acompañan al etanol a través del análisis por cromatografía gaseosa de las muestras, y se utilizaron los resultados para los análisis de simulación.
- Se simularon 3 esquemas alternativos para la recuperación del etanol contenido en los efluentes, con el objeto de obtener como productos soluciones de etanol y agua con concentraciones de etanol del 35,9 %m/m, 92,0 %m/m y 94,1 %m/m, respectivamente, productos que pueden ser comercializados o utilizados como materia prima dentro de la empresa para otros procesos productivos. En los esquemas 2 y 3, se utilizaron extracciones laterales de las columnas de rectificación para separar los alcoholes superiores y llevar el etanol obtenido a especificación según el Código Alimentario Argentino.
- Se realizó un análisis económico de cada una de las alternativas estudiadas, utilizando los datos de consumo de calor obtenidos de la simulación para determinar los costos variables de cada una de las tres alternativas, y considerando además los principales costos de inversión de capital. Los indicadores TIR, VAN y período de recupero del capital demostraron que todas las alternativas analizadas son ampliamente rentables y viables desde el punto de vista económico, con períodos de recupero del capital inferiores a los 9 meses.

Capítulo 4: Fermentación alcohólica de los carbohidratos presentes en vinazas de cervecería como proceso alternativo para la reducción de la DQO.

Introducción

El proceso abordado en el capítulo 3 permite recuperar el etanol contenido en la fracción líquida de los efluentes, produciendo a su vez nuevos efluentes, correspondientes a las corrientes eliminadas por el fondo de las columnas de destilación de los esquemas analizados. De todas esas corrientes, el fondo de la columna despojadora, denominada en adelante "vinaza", conserva los carbohidratos, el glicerol y los compuestos nitrogenados que estaban presentes en la fracción líquida de los efluentes estudiados, todos ellos disueltos en un volumen inferior, cercano al 85-86% del volumen que ingresa a la columna de destilación (ver tablas 9, 10 y 11 del Capítulo 3).

Teniendo en cuenta que los carbohidratos contenidos en esta vinaza pueden representar hasta el 70% de la DQO de la misma (ver tablas 5 y 6 del capítulo 2), se visualizó este efluente como un medio para la producción de etanol adicional al ya recuperado, y de esta manera utilizar la fermentación alcohólica como proceso de tratamiento, convirtiendo los azúcares en etanol. El principio básico del tratamiento biológico de efluentes consiste en transformar la materia orgánica soluble, responsable de la DQO, en compuestos fácilmente separables como la biomasa, o de separación espontánea como los gases (CO_2 en los procesos aeróbicos y CH_4 , H_2 , CO_2 , SH_2 en los procesos anaeróbicos). En el proceso propuesto, se sigue el mismo principio, convirtiendo los carbohidratos disueltos, responsables de un 70% de la DQO, en biomasa, CO_2 y etanol, compuestos fácilmente separables del medio. Este proceso permitiría además de la reducción de la carga orgánica, aumentar la cantidad de etanol que puede ser producido y recuperado a partir de la fracción líquida de los efluentes estudiados.

Se caracterizó la vinaza determinando su contenido de carbohidratos, glicerol y FAN y se evaluó la capacidad de levaduras del género *Saccharomyces* de fermentar los azúcares contenidos en las vinazas para producir bioetanol. Dado que éstas fueron incapaces de utilizar los carbohidratos presentes, se estudió el efecto de hidrolizar los carbohidratos a azúcares reductores sobre la performance de la fermentación. Se estudiaron y optimizaron las variables involucradas en la hidrólisis y se determinaron los valores de las mismas que maximizan el porcentaje de hidrólisis. Se estudió el efecto de utilizar distintos hidróxidos como agentes neutralizantes en la etapa de hidrólisis y se evaluó el efecto de suplementar la vinaza con sales fuentes de macro y micronutrientes, sobre el rendimiento en etanol. Finalmente, se evaluó el impacto de la remoción del etanol producido por fermentación sobre la reducción en la carga orgánica de la vinaza. Considerando las variables concentración de azúcares reductores, biomasa y etanol, se evaluó la capacidad de distintos modelos cinéticos para predecir los resultados experimentales de la fermentación alcohólica y se determinaron sus respectivos parámetros. Finalmente se realizó un análisis de factibilidad técnico-económico del proceso propuesto.

Materiales y métodos

Obtención de la vinaza

A partir de una mezcla compuesta por el 75% de la fracción líquida del excedente de levaduras y el 25% de cerveza, mediante ensayos de destilación realizados según lo descrito en el capítulo 3, se obtuvo la vinaza utilizada en los ensayos de producción de etanol. En los casos donde la concentración de azúcares totales iniciales de la vinaza se utilizó como variable, ésta fue aumentada hasta alcanzar la concentración deseada por evaporación parcial del agua contenida, utilizando un baño termostático.

Caracterización de la vinaza

Las concentraciones de azúcares totales, FAN, glicerol y DQO se determinaron como se describió previamente en el capítulo 2.

Fermentación alcohólica

Los ensayos de fermentación alcohólica se realizaron a temperatura controlada de $30\text{ °C} \pm 0,1\text{°C}$ introduciendo los reactores en una estufa de cultivo (Isla et al., 2013). Durante las fermentaciones se realizó una toma de muestra cada 1,5-2 h, según la experiencia, comenzando en el momento en que el inóculo fue agregado a cada reactor. En cada toma de muestra durante la fermentación, se determinó la concentración de biomasa, etanol, y azúcares reductores. En las experiencias realizadas sobre las vinazas sin hidrolizar se determinó también el contenido de azúcares totales. Además se determinó el contenido de glicerol al inicio y al final de la fermentación. Para los ensayos realizados en reactores de 500 mL, al finalizar la experiencia, se separó la biomasa por centrifugación a 3000 rpm durante 5' y el sobrenadante se destiló en el equipo de destilación "batch" descrito anteriormente en el capítulo 2. Se determinó el etanol total producido en el destilado por picnometría, y con este valor se estimó, como medida adicional, la concentración final de etanol en el fermentador. Finalmente se determinó la DQO del residuo de la destilación, efluente final del proceso.

Los azúcares reductores, azúcares totales, glicerol y DQO se determinaron como se describió anteriormente en el capítulo 2.

Para evaluar la performance de las fermentaciones sobre los distintos medios, se determinó el consumo de azúcares, el rendimiento en etanol obtenido, la producción neta de biomasa, la velocidad máxima de consumo de azúcares y la velocidad máxima de producción de etanol, el tiempo total de fermentación y el tiempo de la fase de aclimatación, como se describió previamente (Isla, et al. 2013)

Microorganismos y medio de cultivo

Para los ensayos de fermentación alcohólica de la vinaza se utilizó una levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae* var. Windsor (Lallemand Brewing Co.), adquirida en el mercado local. Se partió de la levadura liofilizada y se procedió a su rehidratación y proliferación según las indicaciones del fabricante. Se obtuvieron cultivos axénicos mediante repiques sucesivos en placa. Para el cultivo de levaduras se utilizó un medio líquido YPG ligeramente modificado (Bartnicki Garcia y Nickerson, 1962) compuesto por: peptona de carne 2 g/L; extracto de levadura 3 g/L; glucosa 20 g/L. Para la preparación del medio semi-sólido se adicionó agar-agar a una concentración final de 15 g/L. Los medios de cultivo se esterilizaron durante 15 min a 121° C en autoclave eléctrico tipo Chamberland (VZ-30, 135L).

La cepa se conservó en tubos pico de flauta con este medio y se repicó mensualmente. Además la cepa aislada inicialmente se conservó a -80° C en medio líquido YPG utilizando glicerol 20 %v/v como agente protector frente al congelamiento.

Preparación del inóculo

Para la preparación de los inóculos previo a las fermentaciones, se partió de la cepa conservada en los tubos pico de flauta, y se propagó en un erlenmeyer durante 12-18 h a 30°C. El medio utilizado fue el YPG, pero la concentración de glucosa fue de 50 g/L en este caso, de modo de obtener la biomasa necesaria para los ensayos. Una vez finalizado el cultivo, la biomasa se recuperó centrifugando el medio 5' a 3000 rpm, se resuspendió en un volumen adecuado del medio a ensayar, se determinó su concentración y finalmente se adicionó un volumen al reactor para obtener una concentración inicial de 2 ± 0.2 g/L para todas las experiencias.

Reactores utilizados

Los ensayos se realizaron en dos tipos de reactores construidos ad hoc. Los primeros, utilizados en los ensayos preliminares, se construyeron a partir de tubos

plásticos tipo falcon de 50 mL, a los cuales se les modificó la tapa mediante dos orificios. Uno para la salida de gases, y otro para la toma de muestra. En la figura 6 se muestra una fotografía de los reactores. Los reactores fueron agitados durante las fermentaciones utilizando un agitador orbital (Vicking m-23) a 180 rpm. El sistema completo (reactores-gradilla-agitador) se introdujo en una estufa de cultivo con temperatura controlada para realizar las fermentaciones. Se utilizó un volumen de 30 mL durante las experiencias. Para la toma de muestra se utilizó una jeringa estéril de 1 mL. Una vez tomada la muestra, se pasó el contenido de la jeringa a un tubo eppendorf de 1,5 mL y se centrifugó a 6500 rpm durante 2'. El sobrenadante se colocó en otro tubo eppendorf y fue almacenado para las determinaciones posteriores. El precipitado de biomasa se lavó tres veces con buffer fosfato y se resuspendió en finalmente en un volumen de 1 mL, a partir del cual se determinó la concentración de biomasa.



Figura 6: Reactores de 50 mL utilizados para las fermentaciones durante los ensayos de selección

Los segundos reactores consistieron en frascos de vidrio de 500 mL modificados, contruidos a partir de frascos (Duran-Schott). Se colocaron picos para la salida de gases y la toma de muestra. Al igual que en los reactores de 50 mL, la toma de muestra se realizó con una jeringa estéril de 1 mL y para el procesamiento de la muestra se procedió de la misma manera. Se utilizó un volumen de 300 mL en el reactor para cada ensayo. La agitación del cultivo se realizó a través de un agitador magnético y a través

de recirculación utilizando una bomba centrífuga. El conjunto (reactor-agitador-bomba) se colocó en una estufa de cultivo para realizar las fermentaciones a temperatura controlada. En la figura 7 se muestra una fotografía de los reactores de 500 mL.



Figura 7: Reactores de 500 mL utilizados en los ensayos de fermentación

Determinación de la concentración de etanol en las fermentaciones

Para la determinación de la concentración de etanol en las muestras extraídas durante el seguimiento de las fermentaciones se construyó un dispositivo basado en un sensor de dióxido de estaño marca Fígaro TGS 2620 (Xiaobo et al., 2003; Isla et al., 2013; Seluy e Isla, 2014). El dispositivo constó de un transformador, un sensor fígaro TGS 2620, un cuerpo de delrin donde se alojó el sensor, un multímetro y un circuito electrónico que integró el sensor con el multímetro. En la figura 8 se presenta una imagen del dispositivo.

El sensor que está alojado en el interior del cuerpo de delrin está compuesto por un óxido metálico semiconductor, el cual varía su conductividad en función de la concentración del compuesto de interés en la fase gaseosa en contacto con el sensor (en este caso el etanol). A través del circuito electrónico, se traduce este cambio de

conductividad en una señal leída por el multímetro, en nuestro caso una diferencia de potencial, la cual se puede correlacionar con la concentración de etanol.

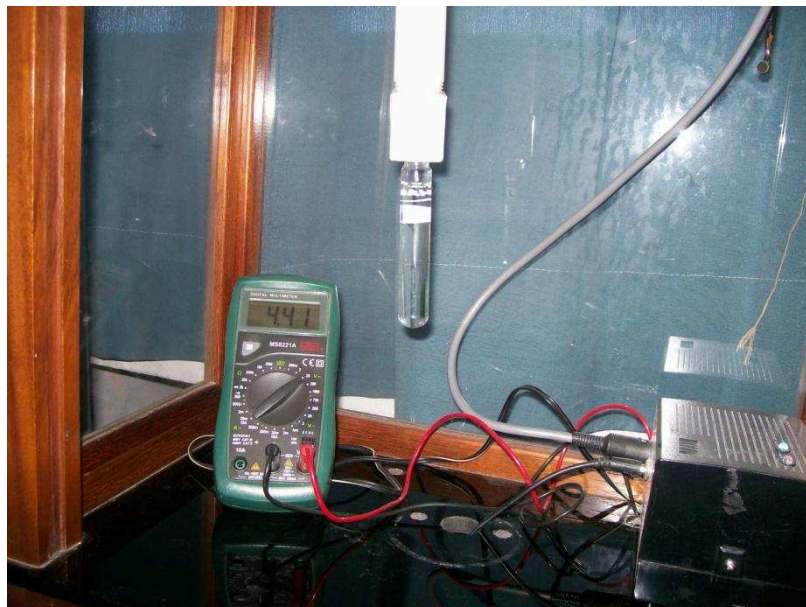


Figura 8: Dispositivo para la determinación de etanol

Para realizar las mediciones se colocó una solución de la muestra a la cual se le quería determinar la concentración de etanol en un tubo de vidrio roscado, el cual encaja en el cuerpo de delrin a través de una rosca interna para tal fin, estableciendo una cámara gaseosa entre la muestra y el sensor que se encuentra alojado en el interior. De esta manera, el equipo muestra una señal relacionada con el etanol en la fase gaseosa, que está en equilibrio con el etanol contenido en la muestra, permitiendo establecer una correlación entre la señal medida y la concentración de etanol en la fase líquida. Dada la sensibilidad del equilibrio del etanol entre ambas fases a la temperatura, previo a su lectura las muestras se dispusieron durante 15 minutos en un baño termostático a 24 °C.

Para establecer la correlación entre la concentración de etanol en la fase líquida y la señal obtenida en el multímetro (diferencia de potencial), se prepararon distintas soluciones de etanol en agua destilada, se colocaron en el baño a 24 °C por 15 minutos y

Capítulo 4 – Tratamiento de las vinazas.

se leyeron en el equipo. Se adoptó como lectura la resta entre el valor de diferencia de potencial máximo obtenido al colocar la muestra y el valor leído con el equipo en vacío (sin colocar la muestra). El valor máximo de la lectura se alcanzó entre los 40 y los 80 segundos posteriores a colocar la muestra. Se graficó la lectura en función de las distintas concentraciones de etanol para cada una de las muestras y se observó una relación exponencial entre la lectura del equipo (voltaje máximo menos el voltaje en vacío) y la concentración de etanol en las muestras. Para obtener la curva de calibrado se graficó el logaritmo natural de la concentración de etanol en función del voltaje, y se obtuvo una regresión lineal de los datos. La linealidad se mantuvo para valores de concentración de etanol comprendidos entre 0 y 0.75 g/L, por lo que las muestras que contenían un valor mayor de etanol, se diluyeron apropiadamente con agua destilada, previo a su lectura. En la figura 9 se presenta una curva de calibrado característica obtenida con este dispositivo.

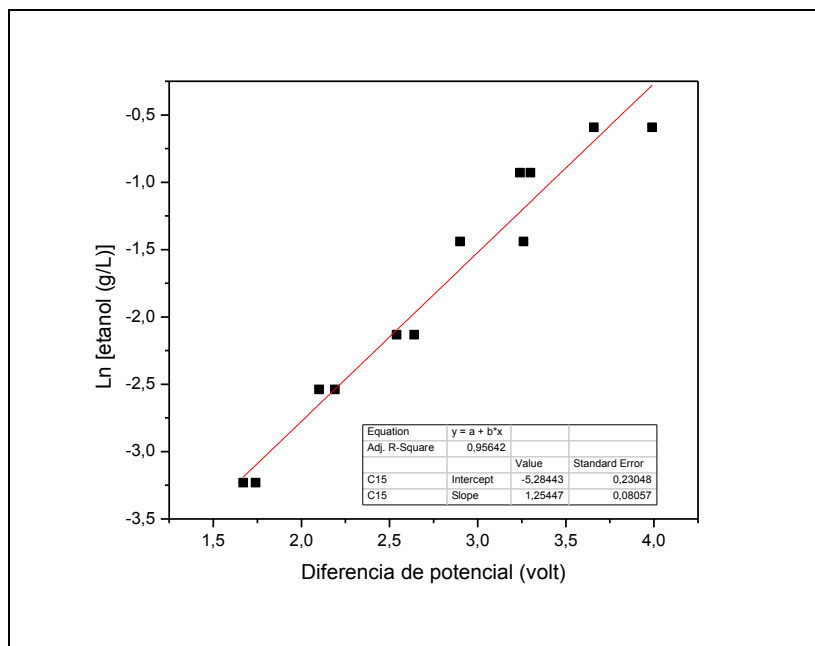


Figura 9: Curva de calibrado obtenida utilizando el dispositivo para la determinación de etanol

Según la información suministrada por el fabricante del sensor (ver anexo II), éste presenta cierta sensibilidad a las condiciones atmosféricas, principalmente

temperatura y humedad, por lo que las determinaciones se realizaron en un ambiente controlado mediante un aire acondicionado frío/calor. Para minimizar este efecto, se realizó una curva de calibrado cada vez que se utilizó el sensor. Durante las fermentaciones, el sobrenadante separado de la biomasa se diluyó apropiadamente con agua destilada y se procedió a la lectura como se describió anteriormente.

Determinación de la biomasa

La determinación de la concentración de biomasa, expresada en g/L, se realizó por turbidimetría mediante lecturas de una suspensión de levaduras de dilución adecuada, a 600 nm de longitud de onda. La correlación entre la señal provista por el espectrofotómetro y la concentración de levaduras en la muestra se estableció mediante la construcción de una curva patrón. Para ello, suspensiones con diferentes concentraciones de levaduras en estado exponencial de crecimiento, se midieron en espectrofotómetro determinando su absorbancia. A las mismas soluciones se le determinó la concentración de biomasa midiendo su contenido de Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV), siguiendo la técnica estándar (Eaton et al., 2005). La ecuación de la curva obtenida fue:

$$\text{Biomasa [g/L]} = (1.09689 \times \text{Absorbancia (600 nm)} - 0.01782) \times \text{dilución}^{-1} \quad (3)$$

Durante las experiencias, el pellet obtenido luego de centrifugar las muestras se lavó tres veces con buffer fosfato 50 mM a pH 7,0; finalmente se centrifugó en idénticas condiciones y se re-suspendió en volumen de agua destilada igual al de la toma de muestra (1 mL). Se diluyó apropiadamente con agua destilada para ingresar dentro del rango de la curva de calibrado, y se leyó su absorbancia a 600 nm en espectrofotómetro (HACH DR/2010). Utilizando la curva patrón se estableció la concentración en g/L.

Hidrólisis de los carbohidratos presentes en la vinaza

Se realizó una hidrólisis ácida de los carbohidratos presentes en las vinazas, con el objeto de transformar los azúcares totales en azúcares reductores, fermentables por

las levaduras del género *Saccharomyces*. Se utilizó ácido sulfúrico como agente de hidrólisis. La hidrólisis se realizó en frascos de vidrio con tapa a rosca de 500 mL de volumen. Para los ensayos a temperaturas menores o iguales a 100 °C, el frasco se sumergió en un baño termostático hasta un nivel superior al de líquido contenido. Para los ensayos donde se evaluaron temperaturas superiores, se utilizó una autoclave eléctrica para suministrar la temperatura adecuada. Una vez finalizado el tiempo de hidrólisis, se agregó el agente neutralizante y se enfrió el medio a temperatura ambiente. Se utilizaron distintos hidróxidos para la neutralización. Durante este proceso se generó un precipitado compuesto principalmente por proteínas desnaturalizadas, y en el caso donde se utilizó $\text{Ca}(\text{OH})_2$ el precipitado estuvo acompañado de CaSO_4 . Este se separó por centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante se conservó para su análisis posterior. Se determinó el valor de azúcares reductores y totales a la muestra antes y después de ser hidrolizada, según se describió en el capítulo 2.

Efecto de las variables de hidrólisis sobre el rendimiento de azúcares reductores

Se estudió el efecto de las principales variables involucradas en la hidrólisis ácida: concentración de ácido, tiempo de hidrólisis, concentración de azúcares totales iniciales (concentración de la vinaza), y temperatura de la hidrólisis. Para esto se realizó una serie de diseños experimentales (Kuhad et al., 2010; Zhang et al., 2010; Rafiqul y Mimi Sakinah, 2012). En primer lugar se realizó un diseño factorial completo 2^3 por triplicado, totalizando 24 experiencias, que evaluó el efecto de la concentración de azúcares iniciales, el tiempo de hidrólisis y la concentración de ácido, para una temperatura de hidrólisis de 100 °C. En busca de una relación entre la concentración de ácido y la concentración de azúcares totales iniciales, se realizaron dos diseños factoriales completos 2^2 por duplicado, totalizando 8 experiencias cada uno, utilizando esta relación como variable y el tiempo de hidrólisis como segunda variable. En cada diseño se evaluaron las mismas relaciones para dos concentraciones de azúcares iniciales diferentes. Finalmente, se realizó un diseño central compuesto (2^4 + estrella), con 4

puntos centrales, por duplicado totalizando 60 experiencias, donde se tomó como variables el tiempo de hidrólisis, la concentración de ácido, la concentración de azúcares totales y la temperatura de hidrólisis. Los resultados se analizaron a través de la metodología de superficie de respuesta estableciendo un modelo que permite predecir el porcentaje de hidrólisis en función de las condiciones de hidrólisis establecidas para cada variable. En todos los ensayos de hidrólisis se utilizó KOH en la etapa de neutralización. Las tablas con los valores que tomó cada variable, así como los resultados obtenidos para los diseños estudiados, se presentan en la sección resultados del presente capítulo.

Efecto de las bases utilizadas en la neutralización sobre la fermentación posterior

Se estudió el efecto de utilizar como agentes de neutralización las siguientes bases: KOH, NaOH, NH₄OH y Ca(OH)₂, sobre la fermentación alcohólica posterior, ajustando diferentes alícuotas de la vinaza hidrolizada con cada una de las bases hasta alcanzar un pH de 5, valor dentro del rango óptimo para la fermentación por levaduras (Asgher et al., 2013). El precipitado formado en cada caso se removió como se describió anteriormente y los sobrenadantes se utilizaron para llevar adelante las fermentaciones alcohólicas.

Efecto de suplementar el medio con fuentes de macro y micronutrientes

Se estudió el efecto de suplementar el medio neutralizado con Ca(OH)₂, con diferentes sales inorgánicas sobre la performance de fermentación alcohólica. Las sales ensayadas fueron: (NH₄)₂HPO₄; (NH₄)₂SO₄; KH₂PO₄; KCl; FeSO₄·7H₂O; MnSO₄·7H₂O; CuSO₄·5H₂O; ZnSO₄·7H₂O; MgSO₄·7H₂O. Los valores de concentración evaluados para cada compuesto se adoptaron del rango reportado para medios de cultivo convencionales utilizados en fermentaciones alcohólicas. (Casey et al., 1984; Kadam y Newman, 1997; Bafrcova et al., 1999; Gupta et al., 2007; Palukurty et al., 2008; Soyuduru et al., 2009).

Capítulo 4 – Tratamiento de las vinazas.

Para esto, se prepararon soluciones concentradas de las sales, con agua previamente esterilizada en autoclave, las cuales se adicionaron al medio a fermentar para obtener las concentraciones deseadas en cada ensayo. Para evaluar el efecto de las sales sobre la fermentación alcohólica, se llevaron adelante dos estrategias:

1) Se dividieron las sales en 3 grupos. El *grupo 1* compuesto por las sales fuentes de los nutrientes requeridos en concentraciones milimolar por las levaduras del género *Saccharomyces* ((NH₄)₂HPO₄; (NH₄)₂SO₄; KH₂PO₄ y KCl); El *grupo 2* compuesto por el MgSO₄; y el *grupo 3* compuesto por las sales requeridas en concentraciones traza (FeSO₄.7H₂O; MnSO₄.7H₂O; CuSO₄.5H₂O y ZnSO₄.7H₂O). En este caso se realizó un diseño factorial 2³, adoptando cada grupo como una variable.

2) Se planteó un diseño experimental Placket-Burman, para evaluar el efecto de cada sal, mediante su presencia y ausencia.

Estudio del rendimiento en etanol para distintos azúcares iniciales

Se estudió el efecto de las distintas concentraciones de azúcares iniciales sobre el rendimiento en etanol obtenido en las fermentaciones. Se evaluaron concentraciones iniciales de 27, 40, 58, 108 y 126,5 g/L.

Optimización de las variables de hidrólisis

En base a los resultados obtenidos anteriormente, que demuestran que el rendimiento en etanol no estuvo influenciado por las concentraciones iniciales de carbohidratos en el medio, y teniendo en cuenta que cualquier proceso de concentración de la vinaza implicaría un costo adicional al proceso, se utilizó la vinaza sin concentrar para optimizar las condiciones de hidrólisis. Tomando fija esta variable se analizó en un rango más acotado el efecto de las variables temperatura, tiempo de hidrólisis y concentración de ácido, sobre el porcentaje de hidrólisis mediante un diseño de box-behnken. Los resultados se analizaron mediante la metodología de superficie de respuesta.

Dado que diferentes combinaciones de las variables permitieron obtener una hidrólisis total de los carbohidratos, para determinar el valor más conveniente de las variables a ser utilizadas en el proceso de tratamiento, se realizó un análisis de los costos operativos de la hidrólisis, utilizando el software Microsoft Excel 2010. Se adoptó como temperatura inicial de la vinaza, la temperatura a la cual ésta abandona la columna despojadora (aproximadamente 100 °C) y se contempló en el análisis el costo de vapor necesario para elevar la temperatura desde este valor al valor utilizado en la hidrólisis. También se consideró la concentración de H₂SO₄ utilizada y la cantidad de KOH necesaria para llevar el pH a 5. En estudios previos se determinó que la cantidad de hidróxido consumida correspondió a la cantidad estequiométrica necesaria para neutralizar el ácido agregado durante la hidrólisis dado que el pH inicial de la vinaza es igual a 5.

Efecto del precipitado formado durante la neutralización sobre la fermentación alcohólica posterior.

Para evaluar el efecto de la presencia de los sólidos formados durante la neutralización de la vinaza hidrolizada sobre la fermentación alcohólica, un volumen de vinaza se hidrolizó en las condiciones previamente optimizadas, y se dividió en 4 alícuotas. 2 de ellas fueron neutralizadas utilizando Ca(OH)₂ y 2 utilizando KOH, bases que mostraron mejor desempeño. A su vez, para cada hidróxido, a una de las alícuotas se le removió el precipitado formado por centrifugación a 3000 rpm durante 5 min. La otra alícuota se conservó hasta los ensayos de fermentación.

Modelado cinético de la fermentación alcohólica

Con el objeto de obtener un modelo cinético del proceso de fermentación, se utilizó el promedio de los valores de las variables y se analizó la capacidad de varios modelos para reproducir los datos experimentales. Se minimizó la desviación cuadrática media relativa entre los valores experimentales de biomasa, etanol y azúcares reductores

y los valores predichos por el modelo, para determinar los parámetros del mismo. Los algoritmos de cálculo se realizaron utilizando el software MATLAB 7.0.9 R2009b.

Impacto de la remoción de etanol sobre la DQO de la vinaza.

Tres muestras de vinaza se hidrolizaron utilizando las condiciones económicamente óptimas, y posteriormente se fermentaron utilizando como inóculo 2 g/L (Isla et al., 2013; Seluy e Isla, 2014). Se tomó una muestra cada 2 horas y se determinó el contenido de etanol, biomasa y azúcares reductores. Al finalizar la fermentación, la biomasa se separó por centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos, y el sobrenadante se destiló para separar el etanol producido, en un equipo de destilación batch como se describió en el capítulo 3. Se utilizó 1 L de volumen y se determinó la DQO de la vinaza previo a la hidrólisis ácida, luego de la fermentación alcohólica y posteriormente a la separación de la biomasa y el etanol. Se determinó el volumen final.

Simulación de la hidrólisis y de la recuperación de etanol de las vinazas fermentadas

La vinaza representa aproximadamente el 86% del caudal de efluente generado en la empresa adoptada como caso de estudio. Se propuso un esquema para el tratamiento de la vinaza mediante hidrólisis, fermentación y recuperación de etanol.

Se simuló el esquema tomando como vinaza la corriente de salida del esquema 3 simulados en el capítulo 3, correspondiente al fondo de la columna despojadora. Se utilizó una jornada de 24 h de trabajo, durante 330 días al año. Se propusieron tres alternativas para la etapa de recuperación de etanol (esquemas 4, 5 y 6), para obtener como producto, soluciones etanol agua de 30-40% m/m; 92% m/m y alcohol potable.

Se utilizaron los resultados de simulación para estimar el consumo energético de cada esquema estudiado.

Evaluación económica

Para establecer los costos operativos involucrados en el proceso (consumo de energía y servicios auxiliares), se utilizaron los datos de salida de simulación (Bayramoglu et al., 2004; Martin y Grossmann, 2012; Moncada et al., 2013).

Al igual que en los casos de recuperación de etanol se contempló el consumo de energía de una centrífuga para separar la biomasa formada luego de la fermentación de las vinazas. El consumo se estimó en \$50000/año, con un costo de inversión de capital de \$410000 entre los dos equipos, valores provistos por proveedores locales.

El fondo de la columna despojadora de los esquemas 4, 5 y 6, fue considerado efluente del proceso, y se incluyó el costo operativo del tratamiento del mismo en la evaluación económica. Se consideró una remoción del 100% de la carga orgánica mediante un proceso anaeróbico de tratamiento evaluando 2 escenarios, uno en el cual se contempla el costo de inversión de capital para la construcción de un UASB para llevar a cabo el tratamiento, y otro sin esta inversión, asumiendo que el efluente del proceso es tratado en las instalaciones convencionales que ya dispone la empresa adoptada como caso de estudio.

El costo operativo de la fermentación se estimó como un 15 % del costo de vapor total necesario para obtener alcohol potable. El costo de inversión de capital para el proceso de hidrólisis y fermentación, se obtuvo basado en cotizaciones provistas por proveedores locales y en estimaciones previas realizadas por otros autores en sistemas similares. (McAloon et al., 2000; Kwiatkowski et al., 2006; Frederick et al., 2008; Nghiem et al., 2011).

No se consideró la inversión de capital necesaria para proveer los servicios (Gas, vapor, electricidad, agua, etc.), asumiendo que los mismos son provistos por los sistemas existentes en la empresa adoptada como caso de estudio.

Los costos utilizados para la evaluación económica fueron presentados en la tabla 7. Finalmente se establecieron los indicadores económicos del proceso propuesto.

Resultados

Caracterización de la vinaza

Se caracterizó la vinaza obtenida de destilar la mezcla compuesta en un 75 % por la fracción líquida del excedente de levaduras y en un 25% del descarte de cerveza. Los resultados se presentan en la tabla 14.

Tabla 14: Principales parámetros de la vinaza obtenida luego de separar el etanol de la mezcla de las fracciones líquidas de los subproductos

Vinaza	
Parámetros	Valores
DQO (mgO ₂ /L)	72150 ± 1100
Azúcares Totales (g/L)	47.30 ± 0.79
Glicerol (g/L)	12.35 ± 0.30
FAN (mg/L)	88 ± 9

La concentración de carbohidratos junto a la disponibilidad de compuestos nitrogenados en la forma de compuestos alfa amino nitrógeno libres (FAN), permitieron, al igual que otros residuos industriales (Gong et al., 1999; Palmarola-Adrados et al., 2005), visualizar la vinaza como medio para la producción de bioetanol a partir de los carbohidratos por fermentación alcohólica utilizando levaduras.

Se realizaron ensayos de fermentación en reactores de 50 mL. Los resultados no mostraron aumento de la biomasa, ni producción de etanol, tampoco se observó un descenso de los azúcares. Este resultado era esperado, dado que los carbohidratos presentes en la vinaza corresponden al remanente del proceso de producción de cerveza, en el cual las levaduras han agotado los azúcares fermentables, quedando principalmente dextrinas (Kunze, 1999; Briggs et al., 2004; Fillaudeau et al., 2006; Eblinger, 2012). Dado que las levaduras del género *Saccharomyces* sólo pueden utilizar monosacáridos, ciertos disacáridos y trisacáridos y sólo algunas cepas pueden utilizar ciertos tetra-

sacáridos. Las dextrinas, que en promedio comprenden más de 4 monómeros, no pueden ser utilizadas directamente para ser fermentadas a etanol.

Se estudió entonces el efecto de realizar una hidrólisis ácida de estos carbohidratos previo a la fermentación alcohólica.,.

Hidrólisis ácida de los carbohidratos presentes en la vinaza

Se estudió el efecto de las variables: tiempo de hidrólisis, concentración de ácido y concentración de carbohidratos iniciales (concentración de la vinaza) sobre el porcentaje de hidrólisis, mediante un diseño factorial 2^3 completo. Esta variable de respuesta se determinó como el valor de azúcares reductores obtenidos al final de la hidrólisis dividido por el valor de azúcares totales presentes inicialmente en el medio a hidrolizar. En la tabla 15 se presentan los resultados obtenidos para la variable de respuesta analizada.

Tabla 15: Valores de las variables y de la respuesta del diseño factorial completo 2^3 .

Azúcares iniciales (g/L)	Concentración de ácido (g/L)	Tiempo de hidrólisis (min)	% Hidrólisis (%)
165	25	15	44
165	5	15	35
24	25	125	82
165	5	125	39
24	5	15	48
24	5	125	51
24	25	15	55
165	25	125	62
165	25	15	44
165	5	15	37
24	25	125	84
165	5	125	42
24	5	15	46
24	5	125	53
24	25	15	56
165	25	125	61
165	25	15	44
165	5	15	35
24	25	125	79

Capítulo 4 – Tratamiento de las vinazas.

165	5	125	40
24	5	15	51
24	5	125	52
24	25	15	53
165	25	125	63

En la Figura 13 se observa el análisis de los residuos. Se observa que se cumplen las asunciones requeridas por el diseño experimental. La asunción de varianza constante, es aceptable como se puede observar en las figuras 13 A, B, C y D. Además, la figura 13 E muestra que la asunción de que los residuos provienen de una distribución normal es válido.

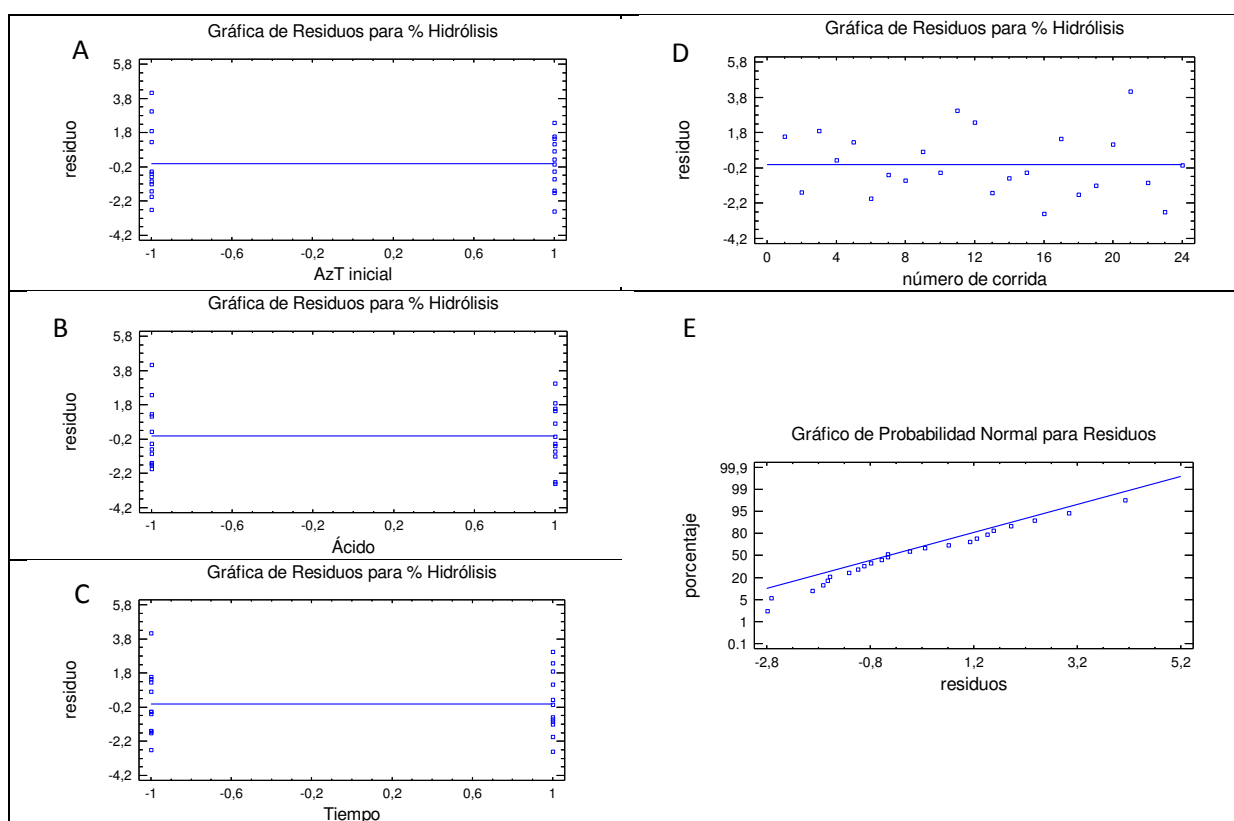


Figura 13: Análisis de los residuos del diseño factorial 2^3

Tabla 16: Análisis de Varianza para % Hidrólisis

<i>Factores</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:AzT inicial	1120,67	1	1120,67	223,39	0,0000
B:Ácido	1633,5	1	1633,5	325,61	0,0000
C:Tiempo	1066,67	1	1066,67	212,62	0,0000
AB	13,5	1	13,5	2,69	0,1217
AC	24,0	1	24,0	4,78	0,0450

Capítulo 4 – Tratamiento de las vinazas.

BC	504,167	1	504,167	100,50	0,0000
bloques	3,58333	2	1,79167	0,36	0,7055
Error total	75,25	15	5,01667		
Total (corr.)	4441,33	23			
$R^2 = 98,3 \%$; $R^2(\text{ajustada por g.l.}) = 97,7 \%$; Error estándar = 2,23					

En la Tabla 16 se presenta el análisis de la varianza (ANOVA). Se observa que todos los factores mostraron efectos significativos sobre el porcentaje de hidrólisis, con un valor p , ($p < 0.01$). El diagrama de Pareto de la figura 14 muestra que los factores tiempo de hidrólisis y concentración de ácido ejercen un efecto positivo sobre el porcentaje de hidrólisis, en cambio la concentración de la vinaza, al menos en el rango de valores estudiado, ejerce un efecto negativo sobre la respuesta.

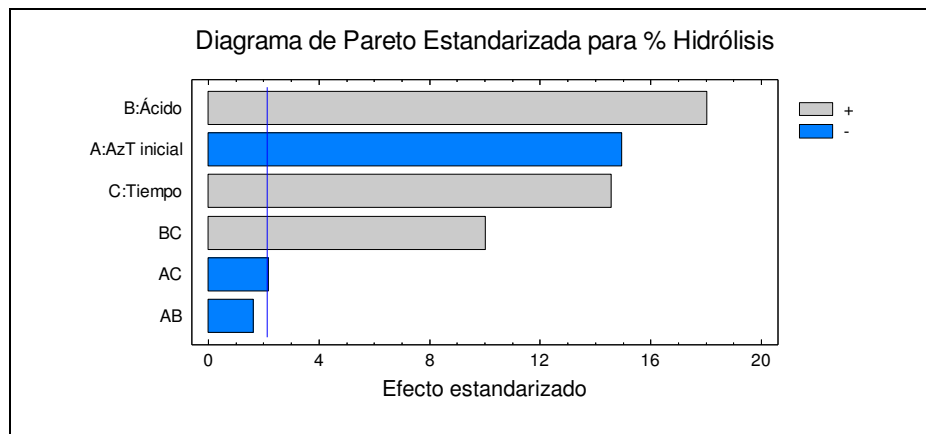


Figura 14: Diagrama de Pareto para los efectos principales. Las barras que superan la línea vertical azul, indican que los efectos son significativos.

Se observa que a mayor concentración de ácido y menor concentración de azúcares iniciales, mayor es el porcentaje de hidrólisis. En función de estos resultados, y con el objetivo de minimizar el consumo de ácido en relación a los carbohidratos hidrolizados, se estudió mediante diseños factoriales 2^2 , a baja y alta concentración de azúcares iniciales, el efecto de la relación ácido-azúcar sobre el porcentaje de hidrólisis. En las tablas 17 y 18 se presentan las experiencias llevadas a cabo con los resultados obtenidos en cada caso.

Capítulo 4 – Tratamiento de las vinazas.

Tabla 17: Valores de la variable y la respuesta para el diseño factorial a baja concentración de azúcares iniciales.

Concentración de azúcares iniciales (56 g/L)		
Relación Ácido-Azúcar (g_{ac}/g_{az})	Tiempo (min)	% Hidrólisis
0.1	65	46
0.39	235	91
0.39	65	67
0.1	235	54
0.1	65	45
0.39	235	83
0.39	65	68
0.1	235	51

Tabla 18: Valores de la variable y la respuesta para el diseño factorial a alta concentración de azúcares iniciales.

Concentración de azúcares iniciales (163 g/L)		
Relación Ácido-Azúcar (g_{ac}/g_{az})	Tiempo (min)	% Hidrólisis
0.1	65	49
0.39	65	83
0.39	235	90
0.1	235	64
0.1	65	46
0.39	65	78
0.39	235	87
0.1	235	88

El análisis de los residuos en ambos casos permitió considerar válidas las asunciones requeridas para el análisis de los datos. El ANOVA muestra que para el caso de baja concentración de azúcares, ambos factores (tiempo de hidrólisis y relación ácido azúcar) presentaron un efecto significativo al 95 % de confianza. El diagrama de Pareto para este caso muestra que el efecto es positivo para los dos factores y su interacción, tabla 19 y figura 15 respectivamente.

Capítulo 4 – Tratamiento de las vinazas.

Tabla 19: Análisis de Varianza para % Hidrólisis

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Relación	1596,13	1	1596,13	214,01	0,0007
B:Tiempo	351,125	1	351,125	47,08	0,0063
AB	78,125	1	78,125	10,47	0,0480
bloques	15,125	1	15,125	2,03	0,2496
Error total	22,375	3	7,45833		
Total (corr.)	2062,88	7			

$R^2 = 98,91 \%$, R^2 (ajustada por g.l.) = 98,10 %, Error estándar del est. = 2,73

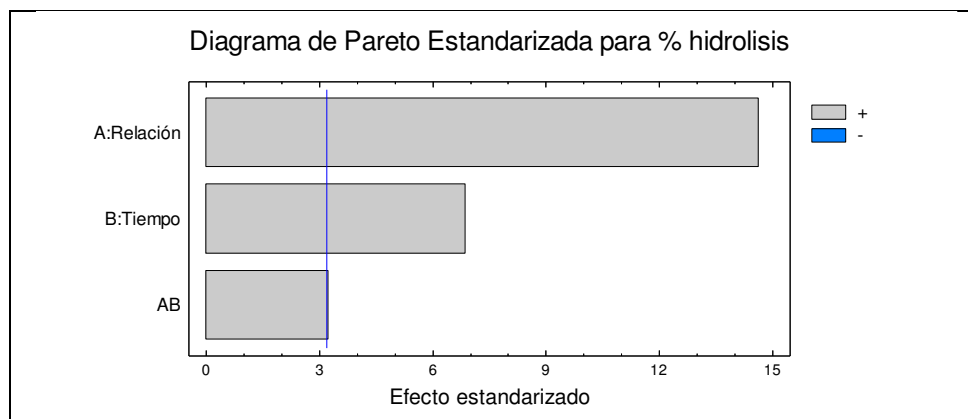


Figura 15: Diagrama de Pareto para los efectos principales. Las barras que superan la línea vertical azul, indican que los efectos son significativos.

Para el caso de alta concentración de azúcares iniciales, el ANOVA muestra que sólo la relación ácido-azúcar presenta un efecto significativo. El diagrama de Pareto muestra además que si bien la interacción no es significativa en este caso, ésta ejerce un efecto negativo sobre el porcentaje de hidrólisis, tabla 20 y figura 16.

Tabla 20: Análisis de Varianza para % Hidrólisis

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Relacion	1035,13	1	1035,13	10,77	0,0464
B:Tiempo	666,125	1	666,125	6,93	0,0782
AB	210,125	1	210,125	2,19	0,2358
bloques	21,125	1	21,125	0,22	0,6712
Error total	288,375	3	96,125		
Total (corr.)	2220,88	7			

$R^2 = 87,01\%$; R^2 (ajustada por g.l.) = 77,27 %; Error estándar del est. = 9,80

Capítulo 4 – Tratamiento de las vinazas.

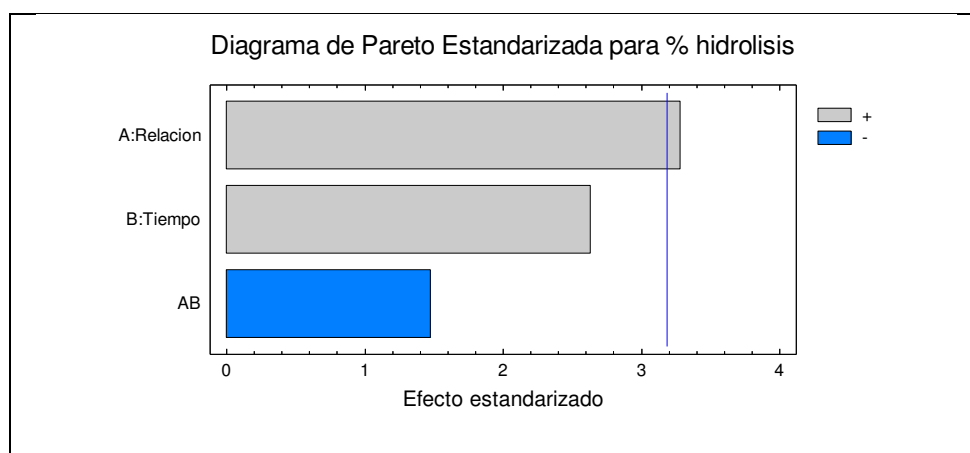


Figura 16: Diagrama de Pareto para los efectos principales. Las barras que superan la línea vertical azul, indican que los efectos son significativos.

Teniendo en cuenta que para valores bajos de azúcares iniciales todos los efectos fueron positivos, en tanto que para valores altos de azúcares iniciales, se observan efectos negativos, podría existir un valor óptimo para las distintas variables estudiadas, que haga máximo el rendimiento de la hidrólisis. Por otro lado, si bien no fue analizada en los ensayos anteriores, la variable temperatura es una de las principales variables que podría potencialmente influir sobre el rendimiento de hidrólisis, como así también sobre los valores de las demás variables estudiadas. Por este motivo, se evaluó mediante un diseño central compuesto (2^4 + estrella) la influencia de las diferentes variables y se analizó mediante la metodología de superficie de respuesta, con el objetivo de establecer un modelo cuadrático que permita predecir el porcentaje de hidrólisis obtenido en función de las variables estudiadas. En la tabla 21 se presentan los valores de las variables y de la respuesta.

Tabla 21: Valores de la variable y la respuesta para el diseño central compuesto.

Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Azúcar (g/L)	Ácido (g/L)	% Hidrólisis
250	100	180	50	88.8
125	90	90	30	66.9
375	90	90	70	82.1
250	100	120	50	85,52
250	80	120	50	68,5
250	100	120	50	89,73

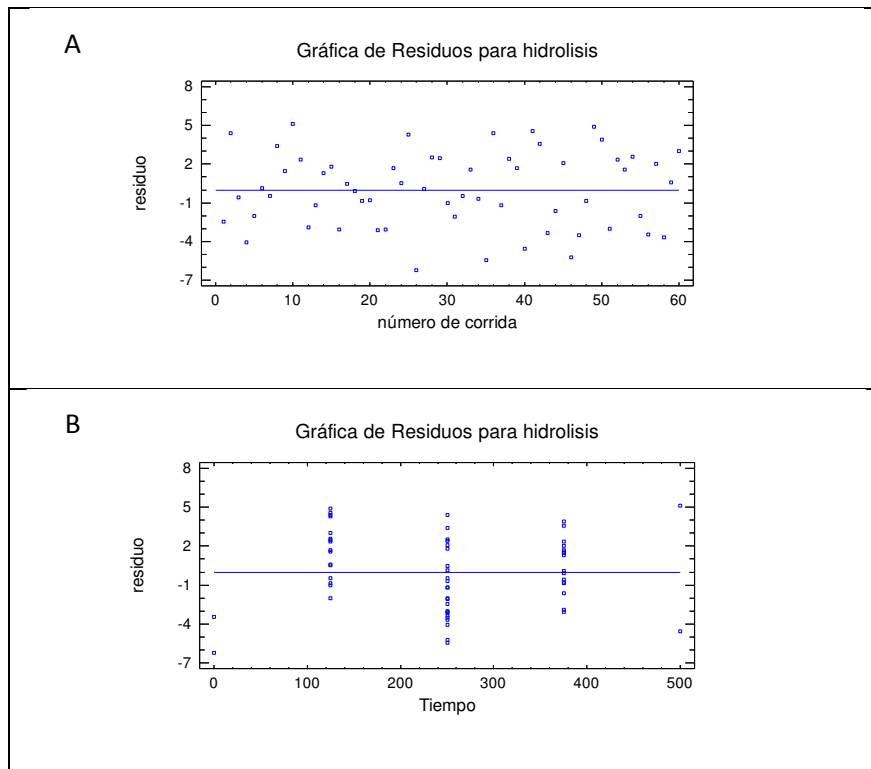
Capítulo 4 – Tratamiento de las vinazas.

250	120	120	50	83,53
250	100	120	50	93
375	90	150	70	87,35
500	100	120	50	89,8
125	90	150	30	64,56
375	110	90	30	84,34
250	100	60	50	85,53
375	90	150	30	82,53
250	100	120	50	91,42
250	100	120	50	86,52
250	100	120	90	82,17
375	110	150	70	82,7
125	90	90	70	77,95
375	90	90	30	79,41
250	100	120	10	68,7
375	110	90	70	75,71
125	110	90	70	86
125	110	150	70	87,53
125	90	150	70	84,88
0	100	120	50	65
375	110	150	30	89,25
250	100	120	50	92,09
125	110	90	30	81,5
125	110	150	30	78,6
250	100	180	50	88,6
125	90	90	30	62,3
375	90	90	70	84,54
250	100	120	50	89,11
250	80	120	50	65,3
250	100	120	50	94,23
250	120	120	50	83,01
250	100	120	50	92,24
375	90	150	70	87,76
500	100	120	50	80,39
125	90	150	30	66,97
375	110	90	30	91,05
250	100	60	50	83,6
375	90	150	30	79,85
250	100	120	50	91,89
250	100	120	50	84,6
250	100	120	90	78,39
375	110	150	70	82,17
125	90	90	70	83,89

Capítulo 4 – Tratamiento de las vinazas.

375	90	90	30	84,34
250	100	120	10	69
375	110	90	70	81,32
125	110	90	70	86,09
125	110	150	70	89,79
125	90	150	70	78,82
0	100	120	50	68
375	110	150	30	91,38
250	100	120	50	86,17
125	110	90	30	79,87
125	110	150	30	82,89

Se realizó un análisis de los residuos para corroborar que la varianza sea homogénea y que los residuos provengan de una distribución normal, asunciones necesarias para aplicar el análisis de los datos experimentales.



C

D

Capítulo 4 – Tratamiento de las vinazas.

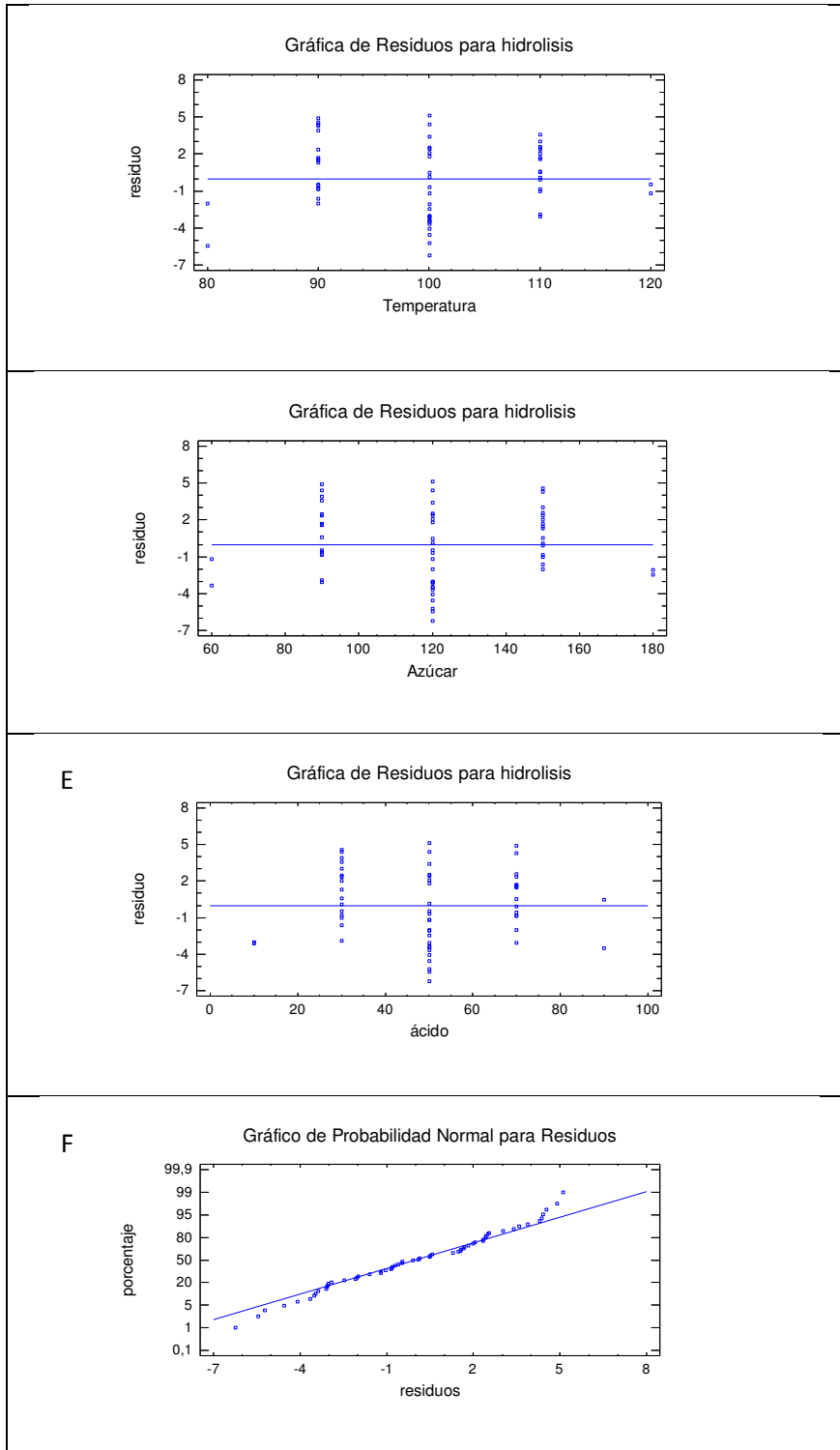


Figura 17: Análisis de los residuos del diseño central compuesto

En la figura 17 A se muestran los residuos en función del orden de corrida, lo que muestra que no existen tendencias a lo largo de la experiencia, como así también la uniformidad de la varianza. La figura 17 B, C, D y E muestra los residuos en función de

Capítulo 4 – Tratamiento de las vinazas.

los factores estudiados, lo que permite asumir que la varianza es constante. Finalmente la figura 17 F muestra el gráfico de probabilidad normal de los residuos, lo que confirma la asunción de que los mismos provienen de una distribución normal.

Se realizó el ANOVA para los resultados experimentales, obteniendo un valor de R^2 de 0.87, lo cual permite establecer que solo el 13 % de la variabilidad no puede ser explicado por el modelo.

Tabla 22: Análisis de Varianza para % Hidrólisis

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Tiempo	544,592	1	544,592	46,26	0,0000
B:Temperatura	543,246	1	543,246	46,14	0,0000
C:Azúcar	41,3665	1	41,3665	3,51	0,0903
D:ácido	293,14	1	293,14	24,90	0,0005
AA	464,004	1	464,004	39,41	0,0001
AB	180,5	1	180,5	15,33	0,0029
AC	3,51125	1	3,51125	0,30	0,5970
AD	376,889	1	376,889	32,01	0,0002
BB	522,581	1	522,581	44,39	0,0001
BC	1,61101	1	1,61101	0,14	0,7192
BD	242,22	1	242,22	20,57	0,0011
CC	3,46869	1	3,46869	0,29	0,5992
CD	9,0738	1	9,0738	0,77	0,4006
DD	567,53	1	567,53	48,21	0,0000
bloques	0,754882	1	0,754882	0,06	0,8052
Falta de ajuste	376,748	34	11,0808	0,94	0,5837
Error total	494,48	44	11,2382		
Total (corr.)	3975,49	59			

$R^2 = 87,56 \%$; R^2 (ajustada por g.l.) = 83,69 %; Error estándar del est. = 3,35

El ANOVA mostró además que ciertas interacciones dobles entre los factores analizados (Temperatura - azúcares iniciales; tiempo - azúcares iniciales; y azúcares iniciales - ácido), como así también el término cuadrático correspondiente al azúcar no influyeron significativamente sobre el porcentaje de hidrólisis. Se realizó una prueba de falta de ajuste del modelo, eliminando secuencialmente los términos no significativos y

Capítulo 4 – Tratamiento de las vinazas.

observando el valor de R^2 ajustada por los grados de libertad, como así también el indicador de falta de ajuste proporcionado por el software, para establecer si el modelo mejora o no el ajuste de los datos experimentales. La eliminación de los 4 términos no significativos mencionados anteriormente, permitió mejorar el ajuste del modelo. El ANOVA para el nuevo modelo con los términos no significativos eliminados se presenta en la tabla 23.

Tabla 23: Análisis de Varianza para % Hidrólisis

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Tiempo	544,592	1	544,592	46,26	0,0000
B:Temperatura	543,246	1	543,246	46,14	0,0000
C:Azúcar	41,3665	1	41,3665	3,51	0,0903
D:ácido	293,14	1	293,14	24,90	0,0005
AA	462,042	1	462,042	39,25	0,0001
AB	180,5	1	180,5	15,33	0,0029
AD	376,889	1	376,889	32,01	0,0002
BB	521,123	1	521,123	44,26	0,0001
BD	242,22	1	242,22	20,57	0,0011
DD	566,485	1	566,485	48,12	0,0000
bloques	0,754882	1	0,754882	0,06	0,8052
Falta de ajuste	394,413	38	10,3793	0,88	0,6365
Error puro	117,732	10	11,7732		
Total (corr.)	3975,49	59			

$R^2 = 87,11\%$; R^2 (ajustada por g.l.) = 84,48%; Error estándar del est. = 3,43

Todos los factores e interacciones fueron significativos con un 95 % ($p < 0.05$) de confianza, excepto la variables azúcares iniciales, la cual fue significativa con un 90% de confianza ($p < 0.1$). En la figura 18 se muestra la superficie de respuesta obtenida, para 134 g/L de azúcares iniciales y 49.5 g/L de ácido sulfúrico.

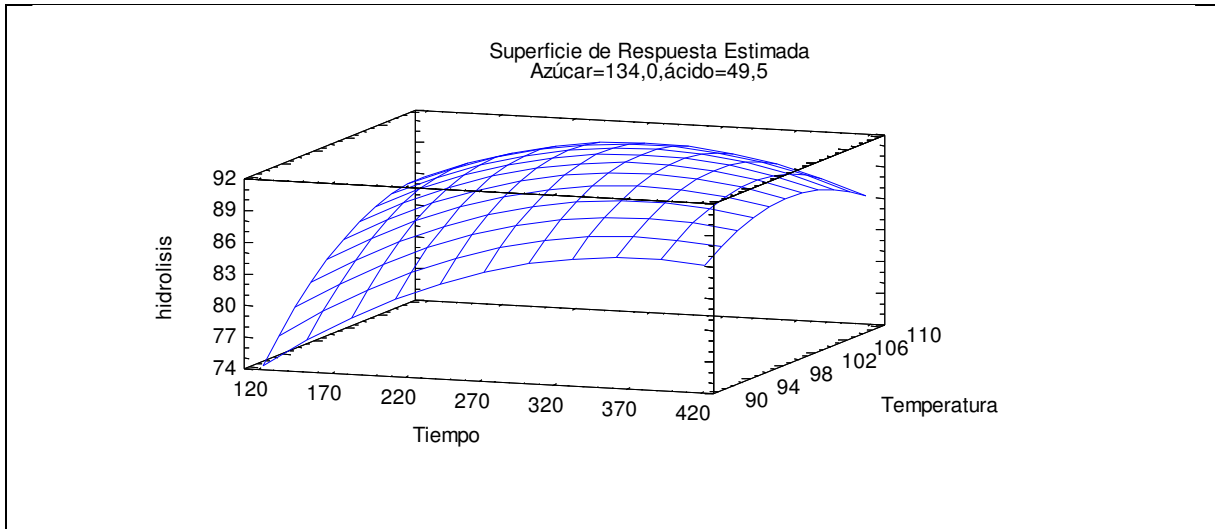


Figura 18: Superficie de respuesta para el % de hidrólisis en función de las variables analizadas.

Se adoptaron los valores de las variables: Tiempo (300 minutos), Temperatura (103 °C), Azúcares iniciales (134 g/L) y ácido sulfúrico (49,5 g/L), para los ensayos de hidrólisis posteriores, valores que permiten maximizar el porcentaje de hidrólisis obtenido.

Efecto de las bases utilizadas en la neutralización sobre la fermentación posterior

Utilizando estas condiciones de hidrólisis, se estudió el efecto de utilizar diferentes hidróxidos sobre la performance de la fermentación posterior. A 4 alícuotas de la vinaza hidrolizada, se le ajustó el pH a 5 con NaOH, KOH, Ca(OH)₂ y NH₄OH respectivamente. El precipitado formado durante la neutralización se removió por centrifugación y el sobrenadante se utilizó para ensayos de fermentación alcohólica.

En la figura 19 A y B se muestra la evolución de la biomasa, los azúcares reductores y el etanol en función del tiempo para los distintos hidróxidos utilizados. Se determinó el consumo de azúcares en cada uno, el rendimiento en etanol obtenido en cada caso, la producción neta de biomasa, la velocidad de máxima de consumo de azúcares y la velocidad máxima de producción de etanol. Los resultados se presentan en la tabla 24.

Capítulo 4 – Tratamiento de las vinazas.

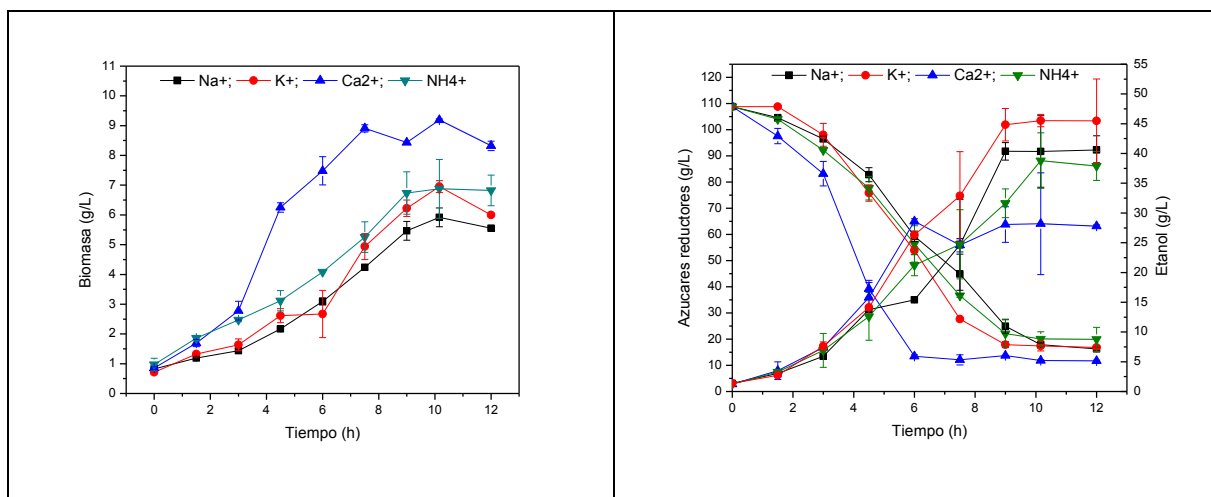


Figura 19: Promedio de las experiencias de fermentación alcohólica de las vinazas neutralizadas con diferentes hidróxidos.

Tabla 24: Parámetros para el análisis de la performance de la fermentación

Parametros	NaOH	KOH	Ca(OH) ₂	NH ₄ OH
Consumo de azúcares (%)	85.0	84.5	89.3	81.7
$Y_{et/az}$ (g _{et} /g _{az} consumido)	0.44	0.50	0.31	0.44
Producción de Biomasa (g _{biomasa})	5.09	6.24	8.34	6.04
Tiempo de fermentación (α) (h)	9.67	8.77	5.94	9.02
$r_{et\ max}$ (g _{et} /L h)	3.85	5.87	7.06	4.11
$r_{az\ max}$ (g _{az} /L h)	12.40	14.72	23.26	11.95

El consumo de azúcares fue superior al 80 % para todos los medios. En el medio neutralizado con Ca(OH)₂ se observó una mejora de la fermentación. El consumo de azúcares fue el mayor, cercano al 90%; además, éste se alcanzó en sólo 5.94 horas, siendo el menor tiempo de fermentación respecto de los demás medios. Se obtuvo además la mayor velocidad de producción de etanol, de consumo de azúcares y la mayor producción de biomasa respecto de los demás medios. Este efecto positivo fue previamente descrito en la literatura y podría deberse a que ciertos compuestos tóxicos quedarían retenidos en el precipitado de CaSO₄ formado, como así también a que ciertos inhibidores son desestabilizados durante la neutralización (Van Zyl et al., 1988;

Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000; Canilha et al., 2010). Sin embargo, se observó un efecto negativo sobre el rendimiento en etanol, el que podría deberse a que elevadas concentraciones de Ca inhiben el ingreso de Mg a la célula, un co-factor principal de las enzimas involucradas en la glicolisis (Walker, 2004; Soyuduru et al., 2009). Los demás medios, neutralizados con NaOH, KOH y NH₄OH mostraron comportamientos similares en cuanto a la producción de biomasa. El medio neutralizado con KOH, fue el que presentó el mayor rendimiento en etanol, muy próximo al rendimiento teórico (0.51), como así también la mayor velocidad de producción de etanol y de consumo de azúcares, lo que repercutió en un tiempo de fermentación levemente inferior comparado con los medios neutralizados con NaOH y NH₄OH. Los menores rendimientos en etanol observados en los medios neutralizados con NaOH y NH₄OH podrían atribuirse en el caso del NaOH a un efecto de estrés por la elevada concentración de Na en el medio (Walker, 2004; Dickinson y Schweizer, 2004; Ruiz y Ariño, 2007), y en el caso del NH₄OH, al mayor rendimiento en glicerol obtenido cuando el NH₄⁺ está presente como fuente de nitrógeno. (Albers et al., 1996; Yue et al., 2012).

El medio neutralizado con KOH mostró la mayor producción de etanol (consumo de azúcares multiplicado por rendimiento). Si bien cuando se utilizó Ca(OH)₂ como agente neutralizante el rendimiento en etanol fue bajo en comparación con los demás hidróxidos, se observó una mejora en la performance de la fermentación, con una elevada velocidad de consumo de azúcares y producción de etanol, obteniendo un tiempo de fermentación tres horas menor que con el resto de los hidróxidos. Estas ventajas aparentes motivaron el estudio de suplementar la vinaza con distintas fuentes de micro y macronutrientes, especialmente fuentes de potasio, nitrógeno y magnesio, con el objetivo de mejorar los rendimientos en etanol sobre la vinaza neutralizada con Ca(OH)₂.

Se evaluó el efecto de suplementar el medio neutralizado con las siguientes sales: (NH₄)₂HPO₄; (NH₄)₂SO₄; KH₂PO₄; KCl; FeSO₄.7H₂O; MnSO₄.7H₂O; CuSO₄.5H₂O; ZnSO₄.7H₂O y MgSO₄.7H₂O. Se realizaron dos diseños experimentales, uno de Plackett-

Capítulo 4 – Tratamiento de las vinazas.

burman, donde cada sal se analizó como un factor independiente; y un diseño factorial completo 2^3 , donde las sales se agruparon en 3 grupos en función de los requerimientos de cada sal, y cada uno de ellos se evaluó como un factor en el diseño. La variable de respuesta adoptada en ambos diseños fue el rendimiento máximo en etanol obtenido en cada experiencia. Los grupos del diseño factorial fueron:

Grupo 1: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; KH_2PO_4 y KCl .

Grupo 2: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Grupo 3: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Se evaluó la presencia o ausencia de las sales o grupo de sales según el diseño utilizado. En la tabla 25 se presentan las concentraciones finales de cada sal en el medio de cultivo:

Tabla 25: Concentración final de cada sal en el medio de fermentación a ensayar.

Compuesto	Concentración (g/L)
KCl	2.000
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.000
KH_2PO_4	1.000
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	1.000
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.500
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.010
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.010
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.005
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.010

En la tabla 26 se presentan los valores de las variables en cada experiencia correspondiente al diseño Plackett –burman, como así también el resultado para la variable de respuesta adoptada, en este caso el rendimiento en etanol.

Tabla 26: Sales presentes en cada reactor en las fermentaciones correspondientes al diseño Plackett–Burman.

Capítulo 4 – Tratamiento de las vinazas.

Experiencias	Sales presentes	Rendimiento etanol ($Y_{et/az}$)
1	KCl	0.304
	$(NH_4)_2HPO_4$	
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	
	$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	
2	$(NH_4)_2SO_4$	0.254
	KH_2PO_4	
	$(NH_4)_2HPO_4$	
	$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	
3	$(NH_4)_2SO_4$	0.259
	KCl	
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	
4	KCl	0.302
	$(NH_4)_2HPO_4$	
	KH_2PO_4	
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	
5	$(NH_4)_2SO_4$	0.313
	$(NH_4)_2HPO_4$	
	KH_2PO_4	
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	
6	$(NH_4)_2SO_4$	0.261
	KCl	
	$(NH_4)_2HPO_4$	
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	
7	$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.303
	$(NH_4)_2SO_4$	
	KCl	
	KH_2PO_4	
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	

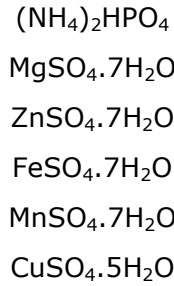
Capítulo 4 – Tratamiento de las vinazas.

	FeSO ₄ .7H ₂ O	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	
	KCl	
	KH ₂ PO ₄	
8	MgSO ₄ .7H ₂ O	0.281
	FeSO ₄ .7H ₂ O	
	MnSO ₄ .7H ₂ O	
	KH ₂ PO ₄	
	MgSO ₄ .7H ₂ O	
9	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.333
	MnSO ₄ .7H ₂ O	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	
	MgSO ₄ .7H ₂ O	
10	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.299
	FeSO ₄ .7H ₂ O	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	
	(NH ₄) ₂ SO ₄	
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	
11	FeSO ₄ .7H ₂ O	0.298
	MnSO ₄ .7H ₂ O	
12	Ninguna	0.238
	(NH ₄) ₂ SO ₄	
	KH ₂ PO ₄	
13	MgSO ₄ .7H ₂ O	0.315
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	
	KCl	
	MgSO ₄ .7H ₂ O	
14	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.319
	FeSO ₄ .7H ₂ O	
	KH ₂ PO ₄	
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	
15	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.263
	FeSO ₄ .7H ₂ O	
	MnSO ₄ .7H ₂ O	

Capítulo 4 – Tratamiento de las vinazas.

16	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.249
	MgSO ₄ .7H ₂ O	
	FeSO ₄ .7H ₂ O	
	MnSO ₄ .7H ₂ O	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	
17	KCl	0.261
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	
	MnSO ₄ .7H ₂ O	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	
18	KH ₂ PO ₄	0.298
	FeSO ₄ .7H ₂ O	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	
19	(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.302
	MgSO ₄ .7H ₂ O	
	MnSO ₄ .7H ₂ O	
20	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.284
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	
21	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.257
	KCl	
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	
	FeSO ₄ .7H ₂ O	
22	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.274
	KCl	
	NaH ₂ PO ₄	
	MnSO ₄ .7H ₂ O	
23	KCl	0.184
	KH ₂ PO ₄	
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	
	MgSO ₄ .7H ₂ O	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	
24	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.214
	KCl	
	KH ₂ PO ₄	

Capítulo 4 – Tratamiento de las vinazas.



Se realizó un análisis de los residuos de los valores experimentales obtenidos del diseño experimental, con el objeto de verificar el cumplimiento de las asunciones necesarias para el análisis del modelo. En la figura 20 A y B se presenta el gráfico de probabilidad normal de los residuos y el gráfico de los residuos en función del orden de corrida, respectivamente.

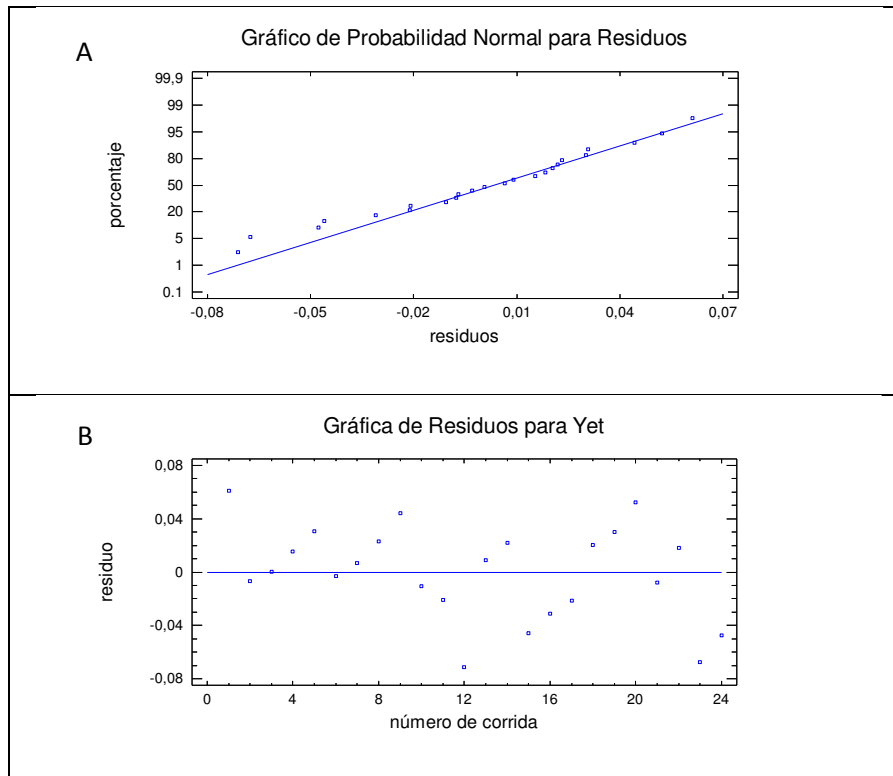


Figura 20: Análisis de los residuos del diseño Plackett-Burmann

Se observa que ambas asunciones necesarias (varianza constante y que los residuos provengan de una distribución normal) se cumplen. Si bien el diagrama de Pareto indica que el $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y el $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ejercen un efecto positivo sobre el rendimiento en etanol (figura 21), el ANOVA presentado en la tabla 27 muestra que

Capítulo 4 – Tratamiento de las vinazas.

ninguno de estos efectos es significativo en relación a la variable de respuesta analizada; además el coeficiente de determinación R^2 indica que el modelo no es adecuado para predecir los resultados experimentales.

Tabla 27: Análisis de la varianza para el rendimiento en etanol del diseño Plackett-Burman.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:NH4 2HPO4	0,00132697	1	0,00132697	0,65	0,4330
B:NH4 2SO4	0,000381629	1	0,000381629	0,19	0,6717
C:KCl	0,00495588	1	0,00495588	2,43	0,1410
D:KH2PO4	0,0000021593	1	0,0000021593	0,00	0,9745
E:MgSO4	0,000102177	1	0,000102177	0,05	0,8260
F:ZnSO4	0,00406301	1	0,00406301	2,00	0,1796
G:FeSO4	0,000318563	1	0,000318563	0,16	0,6984
H:MnSO4	0,00144126	1	0,00144126	0,71	0,4143
I:CuSO4	0,000446286	1	0,000446286	0,22	0,6469
Error total	0,0285046	14	0,00203604		
Total (corr.)	0,0415425	23			

$R^2 = 31,38\%$; R^2 (ajustada por g.l.) = 0,0%; Error estándar del est. = 0,045

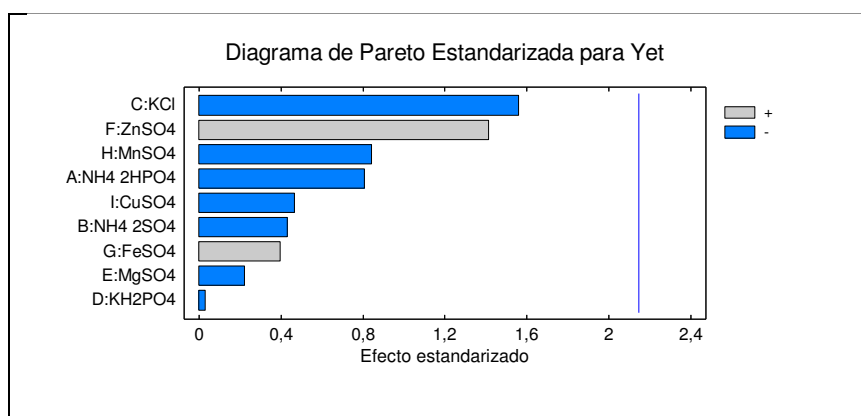


Figura 21: Diagrama de Pareto para los efectos principales del diseño Plackett-Burmann.

El segundo estudio que se llevó a cabo fue el diseño factorial por grupos. En la tabla 28 se muestran de manera codificada (1 significa presencia del grupo y 0 ausencia del mismo) los distintos ensayos realizados, como así también el valor obtenido para la

Capítulo 4 – Tratamiento de las vinazas.

variable de respuesta. Cuando un grupo estuvo presente (1), cada una de las sales del grupo, se agregaron en la concentración indicada en la tabla 25.

Tabla 28: Sales presentes en cada reactor en las fermentaciones correspondientes al diseño Factorial 2³.

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Rendimiento etanol
0	0	0	0,367
1	0	0	0,336
0	1	0	0,355
1	1	0	0,395
0	0	1	0,314
1	0	1	0,294
0	1	1	0,370
1	1	1	0,340
0	0	0	0,392
1	0	0	0,390
0	1	0	0,371
1	1	0	0,370
0	0	1	0,361
1	0	1	0,362
0	1	1	0,414
1	1	1	0,370

En la figura 22 A, B y C, se muestra la evolución en el tiempo para la biomasa, los azúcares reductores y el etanol respectivamente, para cada uno de los reactores correspondientes al diseño factorial 2³. Se graficó el promedio de los duplicados y sus desviaciones estándar correspondientes.

Capítulo 4 – Tratamiento de las vinazas.

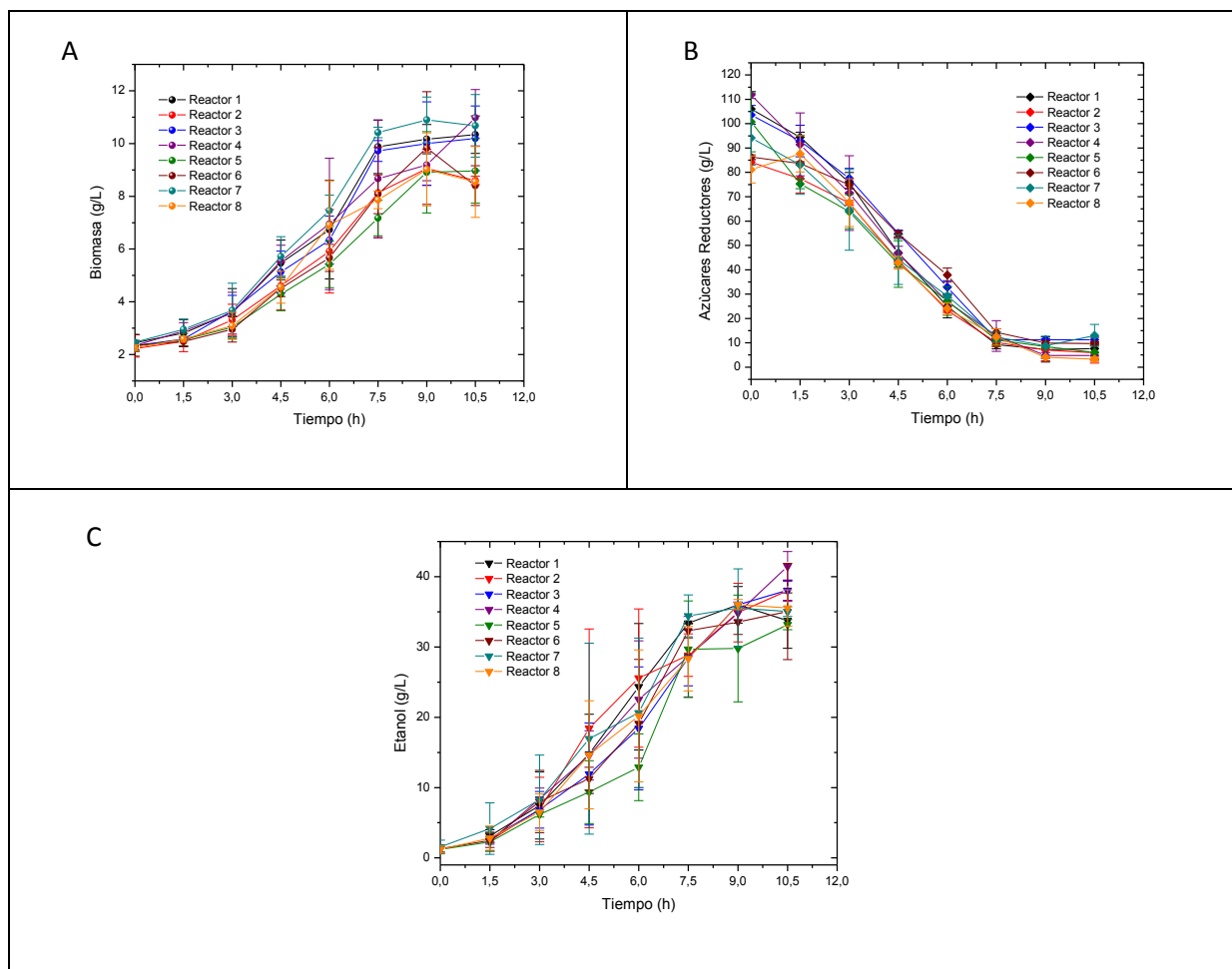


Figura 22: Promedio de las experiencias de fermentación alcohólica de las vinazas durante el diseño factorial 2^3 .

El ANOVA de los datos experimentales presentado en la tabla 29 muestra que ninguno de los factores analizados ejerce un efecto significativo sobre la variable de respuesta, lo cual es consistente con el resultado del diseño Plackett-Burmann.

Tabla 29: Análisis de la varianza para el rendimiento en etanol correspondiente al diseño factorial 2^3 .

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Amonio	0,000493951	1	0,000493951	1,02	0,3431
B:Mg	0,0017661	1	0,0017661	3,63	0,0932
C:Traza	0,00146115	1	0,00146115	3,00	0,1213
AB	0,0000195806	1	0,0000195806	0,04	0,8460
AC	0,000596581	1	0,000596581	1,23	0,3003
BC	0,0015386	1	0,0015386	3,16	0,1132

bloques	0,00416993	1	0,00416993	8,57	0,0191
Error total	0,00389184	8	0,00048648		
Total (corr.)	0,0139377	15			
$R^2 = 72,07\%$; R^2 (ajustada por g.l.) = 53,46%; Error estándar del est. = 0,022					

De los resultados anteriores podemos concluir que ninguna de las sales estudiadas ejerce un efecto positivo sobre el rendimiento en etanol en las vinazas neutralizadas con $\text{Ca}(\text{OH})_2$, obteniendo durante los ensayos un rendimiento promedio de 0.362 ± 0.030 $\text{g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{azúcar consumido}}$. Este valor de rendimiento sigue siendo muy inferior al obtenido cuando el KOH es utilizado como agente en la neutralización de la hidrólisis ácida.

Efecto de la concentración de azúcares iniciales sobre el rendimiento en etanol

Para evaluar la conveniencia de aumentar la concentración de azúcares iniciales de la vinaza por evaporación parcial del agua contenida, se estudió el efecto de los azúcares iniciales sobre el rendimiento en etanol en vinazas hidrolizadas con KOH. Se evaluaron concentraciones de 27, 40, 58, 108 y 126.5 g/L en fermentaciones por duplicado utilizando los reactores de 500 mL. Se realizó un análisis estadístico de las respuestas, analizando la concentración de azúcares como un factor categórico, lo que no mostró diferencias significativas en los rendimientos para ninguna de las concentraciones estudiadas, con un rendimiento promedio de 0.498 ± 0.011 $\text{g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{azúcar consumido}}$, muy próximo al valor obtenido inicialmente para éste hidróxido (0.500). Estos resultados ponen en evidencia que al menos hasta valores de 126.5 g/L de azúcares iniciales, no hay una variación en el rendimiento de etanol, por lo que cualquier incremento en el costo del proceso (en este caso debido a la concentración de la vinaza) debería ser compensado en un ahorro en los costos variables involucrados (ácidos, bases y consumo de vapor en la destilación), como así también con los costos de inversión relacionados al

volumen del fermentador. Este análisis se presenta en la sección *análisis económico* del presente capítulo.

Optimización de las variables de hidrólisis

Teniendo en cuenta que el cambio en la concentración de la vinaza a través de la evaporación parcial de su contenido de agua, genera un aumento en el costo del proceso, y que el consumo de ácido y bases influyen en gran medida en los costos del proceso (ver sección análisis económico), se realizó un diseño experimental Box-Behnken, de modo de obtener un modelo que permita predecir el rendimiento de la hidrólisis en función de las variables concentración de ácido, tiempo de hidrólisis y temperatura de hidrólisis, adoptando como concentración de azúcares iniciales el valor de salida de la destilación de la fracción líquida de los subproductos estudiados (ver capítulo 3), correspondiente a 47,3 g/L, y se evaluó un rango para la concentración de ácido inferior a los evaluados en los anteriores diseños. En la tabla 30 se presenta el diseño realizado con los valores de las variables y el valor para la respuesta obtenida. Se utilizó KOH como agente de neutralización de la hidrólisis.

Tabla 30: Valores de las variables y del porcentaje de hidrólisis, para el diseño experimental Box Behnken.

Tiempo (min)	Concentración de ácido (g/L)	Temperatura (°C)	Hidrólisis (%)
300	6	120	97,6
5	6	120	55,9
300	0	110	42,3
300	6	100	55,6
5	0	110	42,5
152,5	12	120	100
152,5	6	110	95,1
152,5	0	100	40,8
300	12	110	96
5	12	110	50,9
152,5	12	100	67,3
5	6	100	44,8

Capítulo 4 – Tratamiento de las vinazas.

152,5	6	110	90,3
152,5	6	110	93,4
152,5	0	120	45,7

Se realizó un análisis de los residuos, que permitió verificar que las asunciones de varianza constante y proveniencia de una distribución normal se satisfacen correctamente (Figura 23 A y B)

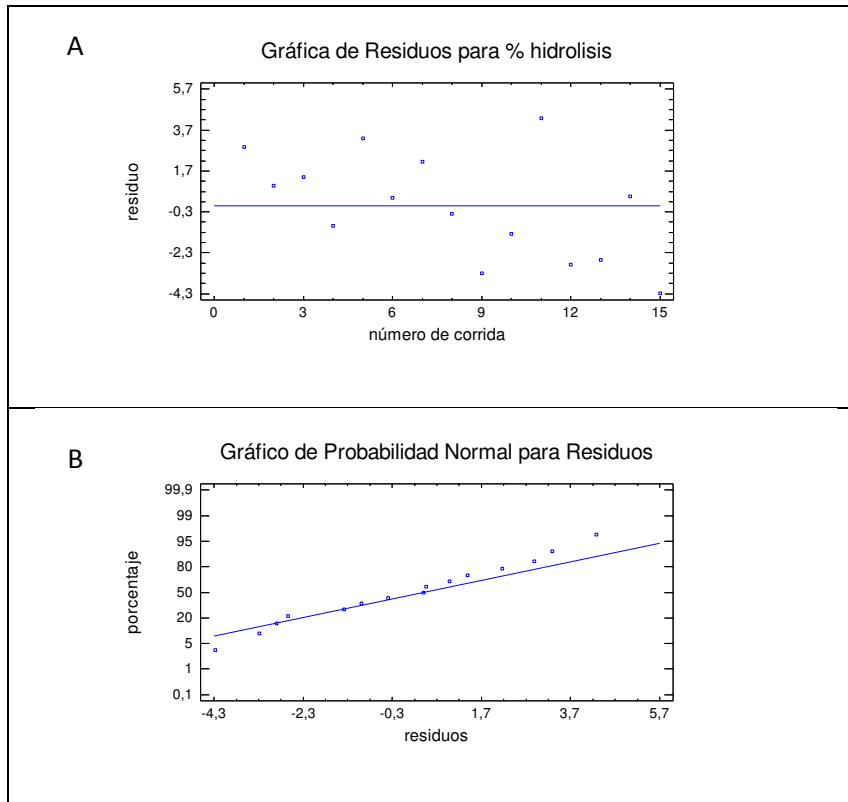


Figura 23: Análisis de los residuos para el diseño experimenta Box-Behnken

El análisis de la varianza presentado en la tabla 31 muestra que todos los factores, tiempo y temperatura de hidrólisis y concentración de ácido, al igual que en los diseños anteriores, fueron significativos sobre la respuesta. Las interacciones de los factores también tuvieron un efecto significativo sobre la respuesta. El diagrama de Pareto permite observar cuáles de estos factores e interacciones tienen un efecto positivo o negativo sobre la respuesta (Figura 24).

Capítulo 4 – Tratamiento de las vinazas.

Tabla 31: Análisis de la varianza para el porcentaje de hidrólisis correspondiente al diseño Box-Behnken.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Tiempo	1185,84	1	1185,84	200,20	0,0050
B:Acido	2552,55	1	2552,55	430,93	0,0023
C:Temperatura	1028,31	1	1028,31	173,60	0,0057
AA	1129,69	1	1129,69	190,72	0,0052
AB	513,023	1	513,023	86,61	0,0113
AC	238,702	1	238,702	40,30	0,0239
BB	1132,92	1	1132,92	191,26	0,0052
BC	193,21	1	193,21	32,62	0,0293
CC	528,743	1	528,743	89,26	0,0110
Falta de ajuste	80,9625	3	26,9875	4,56	0,1852
Error puro	11,8467	2	5,92333		
Total (corr.)	8239,98	14			

$R^2 = 98,87\%$; R^2 (ajustada por g.l.) = 96,84%; Error estándar del est. = 2,43

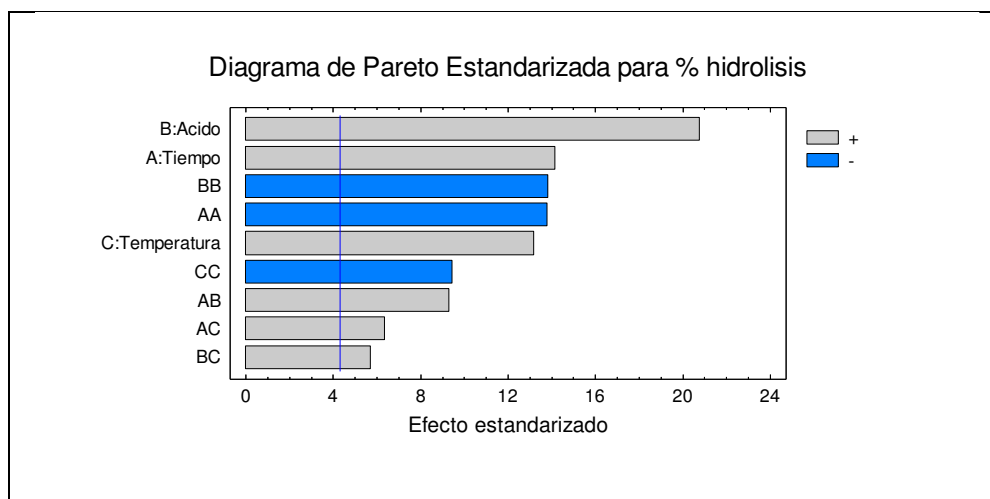


Figura 24: Diagrama de Pareto para los efectos principales. Las barras que superan la línea vertical azul, indican que los efectos son significativos.

El valor de R^2 obtenido para el modelo, como así también el valor del coeficiente para la prueba de falta de ajuste, permiten corroborar que el modelo describe de manera acorde los resultados experimentales. El modelo cuadrático obtenido, que permite establecer el % de hidrólisis en función de las variables estudiadas fue:

$$\begin{aligned} \% \text{Hidrólisis} = & -1370.4 - 0.325124 \times \text{Tiempo} - 5.87718 \times \text{Ácido} + 25.9667 \times \\ & \text{Temperatura} - 0.000803984 \times \text{Tiempo}^2 + 0.0127966 \times \text{Tiempo} \times \text{Ácido} \\ & + 0.00523729 \times \text{Tiempo} \times \text{Temperatura} - 0.486574 \times \text{Ácido}^2 + 0.115833 \\ & \times \text{Ácido} \times \text{Temperatura} - 0.119667 \times \text{Temperatura}^2 \end{aligned} \quad (4)$$

con el tiempo expresado en minutos, la temperatura de hidrólisis en °C y la concentración de ácido en g/L.

En la figura 25 se muestra un gráfico de contornos de la superficie de respuesta correspondiente al modelo, para una temperatura de hidrólisis de 110 °C.

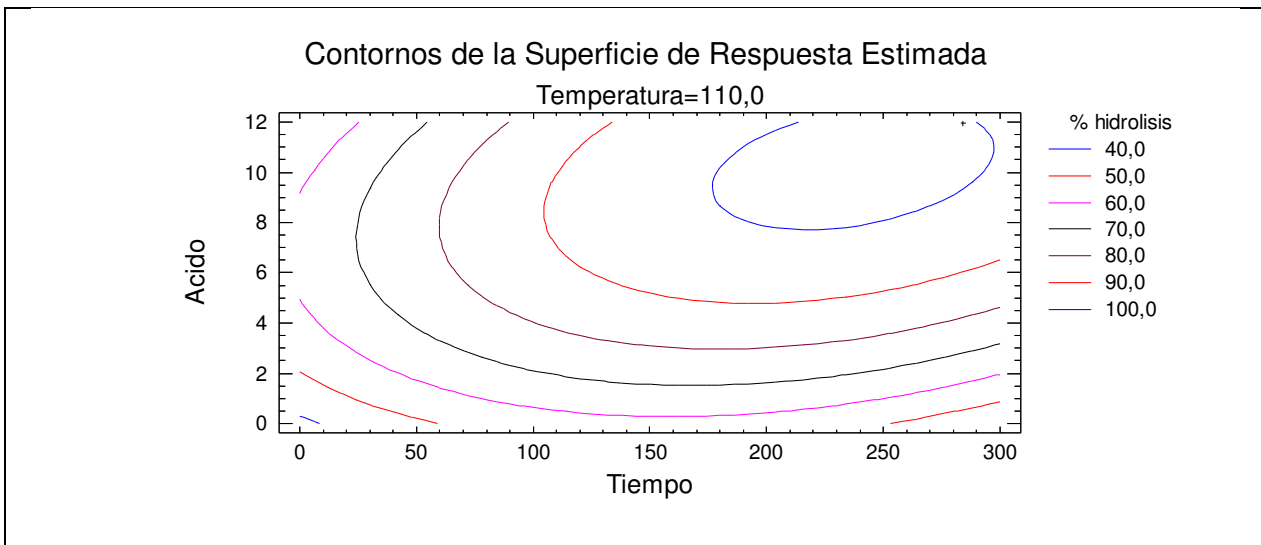


Figura 25: Gráficos de contornos para la superficie de respuesta correspondiente al modelo de hidrólisis

Los resultados obtenidos muestran que hay diferentes combinaciones de las variables que permiten obtener un 100 % de hidrólisis de los carbohidratos. Para determinar los valores más convenientes, se estableció la relación entre el calor necesario para elevar la temperatura de la vinaza a la temperatura de hidrólisis, mediante la simulación de un intercambiador de calor, comprobando que hay una relación lineal entre el consumo de calor y el aumento de la temperatura. Esta se presenta en la figura 26.

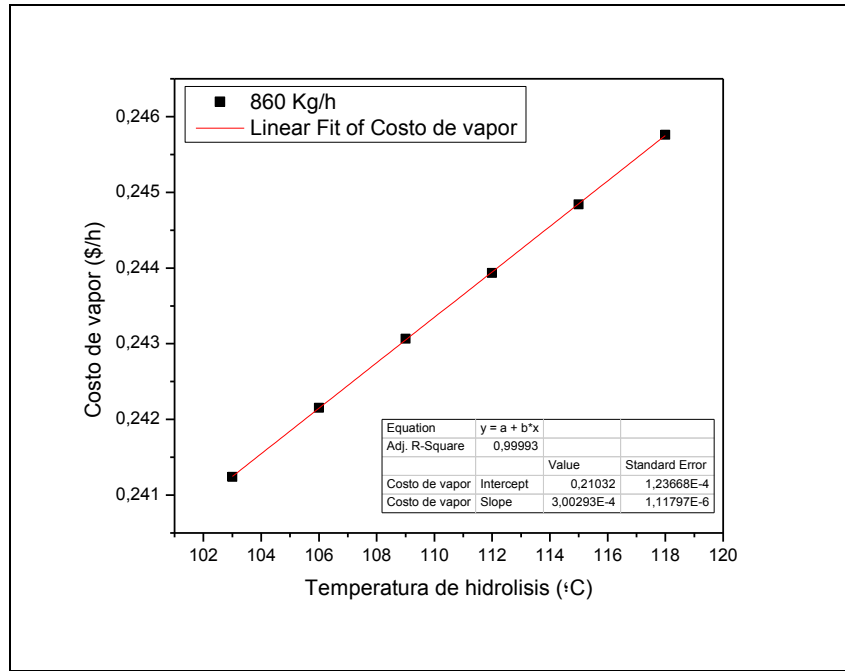


Figura 26: Relación entre el costo de calentamiento del medio en función de la temperatura de hidrólisis

Teniendo en cuenta esta relación y los costos establecidos en la tabla 7 para el ácido y la base, se utilizó el modelo cuadrático obtenido del software estadístico que establece el porcentaje de hidrólisis en función de las variables (tiempo, temperatura y concentración de ácido) y se determinó el valor de cada variable que maximizan el beneficio obtenido por la hidrólisis y fermentación de los carbohidratos hidrolizados. Para esto se utilizó como función objetivo:

$$\begin{aligned} \text{Beneficio} = & \text{Caudal} \times Y_{e/s} \times [Az] \times \%H \times \alpha \times \text{Precio}_{Et} - [Ac] \times \text{Caudal} \times \beta \times \text{Costo}_{Ac} \\ & - [Ac] \times \text{Caudal} \times \frac{[Base]}{[Ac]} \times \delta \times \text{Costo}_{Base} - (\text{Temperatura} \times 0.0003 + 0.2103) \end{aligned} \quad (5)$$

Donde el beneficio está expresado en \$/h; Caudal es 860 L/h (asumiendo densidad igual a 1); $Y_{e/s}$ es el rendimiento de etanol obtenido para la hidrólisis con KOH; [Az] es la concentración de azúcares totales de la vinaza (47,3 g/L); %H es el porcentaje de hidrólisis obtenido según la combinación de variables; α , β y δ son factores de conversión de unidades; Precio_{Et} es el precio obtenido por la venta de todo el etanol producido,

presentado en la tabla 7; $[Ac]$ es la concentración de ácido; $Costo_{Ac}$ y $Costo_{Base}$ son los costos del ácido y la base reportados en la tabla 7; $[Base]$ es la concentración de base estequiométrica necesaria para neutralizar el ácido.

Se utilizó la función "solver" de Excel para obtener la solución óptima, colocando las restricciones adecuadas a las variables estudiadas.

Los valores que permitieron maximizar el beneficio fueron: un tiempo de hidrólisis de 215 minutos, una temperatura de hidrólisis de 116.4 °C, con una concentración de ácido de 6.12 g/L. Estas condiciones se utilizaron para simular el proceso completo de recuperación de etanol y producción de bioetanol adicional utilizando los carbohidratos de las vinazas.

Modelado cinético de la fermentación alcohólica.

Para establecer las cinéticas de crecimiento de biomasa, producción de etanol y consumo de azúcares reductores, se realizaron las siguientes asunciones:

- a) la mezcla en el reactor es suficiente para garantizar que la composición fue la misma en cualquier punto del mismo.
- b) la viabilidad celular es superior al 99 %, no considerándose términos de muerte celular en el modelo. Cabe destacar que ésta asunción fue verificada durante los ensayos, mediante la técnica del azul de metileno.
- c) la agitación es adecuada, garantizando que la transferencia de masa no es limitante del proceso de fermentación alcohólica.

Durante la fermentación alcohólica mediada por levaduras a partir de sustratos azucarados, la célula obtiene energía para su crecimiento y mantenimiento a través de la glucólisis, principal vía de consumo de los carbohidratos en anaerobiosis. Al igual que otros autores, se puede asumir que la relación entre la cantidad de azúcares consumidos y el crecimiento de nuevas células guarda una relación que puede ser expresada en los balances a través de un coeficiente de rendimiento. Esta relación constante se verificó a

partir de los datos experimentales. En el caso de la producción de etanol, dado que éste se produce para proporcionar energía a la célula, no sólo está relacionado al crecimiento celular, sino a la masa de células presentes en el medio. Teniendo en cuenta estas consideraciones, los balances que describen el crecimiento de la biomasa, el consumo de azúcares reductores y la producción de etanol pueden expresarse mediante:

$$\frac{dx}{dt} = \mu(s, e) x \quad (6)$$

$$\frac{ds}{dt} = -\frac{\mu(s, e)}{Y_{x/s}} x \quad (7)$$

$$\frac{de}{dt} = Y_{e/x} \mu(s, e) x + \gamma x \quad (8)$$

Donde μ es la velocidad específica de crecimiento de la biomasa, x , s y e son las concentraciones de biomasa, azúcares y etanol, respectivamente, todas expresadas en g/L. $Y_{x/s}$ es el coeficiente de rendimiento de biomasa, ($g_{\text{biomasa}} / g_{\text{azúcares}}$), $Y_{e/x}$ es el coeficiente de rendimiento de etanol ($g_{\text{etanol}} / g_{\text{biomasa}}$) y γ es una constante cinética de producción de etanol no asociada directamente al crecimiento de la biomasa. Tomando en consideración un posible efecto inhibitorio por producto, observado en las fermentaciones alcohólicas llevadas a cabo por levaduras, se ensayaron dos modelos para cuantificar el crecimiento de la biomasa (Isla et al., 2013; Seluy e Isla, 2014):

$$\mu(s) = \mu_{\max} \frac{s}{s + K_s} \quad (9)$$

$$\mu(s, e) = \mu_{\max} \frac{s}{s + K_s + K_e e^2} \quad (10)$$

Para determinar los valores de los parámetros cinéticos que mejor permiten predecir los valores experimentales, se minimizó la desviación cuadrática media relativa, entre los valores experimentales y los valores predichos por el modelo (Weisberg, 2005).

Capítulo 4 – Tratamiento de las vinazas.

Para el caso de la fermentación alcohólica realizada sobre la vinaza hidrolizada y neutralizada con hidróxido de potasio en las condiciones óptimas desde el punto de vista económico, el modelo descrito por las ecuaciones 6, 7, 8 y 10, fue el que mejor se ajustó a los valores experimentales. En la figura 27 se muestran los valores experimentales y los valores predichos por el modelo.

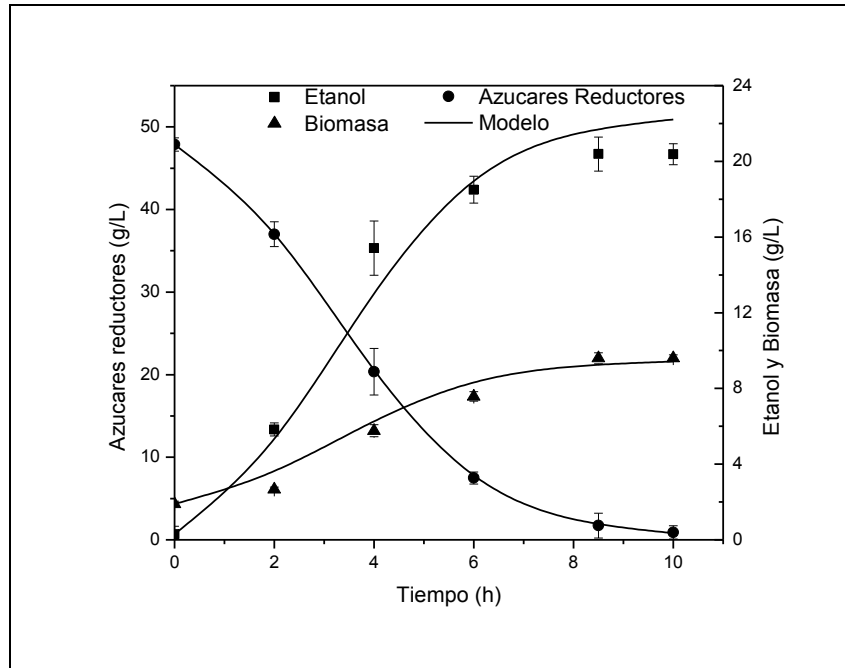


Figura 27: Valores experimentales frente a los valores del modelo para la vinaza neutralizada con KOH y fermentada utilizando 2g/l como inoculo inicial de biomasa.

En la tabla 32 se presenta los valores de los parámetros cinéticos, que permiten el mejor ajuste de los valores experimentales.

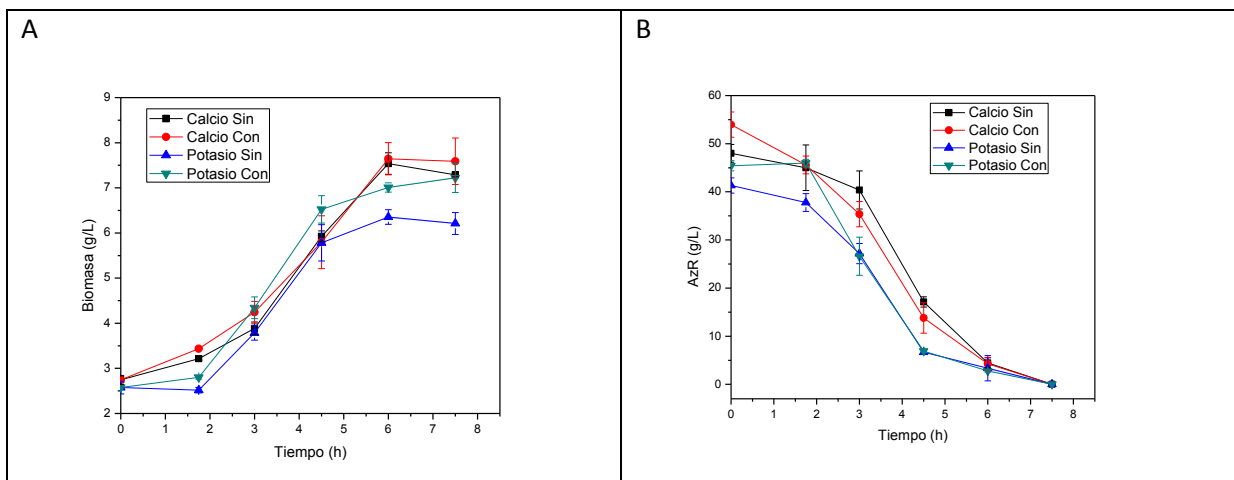
Tabla 32: Parámetros del modelo cinético

Parámetros cinéticos	Valores
μ_{\max} (h^{-1})	0.328
K_s (g/L)	0.012
$Y_{x/s}$ (g_b/g_{az})	0.160
$Y_{e/x}$ (g_e/g_b)	2.910
K_e ($\text{g}_e/(\text{L g}_e^2)$)	0.067

Estos valores son similares a los obtenidos por otros autores en fermentaciones alcohólicas de distintos sustratos azucarados (Phisalaphong et al., 2006; Govindaswamy y Vane, 2007; Dodic et al., 2012; Isla et al., 2013).

Efecto del precipitado formado en la neutralización sobre la fermentación alcohólica.

Se evaluó el efecto de la presencia del precipitado formado durante la neutralización de la vinaza hidrolizada sobre la performance de la fermentación alcohólica posterior, cuando se utilizaron las bases $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y KOH . En la figura 28A, B y C se presenta la evolución en el tiempo para la biomasa, los azúcares reductores y el etanol, del promedio de 3 fermentaciones llevadas a cabo sobre la vinaza hidrolizada y neutralizada con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y KOH , "Con" y "Sin" la presencia del precipitado formado.



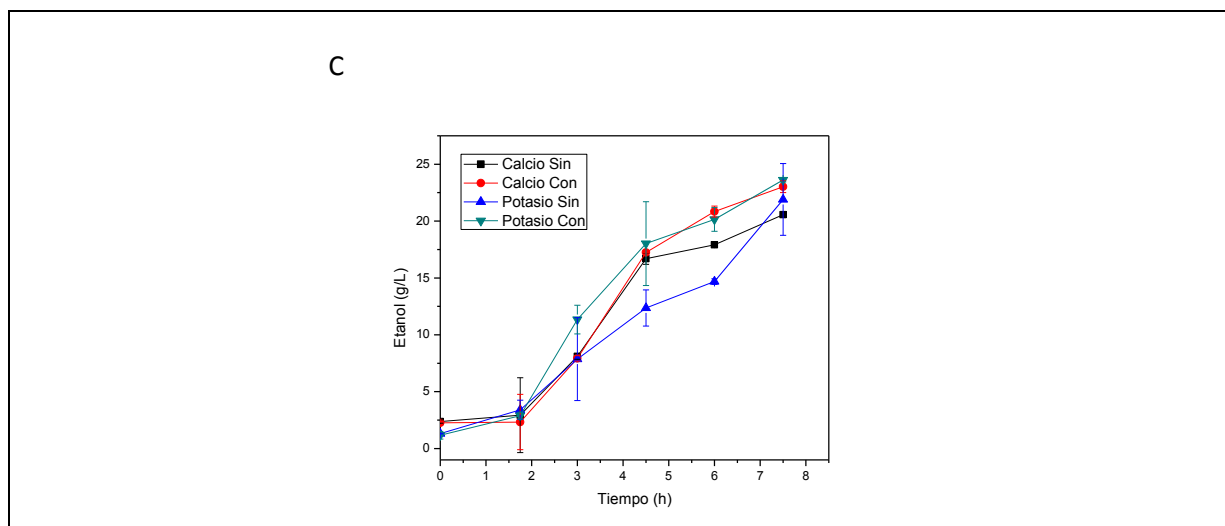


Figura 28: Promedio de las experiencias de fermentación alcohólica de las vinazas con y sin el precipitado formado durante la neutralización con Ca(OH)_2 y KOH.

En la tabla 34 se presenta una comparación de la performance de las distintas fermentaciones, basadas en el rendimiento en etanol, el tiempo de aclimatación (λ), y la velocidad máxima de producción de etanol.

Tabla 33: Valores de los parámetros de fermentación para el efecto del precipitado sobre la producción de etanol en vinazas hidrolizadas.

Parámetros	Ca(OH)_2		KOH	
	Sin	Con	Sin	Con
$Y_{\text{et/az}}$ ($\text{g}_{\text{et/gaz}}$ consumido)	0.32	0.43	0.50	0.50
λ (h)	1.55	1.28	1.86	1.62
$r_{\text{et max}}$ ($\text{g}_{\text{et/L h}}$)	5.03	5.45	3.24	5.47

Cuando se utilizó Ca(OH)_2 como agente neutralizante, el precipitado formado impactó positivamente en la fermentación alcohólica, aumentando la velocidad de producción de etanol, reduciendo el tiempo de aclimatación, pero fundamentalmente aumentando el rendimiento de etanol en un 30 %.

Cuando se utilizó KOH la presencia del sólido formado mejoró la velocidad máxima de producción de etanol, reduciendo además el tiempo de aclimatación.

Estos resultados demuestran que no sería necesario separar los sólidos, previo a la fermentación alcohólica; más aún, su presencia en el medio de fermentación tendría

un impacto positivo sobre la misma. Este resultado concuerdan con lo propuesto por (Thomas et al., 1994), que la presencia de sólidos en el medio de fermentación favorecería la coalescencia de las burbujas de CO₂, reduciendo su concentración en el medio, disminuyendo el efecto inhibitorio de éste sobre la fermentación.

Simulación de la hidrólisis y de la recuperación de etanol de las vinazas fermentadas

En la figura 29 se presenta el esquema 4, propuesto para el tratamiento de la vinaza mediante la hidrólisis de los carbohidratos, la fermentación alcohólica de los mismos para obtener la vinaza fermentada y finalmente la remoción del etanol producido.

Éste comprende una bomba que impulsa la vinaza hacia el proceso de hidrólisis, previo al cual la misma intercambia calor con la salida del proceso y es calentada hasta la temperatura de hidrólisis. Una vez que la vinaza fue hidrolizada y neutralizada, es almacenada para la posterior fermentación. Otra bomba alimenta el tanque de fermentación, donde los carbohidratos son convertidos a etanol, y nuevamente la vinaza fermentada, una vez separadas las levaduras, es almacenada. Desde este tanque la vinaza fermentada es enviada hasta una columna despojadora de etanol con re-hervidor y condensador, encargada de recuperar el etanol producido, con el objetivo de obtener por el tope un producto con una concentración de etanol de 30-40 %m/m. Previo al ingreso a la columna, el efluente intercambia calor con la descarga. La alimentación se realiza en el primer plato.

Capítulo 4 – Tratamiento de las vinazas.

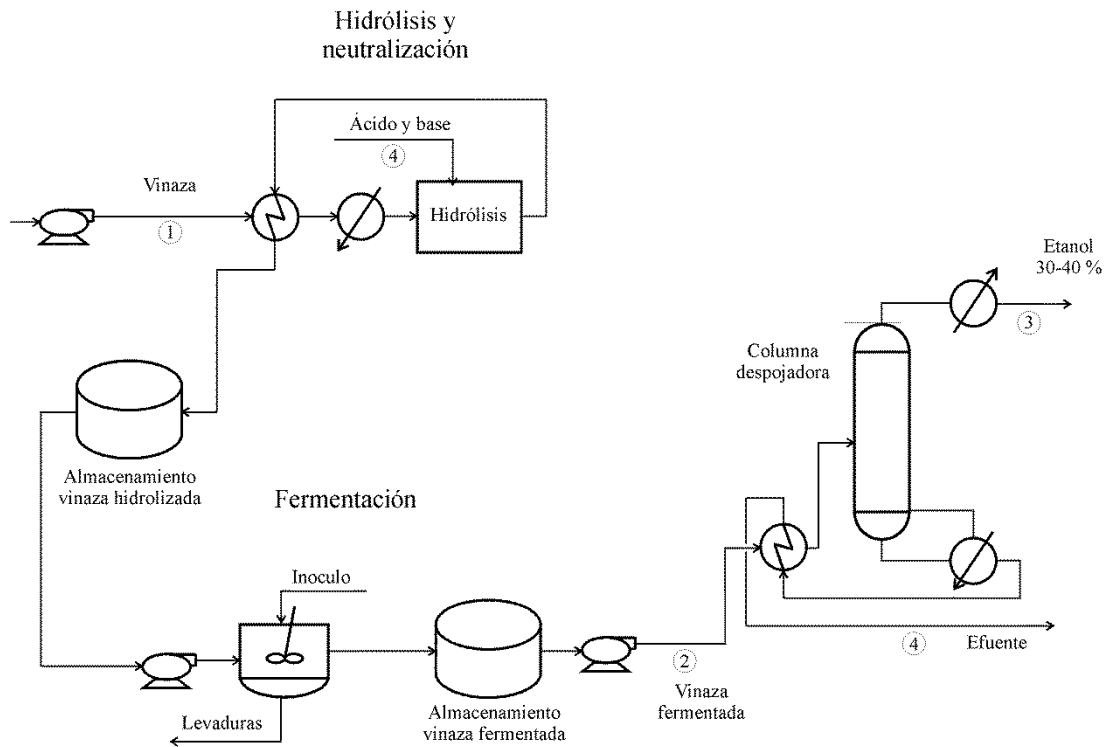


Figura 29: Esquema 4 para el tratamiento de la vinaza mediante hidrólisis, fermentación y recuperación del etanol producido.

En la tabla 34 se muestra la composición de las principales corrientes obtenidas de la salida de simulación.

Tabla 34: Flujos máxicos obtenidos de la salida de simulación del esquema 4.

Compuestos	Flujo máxico de las corrientes (Kg/h)			
	1	2	3	4
Agua	808,67	824,88	66,25	758,63
Etanol	0,07	17,54	17,25	0,29
Glicerol	10,61	17,58	0,00	17,58
Dextrinas	40,64	0,00	0,00	0,00
Temperatura (°C)	37,00	30,50	86,82	35,00
Caudal (kg/h)	860,00	860,00	83,50	776,50

El esquema simulado permite obtener un producto con una concentración de etanol de 20.5 %m/m. El consumo de calor en el re-hervidor de la columna en estas condiciones fue 48068 kcal/h. Para elevar la temperatura de la vinaza hasta el valor de la

temperatura de hidrólisis se consumieron 10277 Kcal/h, totalizando un consumo de calor por el esquema de 58345 Kcal/h. Con la configuración simulada se logra obtener una recuperación superior al 99,5% del etanol que ingresa al sistema, con un consumo específico de 3382 Kcal/kg etanol.

El segundo esquema analizado presentado en la figura 30, a diferencia del primer esquema, posee una primer columna despojadora que envía la corriente de tope en forma de vapor a una segunda columna, rectificadora, la cual es encargada de elevar la concentración de etanol por encima del 92 %m/m.

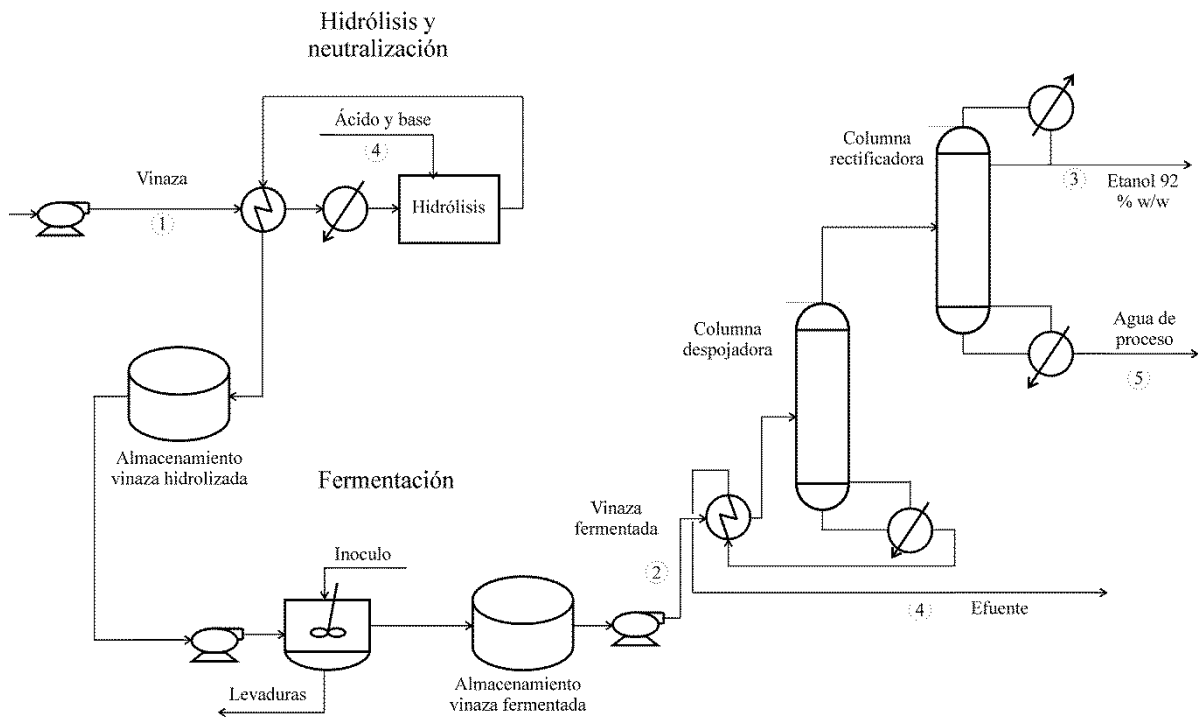


Figura 30: Esquema 5 para el tratamiento de la vinaza mediante hidrólisis, fermentación y recuperación del etanol producido.

En la tabla 35 se muestra la composición de las principales corrientes obtenidas de la salida de simulación.

Capítulo 4 – Tratamiento de las vinazas.

Tabla 35: Flujos másicos obtenidos de la salida de simulación del esquema 5

Compuestos	Flujo másico de las corrientes (Kg/h)					
	1	2	3	4	5	6
Agua	808,67	824,88	65,63	1,54	64,09	759,25
Etanol	0,07	17,54	17,37	17,37	0,00	0,16
Glicerol	10,61	17,58	0,00	0,00	0,00	17,58
Dextrinas	40,64	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Temperatura (°C)	37,00	30,50	97,70	78,25	100,00	35,00
Caudal (kg/h)	860,00	860,00	83,00	18,91	64,09	777,00

El esquema simulado permite obtener un producto con una concentración de etanol de 91,90 %m/m. El consumo de calor de los re-hervidores de las columnas despojadora y rectificadora, fue de 47616 y 4128 Kcal/h respectivamente. Para elevar la temperatura de la vinaza hasta el valor de la temperatura de hidrólisis se consumieron 10277 Kcal/h, totalizando un consumo de calor por el esquema de 62081 Kcal/h. Con la configuración simulada se logra obtener una recuperación de etanol superior al 99,5% del que ingresa al sistema, con un consumo específico de 3574 Kcal/kg etanol.

El tercer esquema estudiado presentado en la figura 31, además de las columnas de destilación contempladas en el esquema 5 comprende una tercera columna encargada de elevar la concentración de etanol a valores superiores al 95%v/v, para obtener alcohol potable o de uso alimentario.

Capítulo 4 – Tratamiento de las vinazas.

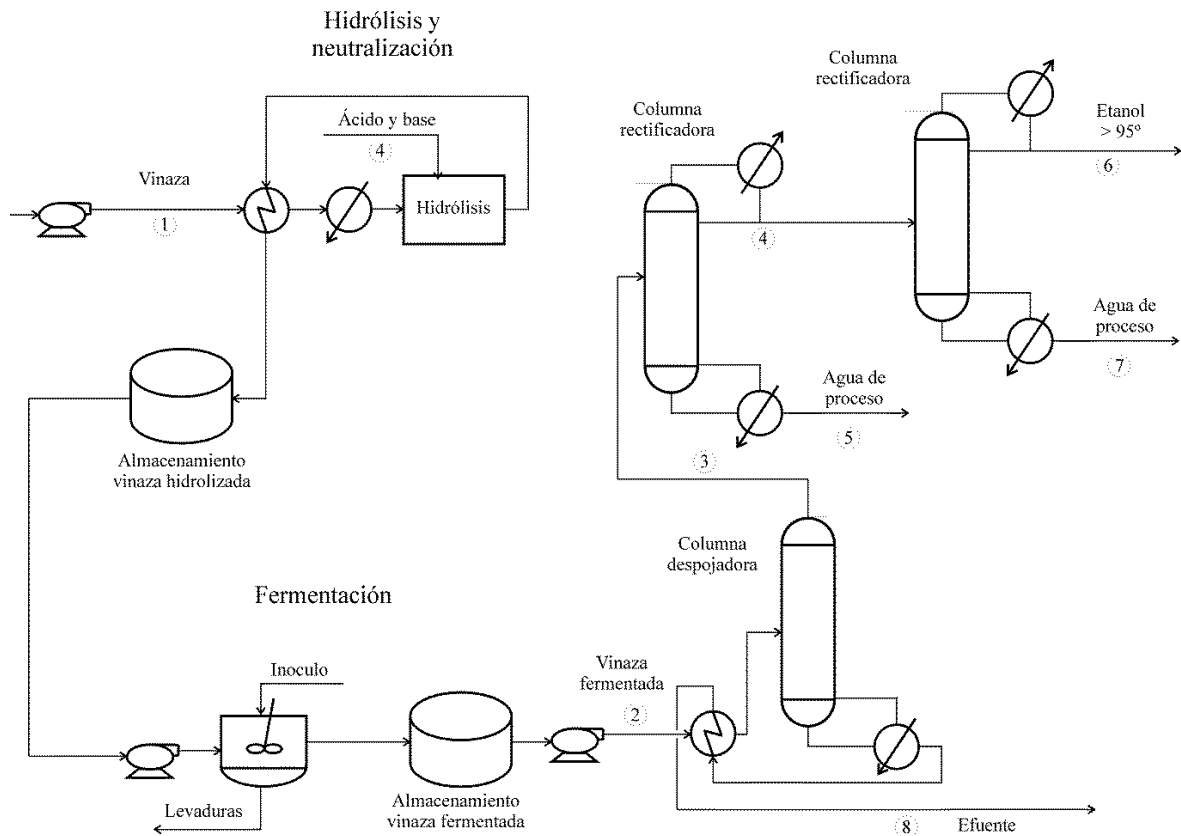


Figura 31: Esquema 6 para el tratamiento de la vinaza mediante hidrólisis, fermentación y recuperación del etanol producido.

El esquema simulado permite obtener un producto con una concentración de 94 %m/m, cumpliendo las especificaciones para el alcohol de uso alimentario.

El consumo de calor obtenido en los re-hervidores de las columnas despojadora y rectificadoras, fue de 47676, 4128 y 14002 Kcal/h respectivamente. Para elevar la temperatura de la vinaza hasta el valor de la temperatura de hidrólisis se consumieron 10277 Kcal/h, totalizando un consumo de calor por el esquema de 76083 Kcal/h. Con la configuración simulada se logra obtener una recuperación superior al 99,5% del etanol que ingresa al sistema, con un consumo específico de 4380 Kcal/Kg etanol.

En la tabla 11 se muestra la composición de las principales corrientes obtenidas de la salida de simulación.

Capítulo 4 – Tratamiento de las vinazas.

Tabla 36: Flujos másicos obtenidos de la salida de simulación del esquema 6.

Compuestos	Flujo másico de las corrientes (Kg/h)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Agua	808,67	824,88	65,63	1,54	1,12	0,42	64,09	759,25
Etanol	0,07	17,54	17,37	17,37	17,37	0,00	0,00	0,16
Glicerol	10,61	17,58	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	17,58
Dextrinas	40,64	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Temperatura (°C)	37,00	30,50	97,70	78,25	100,00	35,00		
Caudal (kg/h)	860,00	860,00	83,00	18,91	18,49	0,42	64,09	777,00

Impacto de la remoción de etanol sobre la DQO de la vinaza.

Finalizada la fermentación, la biomasa se separó por centrifugación y el etanol producido presente en el sobrenadante se separó por destilación según se describió en materiales y métodos del capítulo 3. Se determinó la DQO en las distintas etapas del proceso. Los resultados se presentan en la tabla 33.

Tabla 37: Valores de DQO y del porcentaje de remoción a través del proceso de fermentación alcohólica de los carbohidratos presentes en la vinaza

Efluente	Valores
DQO de la vinaza (mg O ₂ /L)	72150 ± 2480
DQO de la vinaza fermentada (mg O ₂ /L)	62680 ± 1480
DQO de la vinaza destilada (mg O ₂ /L)	24550 ± 1150
Volumen inicial (mL)	1000 ± 10
Volumen final (mL)	903 ± 10
Reducción de la DQO (%)	65.97
Reducción de la carga orgánica	69.27

El proceso de hidrólisis de los carbohidratos y la posterior fermentación alcohólica de la vinaza permitió reducir la DQO en un 65% y la carga orgánica en un 69 %.

Evaluación económica

Se realizó un análisis económico considerando el costo operativo de los diferentes esquemas simulados y el crédito obtenido por la producción de etanol en cada caso. El costo de electricidad consumida en las bombas es despreciable frente a los otros costos considerados, no así el costo de separación de los sólidos iniciales, que se mencionó anteriormente en materiales y métodos.

Se tuvo en cuenta además el costo de 4 empleados (1 por turno de 8 horas y un encargado general). Se contempló además un tanque para almacenar la vinaza hidrolizada y neutralizada, como así también un tanque de almacenamiento de la vinaza fermentada, ambos con capacidad para 2 días de operación, con un volumen de 45 m³

Capítulo 4 – Tratamiento de las vinazas.

cada uno, de manera de incluir el proceso de fermentación batch dentro de un esquema continuo de funcionamiento.

Se consideró además para todas las alternativas UN tanque para 7 días de almacenamiento de producto. Los tanques de almacenamiento de producto fueron de 14, 3 y 3 m³ para los esquemas 4, 5 y 6 respectivamente.

El consumo de ácido sulfúrico e hidróxido de sodio se determinó durante la optimización de las variables de hidrólisis.

En la tabla 38 se resumen los costos operativos y de inversión de capital para cada una de las alternativas evaluadas, incluyendo una amortización en un período de 15 años para los equipos contemplados en la inversión de capital. Los valores se expresan en pesos argentinos considerando un factor de conversión 1U\$D = 8.55 \$ Argentinos.

Como indicadores económicos se determinó la TIR, VAN y el período de recupero del capital para cada alternativa, analizando un lapso de 15 años con períodos de pago anual.

Tabla 38: resumen de la evaluación económica de las alternativas propuestas para el tratamiento de la vinaza.

	Esquema 4	Esquema 5	Esquema 6
<i>Costos variables</i>	\$/año	\$/año	\$/año
Vapor	134000	142600	174700
Ácido y base	256000	256000	256000
Tratamiento de efluentes	92110	92110	92110
Empleados	836100	836100	836100
Electricidad	50000	50000	50000
<i>Otros costos</i>			
Amortización sin UASB	284533	307533	332333
Amortización sin UASB	311467	334467	359267
<i>Crédito</i>			
Etanol	1170000	1170000	1170000
Gas (metano)	13136	13136	13136

Capítulo 4 – Tratamiento de las vinazas.

Utilidad sin UASB	-469607	-501207	-558107
Utilidad con UASB	-496541	-528141	-585041
<hr/>			
<i>Inversión de capital</i>	\$	\$	\$
UASB	404000	404000	404000
Hidrólisis y fermentación	2885000	2885000	2885000
Centrífuga Decanter	410000	410000	410000
Sistema destilación	695000	1070000	1442000
Tanques	278000	248000	248000
Total sin UASB	4268000	4613000	4985000
Total con UASB	4672000	5017000	5389000
<hr/>			
<i>Variables económicas</i>			
TIR (mensual)			
VAN	- \$	- \$	- \$
Recupero del capital (meses)			
<hr/>			

Como se puede observar de la tabla, las tres alternativas analizadas presentan un VAN menor a cero, por lo que no se pudo calcular un valor de TIR, ni un periodo de recupero del capital. Estos resultados ponen de manifiesto que el tratamiento de la vinaza, al menos en las condiciones en que fue simulado, no es un proyecto económicamente viable.

Sin embargo, es de destacar que este mismo sistema podría presentarse de manera integrada a los esquemas de recuperación de etanol estudiados en el capítulo 3, donde los mayores componentes del gasto variable, como el gasto en personal y en amortización, sería compartido, disminuyendo además considerablemente los costos de tratamiento de efluentes. Por otra parte ambos sistemas de destilación se encontrarían parcialmente integrados reduciendo los gastos de inversión de capital, y consecuentemente de amortización. La simulación y el estudio económico de esta integración se presenta en el capítulo 6.

Conclusiones parciales

- Los carbohidratos presentes en las vinazas no son fermentables por levaduras del género *Saccharomyces* si no son previamente hidrolizados a azúcares simples.
- La fermentación de la vinaza previamente hidrolizada y neutralizada con KOH permite obtener un rendimiento global superior a 0.43 g etanol por g de carbohidratos iniciales, lo que representa el 84% del rendimiento teórico.
- La suplementación con sales fuentes de macro y micronutrientes (resultados obtenidos en ambos ensayos de cribado Placket-Burmann y Factorial), no produjeron mejoras significativas sobre el rendimiento en etanol, por lo que no sería necesario suplementar la vinaza hidrolizada para llevar a cabo una fermentación exitosa de los carbohidratos presentes en ella.
- El estudio de las variables de hidrólisis, tiempo de residencia, temperatura y concentración de ácido sulfúrico, permitió obtener un modelo estadístico para el porcentaje de hidrólisis en función de las mismas.
- Se establecieron los valores más convenientes para dichas variables, minimizando el costo operativo del proceso.
- Se ensayaron distintos modelos cinéticos para predecir el comportamiento experimental de las fermentaciones alcohólicas, y se determinaron sus parámetros a través de la resolución simultánea del sistema de ecuaciones diferenciales que describe el proceso.
- El estudio del efecto del precipitado formado durante la neutralización sobre la fermentación posterior de la vinaza hidrolizada y neutralizada, demostró que no sólo es innecesario separar los sólidos formados, sino que la presencia de éstos impacta positivamente en la performance de la fermentación alcohólica posterior.
- La hidrólisis de los carbohidratos, seguida de la fermentación alcohólica de los mismos y la posterior remoción del etanol producido por destilación, permitió reducir la DQO de las vinazas en un 65% respecto de su valor inicial.

Capítulo 4 – Tratamiento de las vinazas.

- El análisis económico de los distintos esquemas analizados para el tratamiento de las vinazas, pone de manifiesto que el proceso no es rentable por sí mismo y necesariamente debería estar acoplado al proceso de recuperación de etanol presentado en el capítulo 3.

Capítulo 5: Producción de ácido acético a partir de efluentes de cervecería.

Introducción

El 65 % de la DQO de la cerveza de descarte, como de la fracción líquida del excedente de levaduras, viene dado por su contenido de etanol. En el Capítulo 3 se propusieron distintos esquemas que permiten la recuperación de etanol a partir de estas corrientes. Si bien a través de estos procesos se obtiene una reducción importante en la carga orgánica de estos efluentes, éstos siguen conteniendo niveles de materia orgánica 25 veces superiores a los de las aguas residuales tratadas en la industria.

La fermentación acética es un proceso llevado a cabo por bacterias acéticas, las que en presencia de oxígeno oxidan el etanol contenido en un sustrato a ácido acético y agua. Existen principalmente 2 procesos: en el primer método, más antiguo, la fermentación acética se realiza utilizando un cultivo superficial en el cual las bacterias acéticas se encuentran situadas en la interfase líquido/gas o fijadas a soportes de materiales tales como virutas, en contacto directo con el oxígeno del aire; el otro método se denomina "fermentación en cultivo sumergido", ya que la cabola fermentación se lleva a cabo en reactores tanque agitados, donde las bacterias acéticas se encuentran suspendidas en el seno del líquido a fermentar y se introduce aire en forma continua (sólo o enriquecido con oxígeno) bajo condiciones que permitan la máxima transferencia desde la fase gaseosa a la fase líquida. El segundo proceso es el más utilizado actualmente, ya que permite un mejor control de las variables del proceso, obteniendo un producto final más uniforme lote a lote (Romero et al., 1994; Garrido-Vidal et al., 2003; Jiménez-Hornero et al., 2009).

Las bacterias acéticas utilizadas en este proceso son sensibles a las concentraciones de los principales sustratos y productos, etanol, oxígeno y ácido acético, como así también a la temperatura. A bajas concentraciones de etanol, y más cuando

éstas están combinadas con altos niveles de ácido acético, la viabilidad de las bacterias desciende abruptamente (Romero et al., 1994; Garrido-Vidal et al., 2003; Jiménez-Hornero et al., 2009). El producto (vinagre) debe contener el menor etanol posible, no sólo por las exigencias establecidas para el producto, sino porque se estaría desperdiciando sustrato. Esto hace que los procesos de fermentación acética se prolonguen hasta que la concentración de etanol en el medio llegue a un valor mínimo de compromiso entre no desperdiciar sustrato y mantener una viabilidad adecuada de las bacterias. Este es el principal motivo por el cual las fermentaciones acéticas se realizan en cultivo por lotes (batch), donde una vez finalizada la fermentación parte del cultivo es retirado como producto, y el resto sirve de inóculo para la fermentación siguiente. De realizarse en modo continuo, sería necesario un estricto control de las variables de manera de evitar la pérdida de viabilidad del cultivo.

Dado el contenido de etanol de los efluentes estudiados, se propuso utilizarlos como medio para llevar a cabo una fermentación acética, convirtiendo principalmente el etanol a ácido acético, para obtener vinagre de cerveza. De esta manera, todo el volumen a tratar pasaría a formar parte del producto, eliminando prácticamente las necesidades de tratamiento.

En el presente capítulo se estudió la factibilidad de utilizar los efluentes (fracción líquida del excedente de levaduras y cerveza de descarte), como medio para producir ácido acético por fermentación en cultivo sumergido. Inicialmente se establecieron las condiciones de conservación y recuperación de las bacterias acéticas. Se estudió el efecto del SO_2 , conservante presente en ciertas cervezas, sobre la viabilidad del cultivo y la performance de la fermentación acética. También se estudió el efecto de otros conservantes utilizados en bebidas, como el sorbato de potasio y el benzoato de sodio. Se estudió la influencia de distintos sistemas de aireación sobre la velocidad de producción de ácido acético y sobre el rendimiento de la fermentación, determinado por el cociente entre el ácido acético producido en un período de tiempo y el etanol consumido en ese mismo período. Se exhibe además el desempeño de cuatro bacterias,

dos aisladas previamente por el grupo de trabajo y otras dos, cepas industriales de marcas reconocidas disponibles en el mercado.

También en el presente capítulo se describe el diseño, construcción y montaje de un reactor aeróbico de 6L de volumen con control de agitación/aireación y temperatura, que se construyó en el marco de esta tesis. Se utilizó el equipo para realizar fermentaciones acéticas de los efluentes y se evaluó la performance en estas condiciones de cultivo, más similares a las de los fermentadores industriales. También se realizaron ensayos de fermentación sobre alcohol etílico comercial y sobre alcohol recuperado a partir de los efluentes, conteniendo todos los compuestos volátiles mencionados en el capítulo 3. Se propusieron distintas alternativas para el tratamiento de los efluentes, y se realizó un análisis técnico-económico de las mismas.

Materiales y métodos

Microorganismos y medio de cultivo

Para los ensayos de fermentación se estudiaron cuatro cepas de bacterias acéticas. dos aisladas por el grupo de trabajo, una correspondiente al género *Acetobacter*, denominada AA y otra perteneciente al género *Gluconobacter*, denominada GBC4; y dos cepas comerciales, denominadas F y C. Las cepas originales se conservaron a -80°C en medio MR previamente descrito en la literatura, como medio específico para bacterias acéticas (Williams & Wilkins, 1984) El stock de trabajo se mantuvo en estrías, en tubos pico de flauta, utilizando medio MR agar, el cual se repicó quincenalmente.

Estudio de conservación y recuperación

Se ensayaron distintos protocolos para la conservación y posterior recuperación de las cepas en distintos medios de cultivo: AE, RAE y MR (Entani et al., 1985; Sokollek et al., 1997; Williams & Wilkins, 1984), cuya composición se presenta en la tabla 39. Se conservaron a cuatro temperaturas sobre cada uno de los medios: 20-25 °C (temperatura ambiente); 4°C (heladera); -20°C y -80°C. Para las muestras que se

Capítulo 5 – Producción de vinagre de cerveza

conservaron a temperatura ambiente y 4°C, se utilizaron tubos de 16 mm estériles, con tapón de algodón para permitir el intercambio gaseoso, a los cuales se les agregó 1 mL de un cultivo previamente crecido en el medio correspondiente y 0.5 mL de medio estéril. Para las muestras que se conservaron a -20°C y -80°C se utilizaron tubos eppendorf estériles, con 800 µL de cultivo y 400 µL de medio estéril. A los tubos se les agregó 300 µL de glicerol estéril como crio-protector. Para cada una de las condiciones evaluadas se realizaron muestras por duplicado, las cuales fueron analizadas luego de una semana, un mes, y 6 meses.

Una vez transcurrido el tiempo, 500 µL de cada tubo proveniente de las diferentes formas de conservación se transfirieron a 5 mL del medio correspondiente (AE, RAE y MR) en tubos de 16 mm con tapón de algodón, y se determinó la absorbancia de cada tubo a 400 nm (como una medida del crecimiento de la biomasa), cada 24 horas, durante 7 días. Los tubos fueron cultivados en agitación (200 rpm) a 30 °C.

Tabla 39: composición de los medios de cultivo utilizados para la conservación de bacterias acéticas.

	RAE	AE	MR
Glucosa ^a	40	5	0.5
Extracto de levadura ^a	10	2	5
Peptona de carne ^a	10	3	3
Na ₂ HPO ₄ ^a	3.38	0	0
Acido Cítrico ^a	1.5	0	0
Acetozim ^a	0	1.5	0
Etanol ^b	2	2	1.5

^a (g/L); ^b (%v/v)

Efluentes estudiados

A diferencia de la producción de etanol, el cual no está influenciado por el tipo de cerveza utilizada, las características organolépticas del vinagre de cerveza dependen en gran medida de la materia prima utilizada. Por este motivo, se estudió la factibilidad de producir ácido acético utilizando como efluentes las diferentes clases de cerveza producida en la empresa adoptada como caso de estudio, una mezcla de cervezas la cual

se realizó en las mismas proporciones que se compone el descarte de cerveza.. Se utilizó también la fracción líquida de los excedentes de levaduras provenientes de los distintos procesos de producción llevados a cabo en la empresa. Éstos se acondicionaron como se describió en el capítulo 3.

Se utilizó como control medio AE, suplementado con etanol comercial hasta la concentración de la fracción líquida de los excedentes de levaduras. Se estudió también suplementar el medio AE con etanol recuperado a partir de los mismos efluentes, en el equipo de destilación descrito en el capítulo 3, conteniendo todos los compuestos volátiles mencionados. Para indicar la concentración inicial de etanol y ácido acético con la cual se preparó cada medio, a continuación del nombre se colocó un número indicador del %m/m de ácido acético seguido por la letra a, y un número indicador del %v/v de etanol seguido por la letra e, por ejemplo el medio AE 1a2e, indica que se utilizó medio AE, conteniendo un 1% m/m de ácido acético y un 2%v/v de etanol.

Fermentación acética

Los ensayos de fermentación acética se realizaron en modo por lotes en todos los tipos de reactores utilizados. Una vez que la fermentación se dio por terminada (en función de la concentración de etanol final en el medio o de la concentración de ácido acético final), se retiró un volumen de medio (producto), dejando el restante volumen como inóculo de la fermentación siguiente. Para cada condición estudiada, se realizaron al menos 3 repiques sucesivos.

Durante las fermentaciones se tomaron muestras a distintos tiempos, para el control del proceso. En función de las variables estudiadas se determinó la concentración de: biomasa, etanol, ácido acético, oxígeno disuelto y dióxido de azufre.

Exigencias del Código Alimentario Argentino para el vinagre de cerveza.

Vinagre de cerveza: Obtenido por fermentación acética de cerveza de título alcohólico adecuado.

Deberá tener color amarillo y sabor agrio y amargo, que recuerde al de la malta y el lúpulo.

No deberá contener sustancias amargas distintas a las del lúpulo.

Exigencias analíticas: Densidad a 15° 1.017 a 1,040; residuo seco 1,0 a 2,5%, cenizas aproximadamente 0,25%; acidez mínima en ácido acético 4,0%; alcohol máximo 10% de la acidez total. Además su residuo deberá tener una fuerte proporción de proteínas y fosfatos, presencia de maltosa y ausencia de tartratos. Deberá precipitar por el alcohol absoluto (1+2).

Este producto deberá denominarse: Vinagre de cerveza.

Determinaciones analíticas

Determinación de biomasa en la fermentación acética

Para determinar la biomasa durante las fermentaciones, se estableció una relación entre la concentración de SSV de un cultivo y la absorbancia del mismo a 400 nm. Para esto se realizó una suspensión de bacterias en plena fase de crecimiento exponencial en agua destilada a diferentes concentraciones, a las cuales se les midió la absorbancia a 400 nm con espectrofotómetro HACH y la concentración de SSV según la técnica estándar (Eaton et al., 2005). La ecuación obtenida fue:

$$\text{Biomasa [g/L]} = (0.408 \times \text{Absorbancia (400nm)}) \times \text{dilución}^{-1} \quad (11)$$

Durante las experiencias, un volumen de muestra se diluyó en agua destilada, para que la absorbancia caiga en el rango lineal, el cual se presentó para valores inferiores a 0.3 unidades de absorbancia. Luego la muestra se centrifugó para remover las células y se determinó la absorbancia del medio. Ésta se restó al valor total obtenido, para establecer el valor de absorbancia correspondiente a las células. Finalmente la concentración en g/L se determinó utilizando la curva patrón.

Determinación del número de células viables

Para determinar el número de células viables se realizó un recuento en placa utilizando medio AE 1a2e, empleando agar-agar como agente solidificante, en una

concentración de 15 g/L. Se sembró en las placas 100 μ L de muestra previamente diluida en medio AE estéril, de manera de obtener un número de colonias entre 30 y 300. Las placas sembradas se incubaron en estufa a 30 °C durante 72 h.

Ciertos autores manifiestan que la incubación de las placas dentro de una cámara húmeda en la estufa, permite una mayor recuperación de células viables (Sokollek y Hammes, 1997), por este motivo se estudió el efecto de utilizar una cámara húmeda dentro de la estufa de cultivo para incubar las placas.

Determinación de etanol en la fermentación acética

La concentración de etanol en las fermentaciones se determinó utilizando el dispositivo descrito en el capítulo 4. La muestra se centrifugó 5' a 6000 rpm para separar la biomasa, y el sobrenadante se diluyó apropiadamente con agua destilada para ingresar en el rango de la curva de calibrado. Se realizó una curva de calibrado para cada experiencia.

Se evaluó el efecto de la presencia de ácido acético en el medio sobre la respuesta del sensor. Para esto se realizaron por triplicado curvas de calibrado con la mismas concentraciones de etanol mencionadas en el capítulo 3, y para tres concentraciones de ácido acético, 0.2, 0.6 y 1 g/L. Teniendo en cuenta que la dilución realizada a las muestras de los ensayos de fermentación para ingresar dentro del rango de la curva de calibrado fue 1/50, los valores estudiados de ácido acético equivalen a tener en el medio fermentado 10, 30 y 50 g/L respectivamente.

Determinación de ácido acético

La concentración de ácido acético se determinó por volumetría ácido-base, utilizando fenolftaleína como indicador. La acidez determinada se atribuyó en su totalidad al ácido acético. Los materiales utilizados fueron:

- Bureta
- Solución de fenolftaleína (indicador)
- Solución de NaOH, previamente valorada con Ftalato ácido de potasio.
- Erlenmeyer de 100 mL

Para las determinaciones, las muestras se centrifugaron 5' a 6000 rpm para remover las células y se utilizó el sobrenadante en la determinación. 2 mL del sobrenadante se colocaron en los erlenmeyer y se le agregó 2 gotas de indicador (fenolftaleína). Se tituló con solución de NaOH ≈ 0.1 M hasta viraje del indicador.

Determinación de oxígeno disuelto

Durante las experiencias y en los intervalos de tiempo que se tomaron las muestras, se determinó la concentración de oxígeno disuelto a través de un oxímetro portátil Orion 830^a, introduciendo el electrodo hasta estabilización de la lectura.

Determinación de dióxido de azufre libre y total

La determinación de dióxido de azufre libre y total, se realizó por el método de Ripper modificado (Ripper et al., 1892), el cual se basa en la capacidad del Iodo de oxidar el H_2SO_3 a H_2SO_4 . Los materiales utilizados fueron:

- Solución de IK/ IO_4K
- Almidón soluble (indicador).
- Solución de KOH 2 M
- Solución de ácido sulfúrico 6 M (dilución 1/3 del ácido sulfúrico comercial).
- Bureta
- Erlenmeyer de 100 mL con y sin tapón

Para las determinaciones, las muestras se centrifugaron 5' a 6000 rpm para remover las células. Para determinar la concentración de SO_2 libre, a 2 mL de sobrenadante se le agregó 200 μL de la solución del indicador y posteriormente 200 μL de la solución de ácido sulfúrico, y se procedió rápidamente a su titulación con la solución de IK/ IO_4K . Para determinar la concentración de SO_2 total, a 2 mL de muestra se le agregaron 200 μL de KOH 2N, se taparon los erlenmeyer y se dejó reposar durante 30 segundos. Posteriormente se agregó el indicador y 400 μL de la solución de ácido sulfúrico, procediendo a su titulación rápidamente con la solución de IK/ IO_4K .

Reactores utilizados

En la realización de las distintas experiencias se utilizaron erlenmeyer de 1L, reactores agitados de 2.5 L de volumen útil y un reactor piloto de 6 L de volumen útil.

Erlenmeyer de 1 L

Las experiencias realizadas sobre erlenmeyer de 1L, utilizando 300 o 500 mL de volumen, se realizaron sin control de temperatura, la aireación estuvo provista por un aireador de pecera Atman 703 y una piedra difusora. La agitación fue provista por un agitador orbital Vicking M23, a 110-120 rpm. Para la toma de muestra se utilizaron pipetas estériles. Una vez extraída la muestra, la misma se colocó en tubos de vidrio (viales) estériles hasta las determinaciones.

Reactores tanques agitados

En la figura 32 se presenta una imagen de los reactores tanques agitados utilizados. Éstos no contaron con control de temperatura. La agitación estuvo provista por impulsor tipo hélice y la aireación a través de bombas de pecera tipo Atman 703, con un difusor de triple salida de vidrio sinterizado. Se logró una aireación más eficiente, por la combinación de mayor agitación provista por el motor y menor tamaño de burbujas de aire obtenidas con el difusor de vidrio sinterizado. Para la toma de muestra se utilizaron pipetas estériles. Una vez extraída la muestra, se colocó en tubos de vidrio con tapa rosca (viales) estériles hasta las determinaciones.



Figura 32: Reactores tanque agitados utilizados en la producción de ácido acético a partir de fracción líquida de excedente de levaduras (izquierda) y etanol recuperado del la mezcla de efluentes (derecha).

Reactor piloto

Diseño y montaje

En el marco de la presente tesis se diseñó y construyó un reactor piloto, financiado a través de un convenio llevado a cabo con la Compañía industrial Cervecera S.A. (CICSA).

Una de las variables más importantes en la fermentación acética es la concentración de oxígeno disuelto, por lo que el sistema de aeración es un elemento clave en el diseño del reactor. Se propuso una turbina auto aspirante como elemento de suministro de aire, la que se diseñó procurando no introducir bujes ni rodamientos en la parte inferior del reactor, para evitar posibles fugas o pérdidas. Se reprodujo un prototipo utilizado para aireación en estanques de tratamiento de efluentes, construido en delrin, compuesto por un eje hueco unido a un impulsor, que por su morfología al girar en el seno del líquido genera un vacío hacia el centro del eje que produce la aspiración de aire y su distribución como burbujas final en el reactor. En las figuras 33 y 34 se muestran imágenes de la turbina construida, como así también un croquis de la vista en corte.

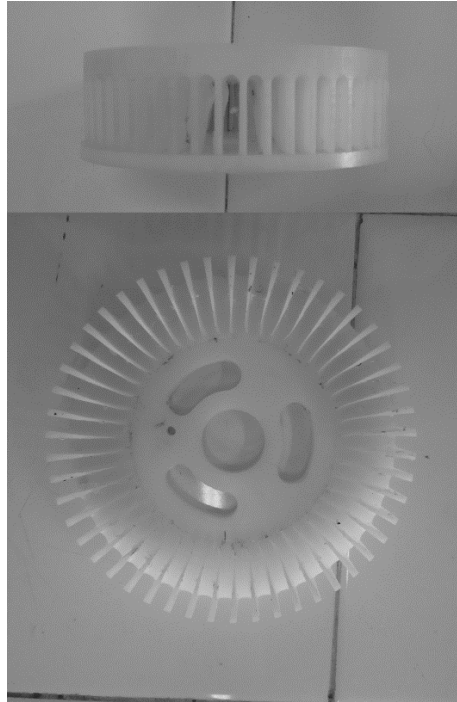


Figura 33: vista lateral del impulsor y vista inferior del mismo.

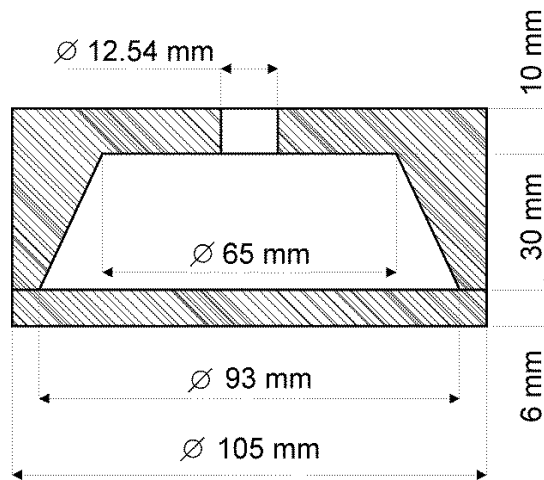


Figura 34: vista en corte y detalles del impulsor.

El diseño original fue modificado incorporando orificios en la parte superior del impulsor, permitiendo el ingreso del fluido al interior del impulsor en forma vertical, el cual sale en forma radial aumentando el vacío obtenido en la zona central de la turbina, reduciendo el número de revoluciones a la que debe girar el conjunto para generar la depresión necesaria que permita el funcionamiento auto aspirante. Este conjunto eje-impulsor, fue acoplado a un motor trifásico SIEMENS, de 1/8 HP, el cual fue comandado

por un equipo convertidor de frecuencia CFW-08 WEG, que permitió variar entre 30-1850 rpm.

Para el diseño del cuerpo del reactor se tuvieron en cuenta las relaciones altura/diámetro, utilizadas por empresas líderes en fabricación de equipos piloto para la producción de vinagre por fermentación en cultivo sumergido, valor próximo a 3. El reactor se construyó íntegramente en acero inoxidable, permitiendo su esterilización en autoclave. En la figura 35 se presenta un esquema del cuerpo del reactor con el eje y la turbina.

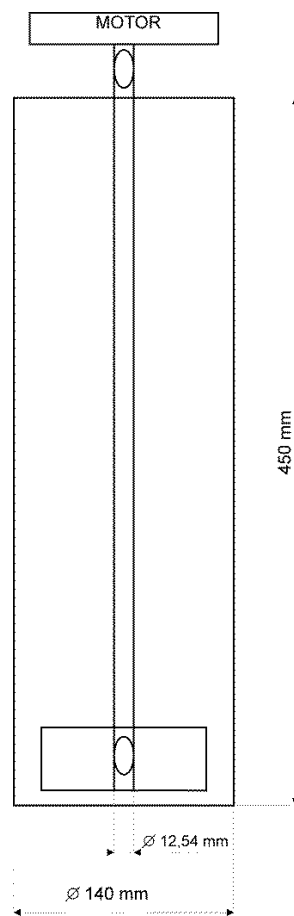


Figura 35: Esquema y detalles del cuerpo del reactor piloto, del eje y de la turbina.

Otra variable muy importante en la fermentación acética, es la temperatura, la cual no debe superar ciertos valores porque corre riesgo la viabilidad del cultivo. Al ser exotérmica la reacción de oxidación del etanol a ácido acético, es necesario mantener esta variable controlada. Se diseñó un sistema de control automático de la temperatura, compuesto por un serpentín interno de acero inoxidable, por donde circula agua de

refrigeración, una resistencia envainada, también interna, como alternativa para suministrar calor al medio de cultivo y un sensor de temperatura Pt100, sumergido en el seno del medio a fermentar, envainado en acero inoxidable. Este sistema estuvo controlado por un regulador electrónico de temperatura marca DHACEL, que permitió una regulación en el rango 15-80 °C, con una precisión de ± 0.1 °C. En la figura 36 se presenta una imagen donde se muestra la ubicación de la resistencia, el serpentín y el sensor de temperatura.

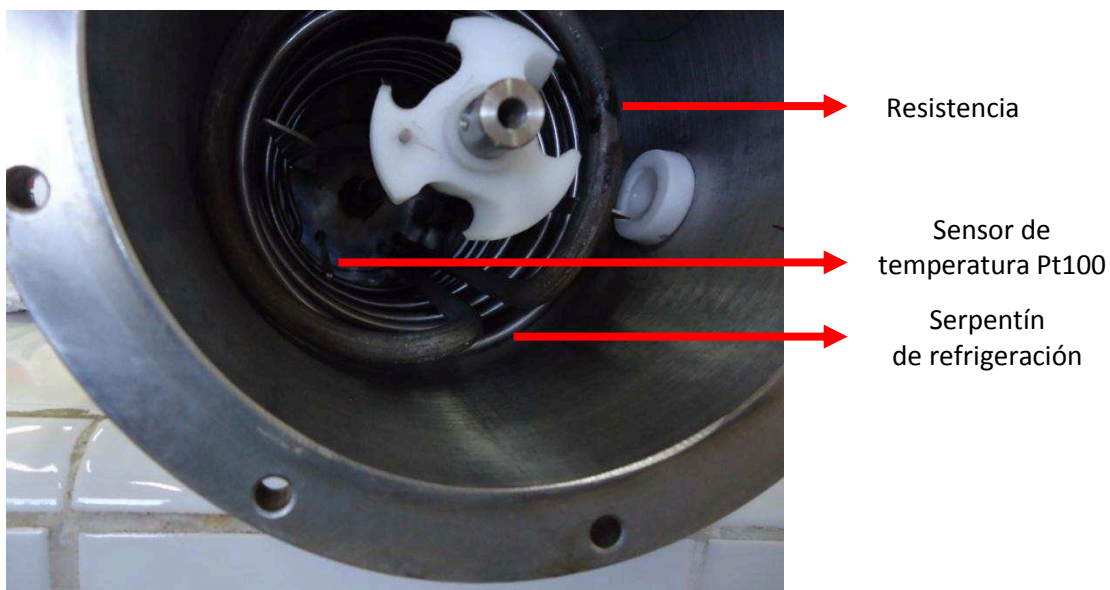


Figura 36: Sistema de control de temperatura: resistencia, serpentín de refrigeración y sensor de temperatura.

El reactor contó además con un tubo de vidrio para medir el nivel de líquido, una entrada y una salida, para la carga, y la toma de muestra, y una salida auxiliar para el vaciado del equipo. En la figura 37 se muestra el equipo completo, instalado en el Laboratorio de Química y Ambiente de la Facultad de ingeniería y Ciencias Hídricas.



Figura 37: Reactor piloto instalado en el laboratorio de Química y Ambiente de la FICH.

Caracterización

Se determinó el régimen de mezcla del reactor a través de un ensayo con trazadores, utilizando permanganato de potasio como trazador. Si en un reactor continuo perfectamente agitado, se le inyecta un trazador en forma de función escalón, podemos obtener la función de respuesta del reactor, $F(t)$, determinando la concentración de trazador $C(t)$ a la salida del mismo (Clark, 2009).

El balance para el trazador en el reactor, asumiendo que éste no es consumido en el interior, puede expresarse como,

$$V \frac{dC(t)}{dt} = F(C_0 - C(t)) \quad (12)$$

de donde podemos obtener,

$$F(t) = \frac{C(t)}{C_0} = 1 - e^{-Dt} \quad (13)$$

Para determinar el régimen de mezcla en el reactor piloto, se comenzó con una concentración inicial de trazador en el reactor C_0 , y se alimentó el mismo con una corriente libre de trazador, de caudal constante, realizando la operación inversa. Denominamos $W(t)$ a la función de respuesta obtenida, para lo que $W(t) = 1 - F(t)$ y el balance queda,

$$W(t) = 1 - F(t) = 1 - (1 - e^{-Dt}) = e^{-Dt} \quad (14)$$

De esta manera, comparando los valores experimentales con los valores teóricos obtenidos a partir del volumen de reactor y caudal utilizado en la experiencia, se puede verificar el nivel de mezclado del reactor.

Se determinó el coeficiente de transferencia de oxígeno, K_La característico del reactor, mediante un método dinámico (Pinelli et al., 2010). Se evaluó la incidencia de distintas temperaturas en el rango comprendido entre 27-33°C y distintas velocidades de agitación comprendidas entre 800 y 1400 rpm a través de un diseño experimental factorial, donde la temperatura y la velocidad de agitación fueron los factores, y se ensayaron 3 niveles para cada uno. La tabla indicando las experiencias realizadas se presenta en la sección resultados.

Evaluación económica

Durante el transcurso de la presente tesis ya través de un convenio establecido con CICSA, se recopilaron diferentes presupuestos para los principales equipos de una planta de producción de vinagre, obteniendo los costos de fermentadores de distintos tamaños, con sus sistemas de control, y equipos de filtración tangencial, para la filtración del vinagre producido, por 2 de las principales empresas del rubro. Estos costos de inversión de capital se tuvieron en cuenta en el análisis económico. Los costos operativos involucrados en el proceso de fermentación acética (consumo de energía y servicios auxiliares), se estimaron a partir de la potencia consumida por el/los fermentadores y

sus accesorios y el sistema de filtrado, contemplando los equipos con capacidad para procesar la totalidad de la fracción líquida del excedente de levaduras y de la cerveza de descarte. Al igual que para los procesos de recuperación de etanol, se contempló el costo de inversión y el consumo de energía de una centrífuga (decanter) para separar los sólidos del excedente de levaduras, determinado por la potencia nominal para su caudal. Además se contempló un equipo de filtración de la mezcla de efluentes centrifugada, previo al ingreso a la fermentación acética, de igual costo que el equipo de filtración de producto, con una potencia de 3 kW. La potencia instalada para la planta de fermentación (fermentador mas equipo de filtración de producto) es de 18 kW. Realizando una estimación moderada, el costo de electricidad sería de 75000 \$/año. El consumo eléctrico para la centrífuga, al igual que en los casos anteriores sería de 50000 \$/año. El consumo eléctrico en el equipo de filtración de efluentes es \$15000/año.

Como todo el efluente pasa a formar parte del producto, se consideró una pérdida del 2% en la etapa de filtración, siendo la única corriente a tratar, con una DQO similar a la del la mezcla de las fracciones líquidas de los efluentes, representando 24 Ton de DQO/año. Se consideró una remoción del 100% de la carga orgánica mediante un proceso anaeróbico de tratamiento. No se consideró costo de inversión de capital, ya que se asume que esta el efluente del proceso sería tratado en las instalaciones convencionales que ya dispone la empresa adoptada como caso de estudio.

No se consideró la inversión de capital necesaria para proveer los servicios (Gas, vapor, electricidad, agua, etc.), asumiendo que los mismos son provistos por los sistemas existentes en la empresa adoptada como caso de estudio.

Se utilizaron los costos necesarios provistos en la tabla 7. Finalmente se establecieron los indicadores económicos del proceso propuesto.

Resultados

Conservación y recuperación de bacterias acéticas

Dado que el proceso de fermentación acética se lleva a cabo por lotes, utilizando parte del lote anterior como inóculo del siguiente, se estudió la factibilidad de conservar las cepas en diferentes condiciones, que permitan su adecuada recuperación posterior para ser utilizadas ante situaciones de parada en la empresa (o en los ensayos de laboratorio). Se evaluó su conservación en 3 medio de cultivo REA, AE y MR y a 4 temperaturas diferentes: 25°C (ambiente), 4°C (heladera), -20 °C y -80°C. Las muestras así conservadas se retiraron a la semana y al mes de conservación. En la tabla 40 se presentan los resultados.

Tabla 40: Resultados estudios de conservación y recuperación cepas de bacterias acéticas.

Semana			
Temperaturas	Medios		
	RAE	AE	MR
25	+	+	+
4	+	+	+
-20	+	+	+
-80	+	+	+
Mes			
25	+	+	-
4	+	+	+
-20	-	-	-
-80	+	+	+

Cuando los cultivos se almacenaron por una semana en las distintas condiciones, fue posible recuperar el crecimiento en todas las muestras. En cambio, cuando las muestras se almacenaron durante 1 mes, sólo las correspondientes al medio RAE y AE fueron capaces de crecer nuevamente, no así la muestra conservada en medio MR. A 4°C, todas las muestras pudieron ser recuperadas, al igual que a -80°C. Contrariamente a lo que se esperaba, las muestras conservadas a -20°C, no pudieron ser recuperadas

luego de 1 mes de conservación. Esto se corresponde con lo expuesto por algunos autores acerca de la pérdida de viabilidad de bacterias conservadas en estas condiciones (Romero et al., 1994; Garrido-Vidal et al., 2003; Jiménez-Hornero et al., 2009).

Basado en estos resultados, el almacenamiento de los cultivos a 4°C y -80°C, permite asegurar al menos 1 mes de sobrevivencia de los mismos. Por otro lado, de ser necesaria una parada de planta o de ensayos de laboratorio, es posible conservar el cultivo a temperatura ambiente hasta 1 semana sin inconvenientes en su recuperación.

El aumento en la densidad óptica de las muestras recuperadas en medio RAE y AE fue similar entre sí, pero muy superior a las recuperadas en medio MR. Para los cultivos conservados a 4°C, la máxima velocidad de crecimiento se observó sobre el medio RAE. En cambio para cultivos recuperados en -80°C, ésta se obtuvo en medio AE.

Dado que se obtuvieron comportamientos similares en los medios REA y AE, con la considerable diferencia en su composición, para las experiencias donde se utilizó medio de cultivo como control, se optó por el medio más simple de éstos: medio AE.

Efecto de conservantes presentes en los efluentes

Dióxido de azufre

Algunas de las cervezas, generalmente las que no están comprendidas dentro de la categoría "Premium", suelen tener sustancias conservantes y/o antioxidantes dentro de las que se encuentra el dióxido de azufre. Si bien hay estudios que ponen de manifiesto que las bacterias acéticas son muy sensibles a este compuesto (Du Toit et al., 2005; Bartowsky y Henschke, 2008), estos ensayos fueron realizados evaluando su efecto como conservante, inhibiendo el crecimiento de ciertas bacterias acéticas en condiciones adversas para su normal desarrollo, sobre todo por la baja concentración de oxígeno encontrada en los sustratos analizados.

El Código Alimentario Argentino permite hasta 20 ppm de SO₂ libre en cerveza, lo que motivó el estudio del efecto de este conservante, pero en cultivos productivos, con una concentración inicial de bacterias acéticas de 1x10⁷-1x10⁸ UFC/mL.

Capítulo 5 – Producción de vinagre de cerveza

Se estudió el efecto del SO_2 utilizando el medio AE como medio control sobre la performance de la fermentación acética y la viabilidad de las bacterias utilizando la cepa comercial C. Para poder contar con la presencia de SO_2 en los cultivos, compuesto que es inestable, se adicionó metabisulfito de sodio, el cual in situ produce SO_2 . Se estableció una correlación entre la dosis de metabisulfito de sodio agregado al medio AE y la concentración de SO_2 libre obtenida luego de dejar reaccionar la muestra y el conservante por 15 minutos. En la figura 38 se presenta la curva obtenida.

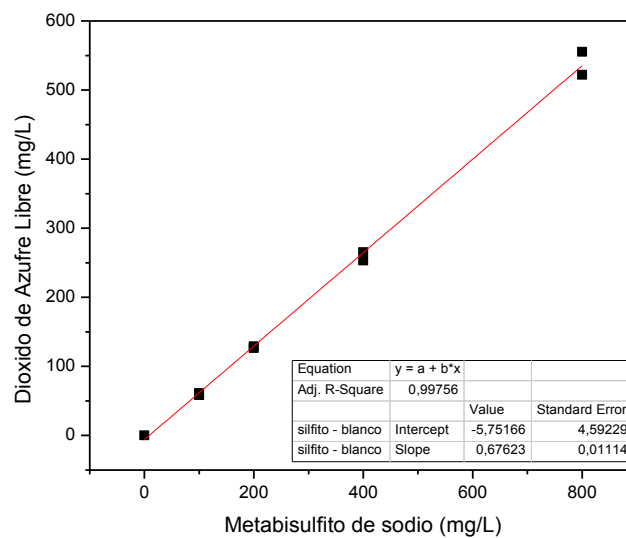


Figura 38: Curva de calibrado del agregado de metabisulfito de sodio en medio AE

Como se mencionó en la sección materiales y métodos, se estudió el efecto de utilizar una cámara húmeda para realizar los recuentos de células viables. A partir de un mismo cultivo de sembraron placas por duplicado y para dos diluciones, para cada una de las condiciones (con y sin cámara húmeda). En la tabla 41, se presentan los resultados para el cultivo en ambas condiciones.

Tabla 41: Impacto de la incubación sobre el recuento de células viables.

Condición	Factor dilución	Recuentos			UFC/mL
Convencional	1,00E+05	391	364	302	3,52E+07

Capítulo 5 – Producción de vinagre de cerveza

	1,00E+06	21	27	56	3,47E+07
Cámara	1,00E+05	397	385	374	3,85E+07
húmeda	1,00E+06	31	24	36	3,03E+07

Estos resultados ponen de manifiesto que al menos para la cepa estudiada (cepa comercial C), la incubación de las placas dentro de la cámara húmeda no produce ninguna mejora en el recuento.

Para estudiar el efecto del conservante sobre la bacterias acéticas, inicialmente se realizaron cuatro ensayos donde se evaluó la ausencia de conservante, y tres concentraciones crecientes, 25, 50 y 75 mg/L. Para cada una de las cuatro experiencias, realizadas en erlenmeyer, se colocó inicialmente un cultivo en crecimiento en medio AE como inóculo, el que representó 2/3 del volumen final, al que se le agregó un volumen de medio AE 0a2e, correspondiente a 1/3 del volumen final, con la concentración de metabisulfito necesaria para obtener inicialmente en todo el volumen la dosis a evaluar. Se tomaron muestras cada 2 horas, a las cuales se les determinó ácido acético, etanol, y dióxido de azufre. En la figura 39 y 40 se muestra la evolución del ácido acético y del dióxido de azufre en función del tiempo, para las experiencias realizadas.

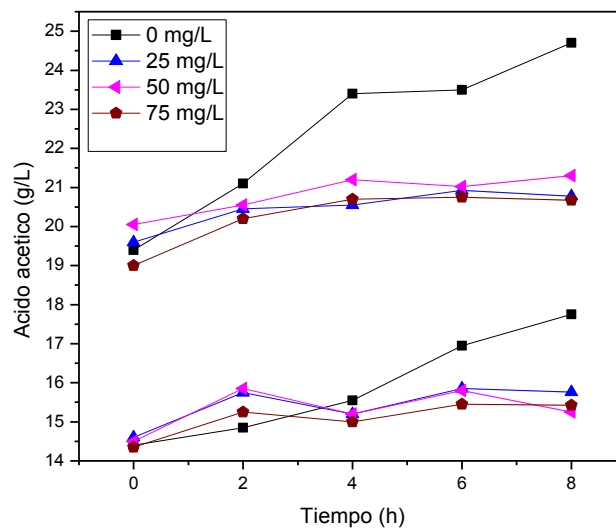


Figura 39: Evolución del ácido acético en función del tiempo.

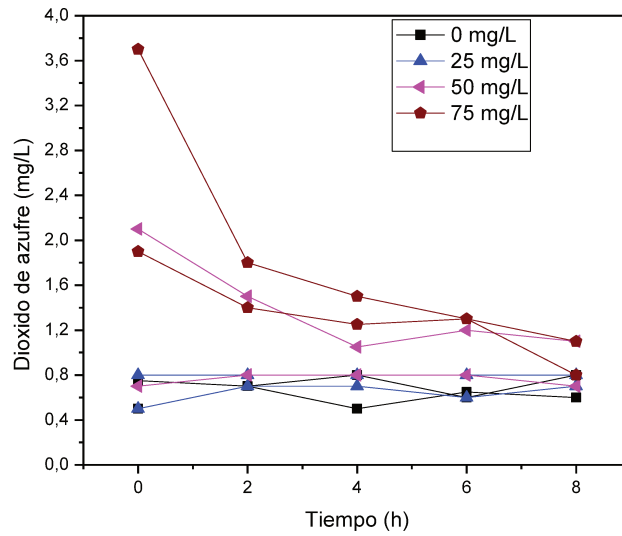


Figura 40: Evolución del dióxido de azufre en función del tiempo.

Como se observa en la figura 39, los resultados son similares en los duplicados, mostrando que para concentraciones iguales o superiores a 25 mg/L de dióxido de azufre libre, se observa una inhibición total de la producción de ácido acético. Las curvas de concentración para los valores de 50 y 75 mg/L, que muestran un comportamiento similar pero con valores remanentes de SO₂ libre superiores, corresponden a la experiencia que comenzó con menos ácido acético en el medio. El dióxido de azufre participa del equilibrio dado por.



De esta forma, la concentración de SO₂ molecular, la cual posee la mayor capacidad antimicrobiana por ser una molécula neutra capaz de atravesar la membrana de las bacterias, es menor a mayores pH (o menores concentraciones de ácido acético), demorando más tiempo en interaccionar completamente.

La figura 40 muestra que el dióxido de azufre es rápidamente removido del medio, solo detectándose valores inferiores a los 5 mg/L, aún en las experiencias cuyo valor inicial fue de 75 mg/L. La muestra inicial se tomó luego del agregado del metabisulfito al

medio ya conteniendo el inóculo, lo que demuestra la rapidez con la que interacciona el dióxido de azufre formado.

En función de estos resultados, y dada la rapidez con que se observa la desaparición del SO_2 del medio, se estudió el efecto de este conservante en un rango inferior de concentraciones, comprendido entre 0 y 24 ppm. Concretamente, se evaluó el efecto de 0, 8, 16 y 24 mg/L de dióxido de azufre libre sobre la performance de la fermentación acética y la viabilidad de las bacterias. Se utilizó la "cepa comercial C" como modelo. Las experiencias se realizaron de la misma manera, colocando inicialmente el inóculo y finalmente el medio conteniendo metabisulfito de sodio para obtener la concentración inicial de dióxido de azufre a ensayar en cada medio. Se tomó muestra a los 5 minutos; 7,5 minutos; 10 minutos; 15 minutos; y luego cada 7,5 minutos hasta los 60 minutos. Como en 1 h no se pueden apreciar cambios significativos en los valores de ácido acético, biomasa y etanol, éstos parámetros no se determinaron, y la experiencia se centró en el recuento de células viables en función del tiempo. En la figura 41 se presenta el efecto sobre del SO_2 , sobre la viabilidad de las bacterias acéticas.

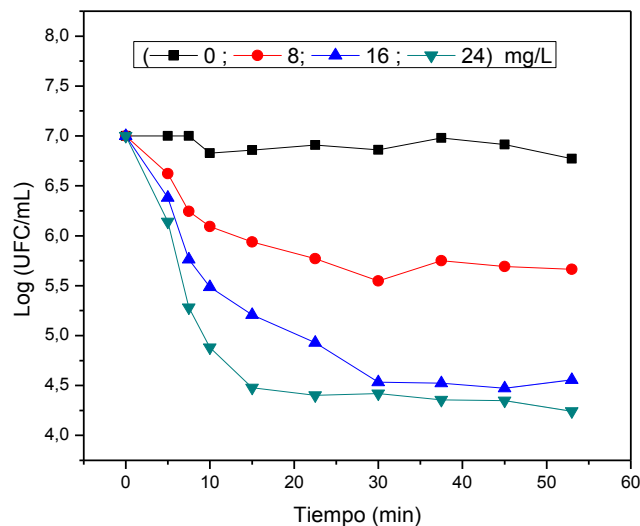


Figura 41: efecto del SO_2 sobre la viabilidad de las bacterias acéticas.

Capítulo 5 – Producción de vinagre de cerveza

Se observa que la acción bactericida del SO₂ es inmediata, alcanzando su máximo a los 30 minutos de contacto, habiendo reducido 1.5, 2.5 y 2.5 órdenes de magnitud para las concentraciones de 8, 16 y 24 mg/L de SO₂ respectivamente.

Una medida de la "velocidad de muerte" tradicionalmente usada en esterilización es el número de reducción decimal "D", que establece el tiempo necesario para reducir en un 90% la población bacteriana por efecto de un tratamiento dado, equivalente a reducir un orden de magnitud el log de UFC/mL. Este número puede estimarse también para agentes antimicrobianos (Mazzola et al., 2003; Amer et al., 2013; Yang et al., 2014), y su valor se estima como la inversa de la pendiente obtenida al graficar el Log (UFC/mL) en función del tiempo. Se realizó la regresión para la zona lineal de muerte (0-10 minutos) y se calcularon las inversas de las pendientes. En la tabla 42 se presentan los valores D para las diferentes concentraciones estudiadas.

Tabla 42: Tiempos de reducción decimal para la bacteria acética C, a distintas concentraciones de SO₂.

Concentración SO ₂ (mg/L)	Pendiente	D (min)
8	0.0942	10.61
16	0.15643	6.39
24	0.21886	4.57

Estos resultados ponen de manifiesto que aún para las menores concentraciones estudiadas, el SO₂ se comporta como un agente bactericida.

Dentro de las cervezas comercializadas por la empresa adoptada como caso de estudio una contiene SO₂ como antioxidante y antimicrobiano. Se determinó la concentración de SO₂ en esta cerveza obteniendo como resultado 27.8 ± 1.9 mg SO₂ libre/L, y 28.8 ± 1.0 mg SO₂ total/L. Este valor se encuentra en el rango de valores estudiados, siendo suficiente para eliminar más de 99% de las bacterias acéticas, inhibiendo la fermentación acética.

Sorbato de potasio y Benzoato de sodio

Al igual que con el dióxido de azufre, algunos autores han estudiado el efecto del sorbato de potasio y benzoato de sodio, conservantes usualmente utilizados en alimentos, sobre la viabilidad de bacterias acéticas, enfocándose en su efecto antimicrobiano para el control de contaminaciones puntuales, donde la concentración inicial es menor a 1×10^4 UFC/mL (Eyles y Warth, 1989).

En este trabajo se estudió el efecto de estos conservantes sobre la performance de la fermentación acética y la viabilidad de las bacterias acéticas comerciales C, en cultivos productivos, donde la concentración inicial está en el orden de 1×10^7 - 1×10^8 .

Para los ensayos, se colocaron 4 mL de un cultivo de la bacteria comercial C en crecimiento sobre medio AE en tubos de vidrio con tapón de algodón para permitir el intercambio gaseoso, previamente esterilizados. Se centrifugaron los tubos, se descartó el sobrenadante y el pellet de células se resuspendió en 6 mL de medio AE 2a2e estéril suplementado con diferentes concentraciones de benzoato de sodio y sorbato de potasio, para obtener concentraciones finales de 0, 100, 200, 300, 400, 500, 650, 800, 1000 y 1200 mg/L en cada caso. Los tubos se incubaron en agitación orbital a 120 rpm y 30°C durante 5 días. Se realizó un recuento de células viables cada 24 h para cada muestra.

En la figura 42 se muestra los resultados para el número de células viables, expresado como el Log (UFC/mL), en función del tiempo, en las experiencias donde se utilizó sorbato de potasio como agente antimicrobiano.

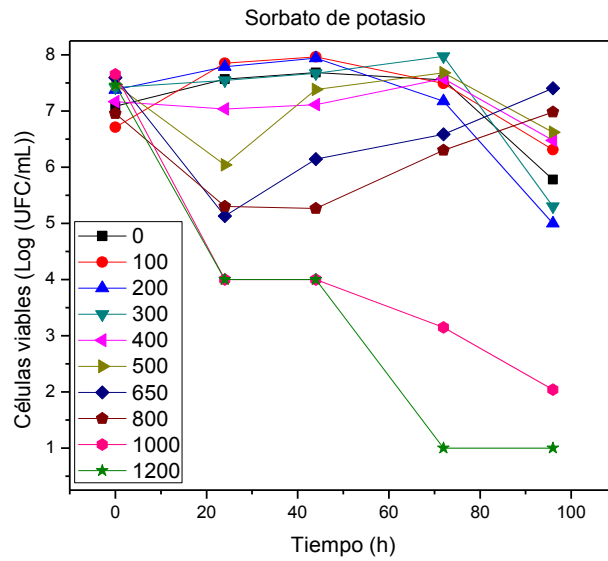


Figura 42: efecto del sorbato de potasio sobre la viabilidad de las bacterias acéticas.

En las condiciones de cultivo ensayadas, se observa que el sorbato de potasio ejerce un efecto bacteriostático para valores comprendidos entre 0-400 mg/L, levemente bactericida para valores entre 400 y 800 mg/L, permitiendo la recuperación del cultivo luego de 24 h. Sólo a concentraciones por encima de 800 mg/L, se observa un efecto bactericida irreversible, que no permite la recuperación del cultivo. Estos valores concuerdan con lo reportado por (Eyles y Warth, 1989), pero aún para concentraciones mayores, del orden de 1×10^7 UFC/mL. El decaimiento en la viabilidad observado hacia el final de la experiencia para los ensayos con concentraciones inferiores a 500 mg/L, puede atribuirse al agotamiento de los nutrientes (etanol) del medio.

Se determinó el tiempo de reducción decimal para las experiencias con concentraciones de 1000 y 1200 mg/L, siendo 1052 min y 722 min respectivamente. Estos valores, 100 veces superiores a los valores obtenidos para el dióxido de azufre, muestran que concentraciones de sorbato de potasio de 1000 mg/L, tardan 100 veces más en eliminar el 90% de las bacterias presentes en el cultivo que 8 mg/L de SO_2 .

En la figura 43 se muestra el resultado del efecto del benzoato de sodio sobre el número de células viables.

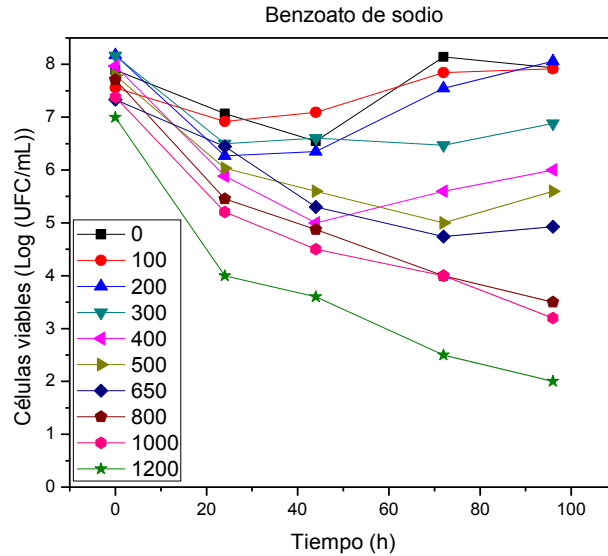


Figura 43: efecto del benzoato de sodio sobre la viabilidad de las bacterias acéticas.

En las condiciones de cultivo ensayadas, el benzoato de sodio fue ligeramente más efectivo en reducir la viabilidad de las bacterias acéticas. Se observa que ejerce un efecto bacteriostático leve para valores comprendidos entre 0-200 mg/L, ya que si bien hay una reducción inicial, los cultivos rápidamente se recuperan aumentando el número de organismos viables en el tiempo. La reducción en el número de células viables observado en el medio control (sin conservante), puede indicar que una pequeña reducción pudo estar provocada por efectos ajenos al conservante.

Para valores del conservante comprendidos entre 300 y 650 mg/L, se observa una marcada reducción en la viabilidad de las bacterias, que comienza a recuperarse entre las 48-72 h. Finalmente, a concentraciones por encima de 650 mg/L, (800, 1000 y 1200 mg/L) se observa un efecto bactericida irreversible, que no permite la recuperación del cultivo. Estos valores concuerdan con lo reportado por (Eyles y Warth, 1989), pero aún para concentraciones mayores, del orden de 1×10^7 UFC/mL.

Se determinó el tiempo de reducción decimal para las experiencias con concentraciones de 800, 1000 y 1200 mg/L, siendo 917 min, 905 min y 762 min respectivamente. Estos valores, al igual que para el sorbato de potasio, son 100 veces superiores a los valores obtenidos para el dióxido de azufre, mostrando que

concentraciones de benzoato de sodio de 800 y 1000 mg/L, tardan 100 veces más en eliminar el 90% de las bacterias presentes en el cultivo que 8 mg/L de SO_2 .

Para corroborar el efecto ejercido por los conservantes en condiciones de mayor aireación, que mejoren la transferencia de oxígeno, mejorando la capacidad de las bacterias de crecer y multiplicarse, se realizaron experiencias de fermentación acética sobre medio AE, para concentraciones de sorbato de potasio de 650 mg/L y 1000 mg/L y sobre un medio AE sin adición de sorbato de potasio. En las figuras 44 y 45 se muestra la evolución en el tiempo de la concentración de ácido acético y de biomasa, respectivamente, para la experiencia control, y la experiencia con concentraciones de sorbato de 1000 mg/L.

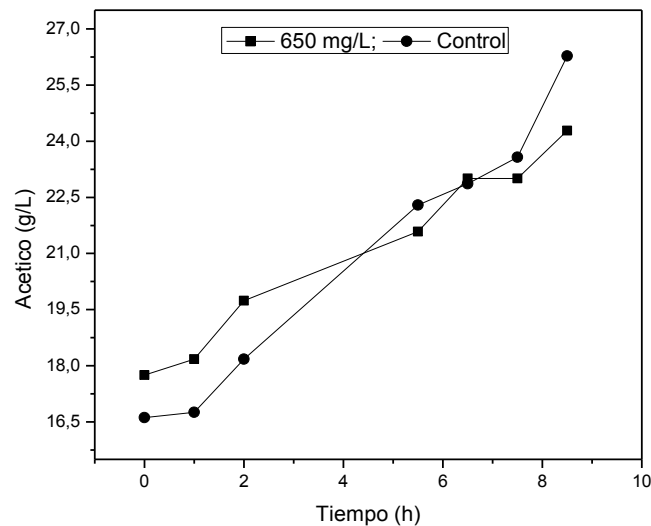


Figura 44: efecto del sorbato de potasio sobre la producción de ácido acético.

Capítulo 5 – Producción de vinagre de cerveza

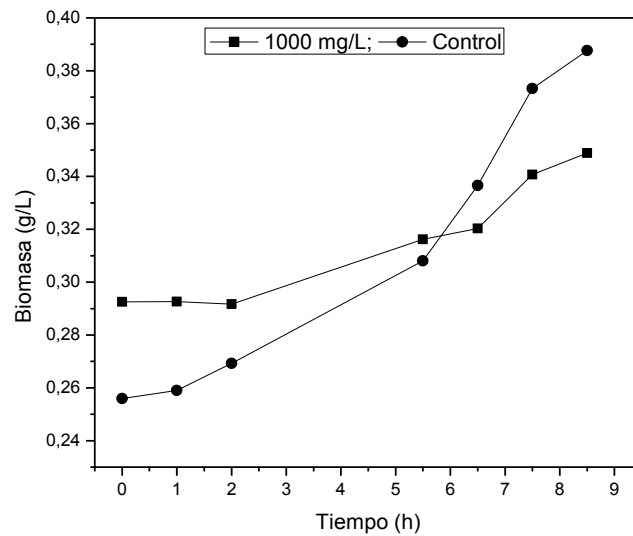


Figura 45: efecto del sorbato de potasio sobre el crecimiento de la biomasa.

De las gráficas se observa que el sorbato de potasio a una concentración de 1000 mg/L, ejerció un efecto inhibitorio en el crecimiento y multiplicación de las bacterias acéticas, que afectó la velocidad de producción de ácido acético. A diferencia de lo observado en las experiencias en tubo de vidrio, donde 1000 mg/L produjo una inhibición irreversible en el número de células viables, en ésta experiencia el número de células viables disminuyó levemente, manteniéndose en el mismo orden de magnitud, y aumentando nuevamente después de las 2 h de experiencia. Estos resultados se correlacionan con una mayor fase de latencia para la biomasa observada en el cultivo con sorbato de potasio, la cual se determinó a través de la absorbancia, la cual comienza a aumentar luego de las 2 horas. En el medio control se observó un crecimiento sostenido desde el inicio de la experiencia, tanto en biomasa como en número de células viables. Estos resultados ponen de manifiesto que aún para valores de 1000 mg/L de sorbato de potasio, en condiciones productivas de cultivo las bacterias acéticas solo "tardan" pocas horas en recuperar su viabilidad, observándose pocos efectos en la producción de ácido acético.

La experiencia realizada para una concentración de 650 mg/L, no mostró diferencias respecto del control, sin sorbato, poniendo de manifiesto la capacidad de las bacterias acéticas de crecer, aún en presencia del conservante.

El Código Alimentario Argentino, permite dosis máximas para el sorbato de potasio de 300 mg/L para bebidas gasificadas listas para consumir, 800 mg/L para bebidas no gasificadas listas para consumir, 1000 mg/kg para jugos de fruta o jugos para diluir y 1200 mg/kg para jugos concentrados de fruta. Según los resultados obtenidos, estas dosis serían efectivas en el control de bacterias del ácido acético, aún cuando su concentración inicial fuera de 1×10^7 UFC/mL, siempre que las condiciones de conservación eviten el contacto con el oxígeno. En condiciones de intensa aireación y mezclado, incluso dosis de 1000 mg/L de sorbato de potasio serían insuficientes para evitar la fermentación acética. Estos resultados difieren de lo estudiado por (Eyles y Warth, 1989), quienes reportaron que una dosis de 1000 mg/L de sorbato inhibe completamente el crecimiento.

Producción de (vinagre de cerveza) a partir de efluentes de cervecería

Producción de ácido acético sobre cerveza y vinaza

Inicialmente se estudio la factibilidad de producir ácido acético sobre cerveza, y sobre vinaza, utilizando el etanol recuperado como se describió en el capítulo 3, para suplementar inicialmente la vinaza hasta una concentración igual a la de la cerveza, con el objeto de estudiar el efecto de la destilación y la factibilidad de utilizar ambos medios en la producción de etanol. Los ensayos de fermentación acética se realizaron en erlenmeyer de 1L, los cuales se inocularon con la cepa AA para obtener 1×10^8 UFC/mL. No se agregó ningún nutriente en los medios. Para los ensayos se utilizó un tipo de cerveza que no contiene SO₂. Se determinó la concentración de etanol y ácido acético en el tiempo. La concentración de etanol se mantuvo por encima de 0.7 %v/v, suplementando ambos medios con etanol recuperado.

Capítulo 5 – Producción de vinagre de cerveza

En la figura 46 se presenta la evolución del ácido acético en función del tiempo para ambas experiencias

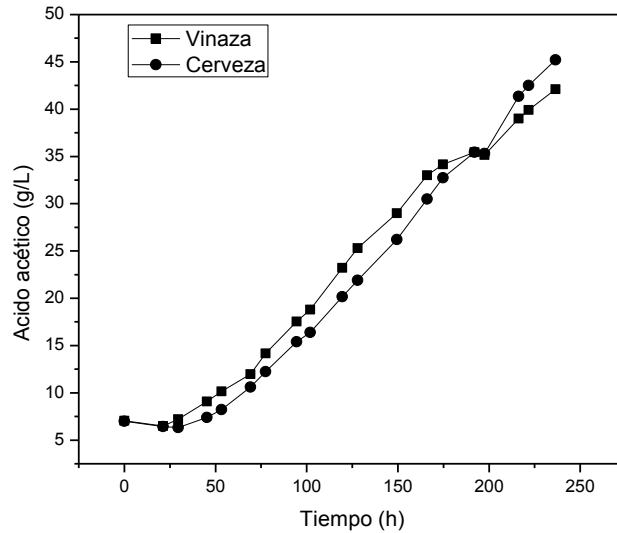


Figura 46: Producción de ácido acético sobre cerveza y vinaza.

Se comprobó que ambos medios se comportaron de manera similar, lo que indica que tanto la cerveza como la vinaza suplementada con etanol pueden ser utilizados para la producción de vinagre de cerveza.

Se estudió el impacto de suplementar la cerveza con nutrientes comerciales en cuya composición se declara glucosa, extracto de levadura, fosfato de amonio, fosfato de magnesio, sulfato de magnesio y otros minerales traza no especificados. Se realizaron experiencias en erlenmeyer sobre cerveza, utilizando la cepa F. Uno de los medios se suplementó con 2 g/L de nutrientes comerciales y el otro no se suplementó. Se realizó el seguimiento de la concentración de ácido acético y etanol en el tiempo, y la concentración de éste último se mantuvo por encima de 0.7 %v/v.

En la figura 47 se muestra la evolución del ácido acético para ambas experiencias.

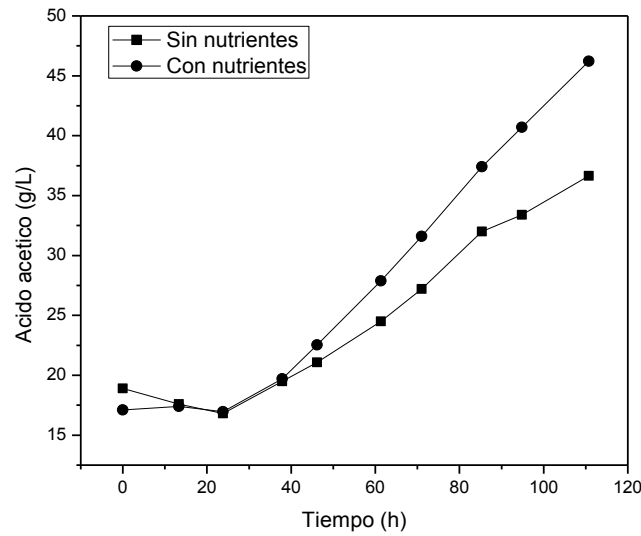


Figura 47: efecto del agregado de nutrientes comerciales sobre la producción de ácido acético.

Se observa que el agregado de nutrientes no tuvo un impacto en la duración de la fase de aclimatación, pero sí en la velocidad de producción de ácido acético.

Impacto de las condiciones de cultivo sobre la fermentación acética y comparación de la performance de las distintas cepas estudiadas

Se evaluó la performance de las cepas de bacterias acéticas aisladas previamente por el grupo de trabajo y las cepas adquiridas comercialmente. Se realizaron ensayos de fermentación acética en erlenmeyer de 1L, conteniendo la misma clase de cerveza, los cuales se inocularon para obtener 1×10^8 UFC/mL. Se utilizó cerveza libre de SO_2 .

Ambas cepas comerciales, F y C mostraron velocidades de producción de ácido acético muy superiores a las cepas aisladas previamente por el grupo de trabajo. En la figura 47 se muestra la evolución de ácido acético en función del tiempo para las cepas estudiadas.

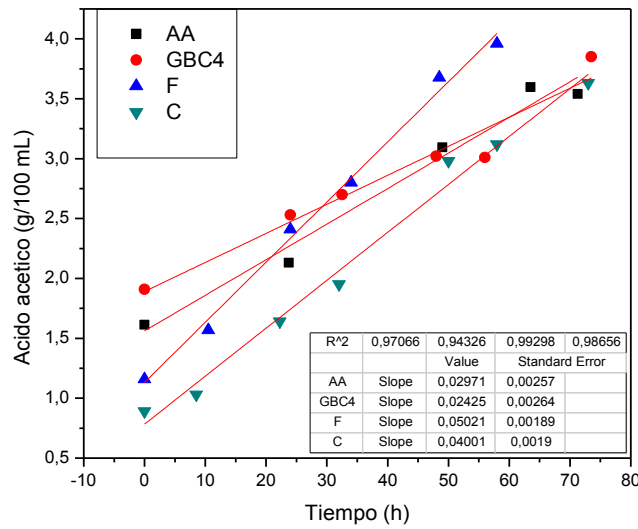


Figura 48: Velocidad de producción de ácido acético sobre cerveza para las 4 cepas estudiadas.

Como se mencionó en la introducción, el proceso de fermentación acética es una oxidación biológica, y al ser el oxígeno uno de los reactivos, la velocidad de producción de ácido acético se ve fuertemente influenciada por el valor de esta variable (González-Sáiz, et al., 2009; Jiménez-Hornero et al., 2009 I, II y III).

Se estudió la influencia de la agitación y aireación sobre la producción de vinagre de cerveza, realizando experiencias de fermentación en reactores tanque agitados (ver figura 32) comparadas con experiencias realizadas en erlenmeyer de 1L. En la figura 49 se muestran tres experiencias sucesivas realizadas en el reactor tanque agitado, utilizando cerveza suplementada con nutrientes comerciales en una concentración de 2 g/L y etanol adicional en una concentración de 4 g/L, utilizando la cepa AA. Se utilizó un protocolo de fermentación, donde una vez alcanzada una concentración de ácido acético superior a 40 g/L, se retiró 1/3 del volumen de medio fermentado y se agregó el mismo volumen de cerveza suplementada. En la figura 50 se muestra la comparación del desempeño para los sistemas mencionados, erlenmeyer y reactor.

Capítulo 5 – Producción de vinagre de cerveza

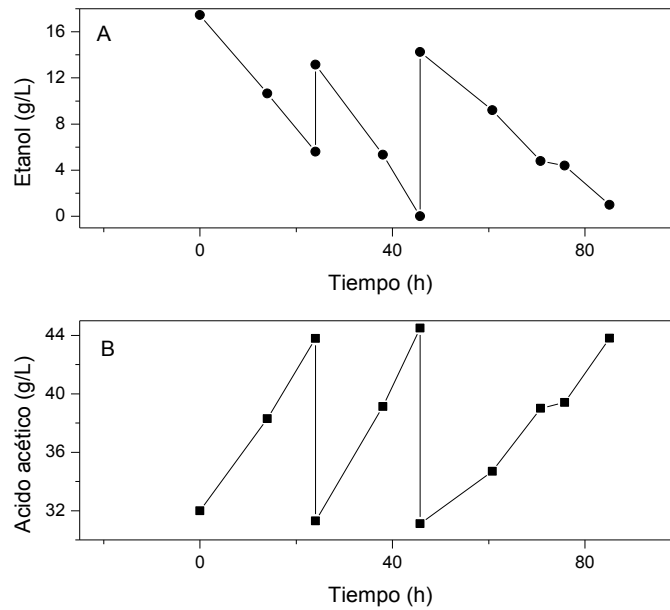


Figura 49: Performance de la cepa AA en el reactor tanque agitado.

En la figura 49 A y B se observa nuevamente la factibilidad de producir vinagre de cerveza utilizando la cepa AA aislada previamente por el grupo de trabajo. La reducción en la producción de ácido acético y en el consumo de etanol de la tercera experiencia, pone en evidencia que para valores de etanol inferiores a 4-5 g/L, se reduce la velocidad de fermentación posterior. Estos resultados concuerdan con lo reportado por varios autores, que indican que valores inferiores a 4 g/L en la concentración de etanol hacia el final de la fermentación, reducen considerablemente la viabilidad de las bacterias, debido a la falta de fuente de energía para afrontar el estrés generado por la concentración de ácido acético en el medio (Romero et al., 1994; González-Sáiz, et al., 2009; Jiménez-Hornero et al., 2009 I, II y III).

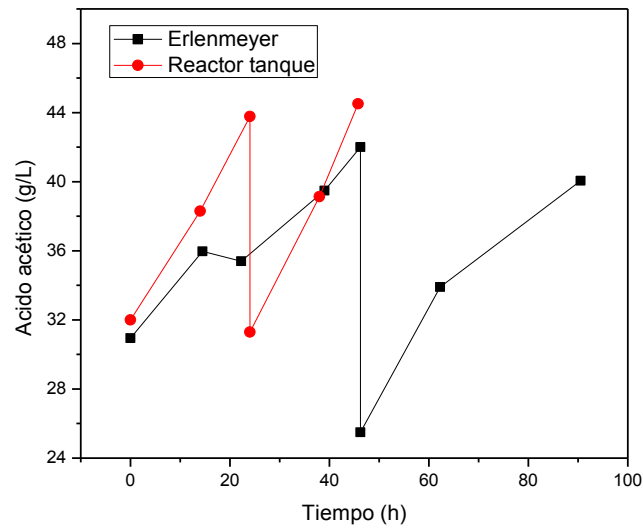


Figura 50: Velocidad de producción de ácido acético para erlenmeyer y reactores tanque agitados.

En la figura 50 se puede observar el efecto de los diferentes sistemas de aireación en la velocidad de producción de ácido acético por la cepa AA.

Se determinó el rendimiento de la fermentación acética como:

$$Y_{ac} \left[\frac{\text{g Ácido acético producidos}}{\text{g etanol consumidos}} \right] = \frac{\xi_{ac}}{\xi_{et}} \quad (16)$$

a partir de las experiencias de la figura 49, resultando $0.975 \pm 0.036 \text{ g}_{ac}/\text{g}_{et}$, valor que representa el 75 % del rendimiento teórico para este tipo de fermentaciones, que corresponde a que todo el etanol pase a ácido acético y cuyo valor es $1.304 \text{ g}_{ac}/\text{g}_{et}$.

Para comparar el desempeño de la cepa industrial C, en el reactor tanque respecto de la cepa AA, se realizaron sucesivas experiencias utilizando cerveza, suplementada con nutrientes a una concentración de 2 g/L y etanol en una concentración de 4 g/L. Se utilizó cerveza que no contiene SO_2 . En la figura 51 se presenta una gráfica comparativa de la evolución del ácido acético para ambas cepas, AA y C.

Capítulo 5 – Producción de vinagre de cerveza

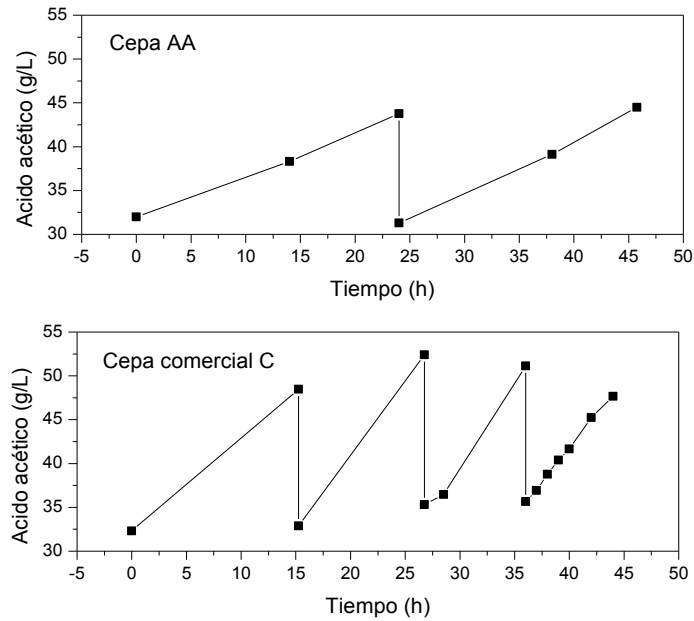


Figura 51: Velocidad de producción de ácido en tanque agitado para las cepas AA y C.

De la figura podemos observar la notoria diferencia en cuanto a la velocidad de producción de ácido acético, la cual es muy superior para la cepa comercial respecto de la cepa aislada previamente por el grupo de trabajo. Se determinó la velocidad de producción de ácido acético para ambas cepas, siendo $0.601 \text{ g}_{ac}/\text{L h}$ para la cepa AA y $1.599 \text{ g}_{ac}/\text{L h}$ para la cepa comercial C. Por otro lado, al igual que para la cepa AA, se determinó el rendimiento de la fermentación para la cepa comercial C, a partir de la producción de ácido acético y el consumo de etanol presentados en la figura 52. El rendimiento en este caso fue de $1.162 \text{ g}_{ac}/\text{g}_{et}$, lo que corresponde a un 89% del valor teórico.

Estos resultados permiten concluir que es factible producir vinagre de cerveza, utilizando la cepa previamente aislada por el grupo de trabajo, AA, y también utilizando la cepa comercial C. El rendimiento de la fermentación acética fue un 20% superior para la cepa industrial, con una productividad más de dos veces superior a la cepa AA. En base a estos resultados, para los ensayos de factibilidad de producción de ácido acético sobre los demás efluentes de la industria cervecera, se utilizaron las cepas comerciales, principalmente la cepa C, que fue más tolerante a condiciones extremas como cortes de

luz (falta de oxígeno) bajas concentraciones de etanol final en el medio, recuperando su viabilidad más rápidamente que la cepa comercial F.

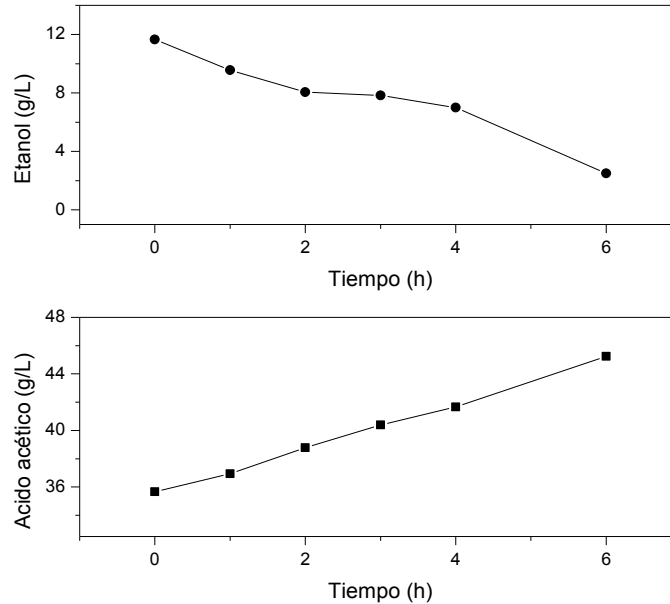


Figura 52: Performance de la cepa comercial C en el reactor tanque agitado.

Mezcla de cervezas de descarte

En el marco de esta tesis se propone el tratamiento de la fracción líquida del excedente de levaduras, y de la cerveza de descarte, utilizándolos como medio para desarrollar una fermentación acética y convertir los efluentes en vinagre de cerveza.

Se preparó una mezcla de cervezas de descarte, en proporción a las cervezas rechazadas, valores que fueron proporcionados por la empresa adoptada como caso de estudio. Esta mezcla se denominó MIX, y se estudió la factibilidad de utilizar este medio (MIX) como materia prima en la fermentación acética. Se siguió el mismo protocolo de reposición de medio, retirando 1/3 del volumen de vinagre de cerveza, y agregando el mismo volumen (1/3) de MIX de cervezas suplementadas con nutrientes a una concentración de 2 g/L. La concentración de etanol se mantuvo por encima de 0.7 v/v, suplementando etanol recuperado, cuando fue necesario. En la figura 53 se presenta la evolución del ácido acético en función del tiempo para sucesivas experiencias realizadas con el MIX de cervezas utilizando la cepa comercial F.

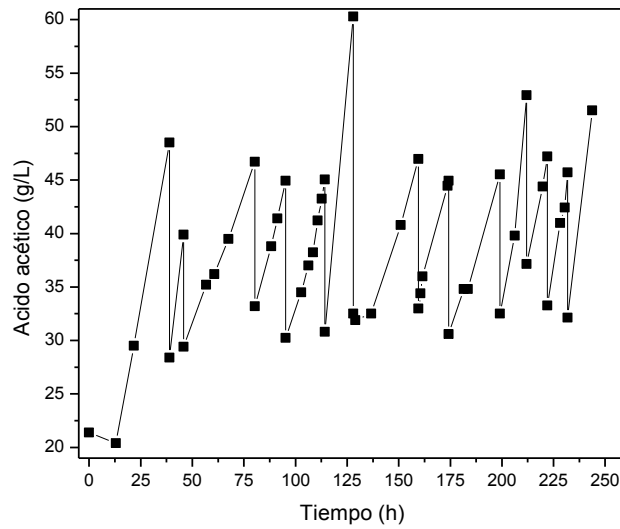


Figura 53: Performance de la cepa comercial F sobre el MIX de cervezas.

La cerveza que contiene SO₂ representa el 30% del volumen de cerveza de descarte. Teniendo en cuenta que en la experiencia inicial se utilizó como inóculo un cultivo proveniente de los ensayos realizados sobre cerveza sin SO₂, la concentración de SO₂ máxima obtenida en el fermentador, una vez realizado la reposición de medio, fue de:

$$27.8 \frac{\text{mgSO}_2}{\text{L}} \times \frac{30}{100} \times \frac{1}{3} = 2.78 \frac{\text{mgSO}_2}{\text{L}} \quad (17)$$

Este valor no mostró ningún efecto sobre la velocidad de producción de ácido acético, la cual estuvo comprendida entre 1.2-1.6 g_{ac}/L h, valores similares a los obtenidos sobre cerveza libre de dióxido de azufre, y comparables con las velocidades obtenidas a nivel industrial (Romero et al., 1994; González-Sáiz, et al., 2009; Jiménez-Hornero et al., 2009 I, II y III).

Mezcla de la fracción líquida del excedente de levaduras y la cerveza de descarte

La fracción líquida del excedente de levaduras perteneciente a las distintas cervezas, posee una concentración de etanol de aproximadamente 6.9%v/v, valor 40 % superior al de la mezcla de cervezas de descarte. La mezcla de ambos efluentes, en la

misma proporción utilizada en los ensayos de recuperación de etanol, 25% cerveza de descarte y 75% excedente de levaduras, posee una concentración de etanol aproximada de 6.3-6.4 %v/v. Este valor permite obtener una mayor concentración de ácido acético en el proceso de fermentación acética, sin necesidad de suplementar el medio con etanol.

En primer lugar se preparó una mezcla de cervezas de descarte en las proporciones que son vertidas en la industria adoptada como caso de estudio, con la fracción líquida del excedente de levadura de una de las clases de cerveza producida, denominándola mezcla de efluentes 1. Las fracciones líquidas del excedente de levaduras se centrifugaron durante 15' a 3500 rpm para remover los sólidos y se filtraron utilizando un equipo de filtración al vacío con un filtro de 0,45 μm . Se siguió el mismo protocolo de reposición de medio, retirando 1/3 del volumen de vinagre de cerveza, y agregando el mismo volumen (1/3) de mezcla de efluente 1 suplementado con nutrientes a una concentración de 2 g/L. Luego de 4 reposiciones de este medio, se continuó la reposición con la mezcla de efluentes 2, la cual se preparó de igual modo que la mezcla de efluentes 1 pero utilizando la fracción líquida del excedente de levaduras de la cerveza tipo 2. En la figura 54 se presenta la evolución del ácido acético para todas las reposiciones realizadas con mezcla de efluentes 1 y 2. Las experiencias utilizando mezcla de efluentes 1, corresponden a las primeras cuatro reposiciones de medio. Las experiencias correspondientes a la mezcla de efluentes 2, inician donde lo indica la flecha, al tiempo correspondiente a 600 h. Se determinó la velocidad de producción de ácido acético para ambas mezclas de efluentes, las que fueron similares y estuvieron comprendidas en el rango 1-1.1 $\text{g}_{\text{ac}}/\text{L h}$.

Capítulo 5 – Producción de vinagre de cerveza

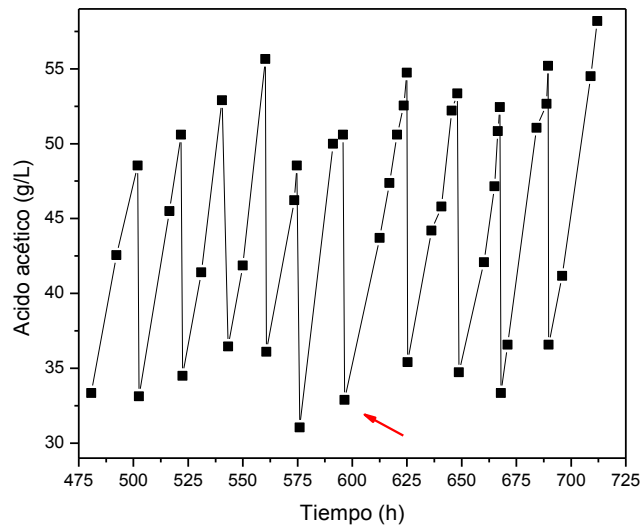


Figura 54: Performance de la cepa comercial F sobre el MIX de cervezas.

Estos resultados demuestran que es factible utilizar el descarte de cerveza y la fracción líquida del excedente de levaduras, solos o combinados, para producir vinagre de cerveza por fermentación en cultivo sumergido. En la tabla 43 se presenta un resumen de los resultados obtenidos sobre cerveza, MIX de cervezas y mezcla de efluentes utilizando cepas comerciales.

Tabla 43: Rendimientos y productividad para las fermentaciones acéticas realizadas a partir de efluentes de la industria cervecera.

Parámetros	Rendimiento	Productividad
	g_{ac}/g_{et}	$g_{ac}/L\ h$
Cerveza	1.16	1.599
MIX descarte de cerveza	1.00	1.200-1.600
Mezcla de efluentes	1.20	1.100

Los valores de rendimiento obtenido son superiores al 75% del rendimiento teórico en todos los casos. Esto garantiza que un efluente que tenga una concentración de etanol mínima de 45 g/L (5.7%v/v), es suficiente para obtener una concentración de ácido acético superior al 4% m/m, valor exigido por el Código Alimentario Argentino. Para el vinagre de cerveza.

Obtención y caracterización del producto

Se determinó el residuo seco, las cenizas y se verificó la precipitación con alcohol 1+2, para verificar las exigencias del Código Alimentario Argentino, sobre 2 muestras de vinagre de cerveza obtenida utilizando MIX de cerveza de descarte. Los valores se presentan en la tabla 44.

Tabla 44: Análisis parámetros exigidos por el Código Alimentario Argentino para vinagre de cerveza.

Muestras	Residuo Seco (%m/v)	Cenizas (%m/v)	Precipitación Alcohol 1+2	Densidad (g/mL)
Exigencia CAA	1-2.5	< 0.25	Si	1.017-1.040
1	4.134	0.279	Si	1,0137
2	4.164	0,248	Si	1,0124

El valor para el residuo seco se encuentra por encima de lo establecido por el Código en un 65%. Si se tiene en cuenta el contenido de carbohidratos remanentes de la fermentación, presentes en la cerveza de descarte, es de esperar residuos secos superiores al 3%, y valores aún superiores cuando se utiliza la fracción líquida del excedente de levaduras, lo que compromete el cumplimiento de éste parámetro. En cuanto a las cenizas, también se observa un valor un 12% superior a lo exigido por el CAA, lo que limita el agregado de aditivos permitidos (ver Anexo III para las exigencias del CAA para el vinagre) con el objetivo de alcanzar la densidad necesaria para ingresar al rango establecido por el CAA.

Una alternativa para poder cumplir con las exigencias del CAA, sería prolongar la fermentación acética hasta alcanzar concentraciones de ácido acético superiores al 4% m/v, para posteriormente rehidratar el producto, reduciendo sus valores de residuo seco y cenizas, pudiendo cumplir los requisitos para estos parámetros, y obtener un margen para el agregado de aditivos permitidos que garanticen la densidad mínima exigida.

El análisis de precipitación con alcohol 1+2, dio positivo para las muestras estudiadas.

Reactor piloto

Caracterización

Se montó el equipo y se realizaron diferentes ensayos de producción de ácido acético, verificando que los sistemas de control de temperatura y de agitación funcionaron correctamente.

Se verificó el régimen de mezclado como se describió en materiales y métodos. Se utilizó un volumen de reactor de 3.7 L (volumen necesario dado las características de construcción para la carga y la descarga), y un caudal de 360 mL/min, obteniendo un valor para la tasa de dilución $D = 0.0973 \text{ min}^{-1}$. Se realizaron dos experiencias determinando la concentración del trazador a la salida del reactor cada 1 min, durante un lapso de 15 minutos. En la figura 55 se presentan las curvas para la función $W(t)$ teórica y experimental en función del tiempo. Los resultados demuestran que el patrón de mezclado es muy similar al de mezcla completa, pudiendo adoptarse esta asunción para las futuras determinaciones.

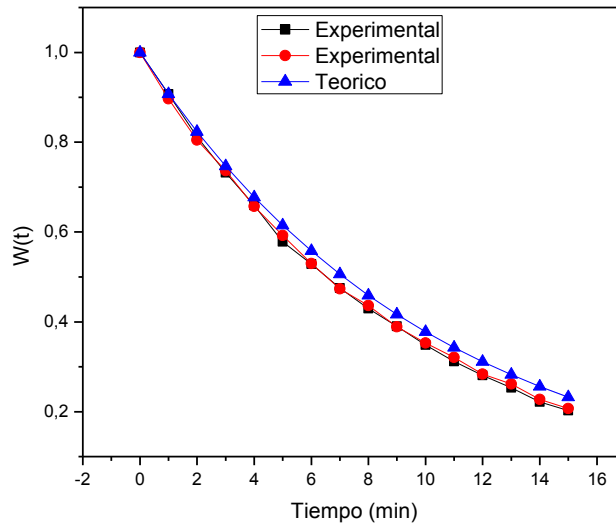


Figura 55: Curvas teórica y experimental para la concentración de trazador a la salida del reactor en función del tiempo.

Capítulo 5 – Producción de vinagre de cerveza

Se determinó el coeficiente de transferencia de oxígeno K_{La} , mediante un diseño experimental con 2 factores en tres niveles. La tabla con los valores que adopto cada variable, junto a los valores correspondientes de K_{La} obtenidos en cada caso se presentan en la tabla 45. En la tabla 46 se presenta el análisis de la varianza (ANOVA) para la variable de respuesta. En la figura 56 se presentan el diagrama de Pareto para el efecto sobre la respuesta en función de las variables estudiadas.

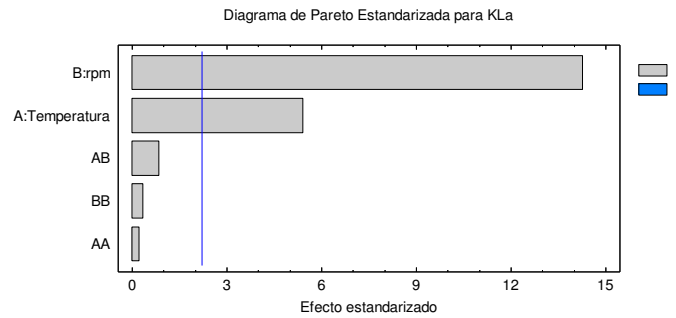


Figura 56: Efectos principales de las variables estudiadas y sus interacciones.

Tabla 45: Diseño experimental y variable de respuesta para K_{La} del reactor piloto.

Temperatura (°C)	Agitación (rpm)	K_{La} (h ⁻¹)
27	800	88,6
30	1100	114,8
30	800	98,9
27	1400	133,2
33	1100	120
30	1400	133,6
33	1400	143,4
27	1100	116,4
33	800	102,7
27	800	99,8
30	1100	120,6
30	800	100,9
27	1400	123,7
33	1100	127,7
30	1400	139,9

Capítulo 5 – Producción de vinagre de cerveza

33	1400	149,3
27	1100	108,1
33	800	110,6

Tabla 46: Análisis de la varianza K_La del reactor piloto.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Temperatura	586,601	1	586,601	29,19	0,0002
B:rpm	4092,21	1	4092,21	203,62	0,0000
AA	1,03361	1	1,03361	0,05	0,8248
AB	14,8513	1	14,8513	0,74	0,4083
BB	2,45444	1	2,45444	0,12	0,7333
bloques	46,7222	1	46,7222	2,32	0,1555
Error total	221,069	11	20,0972		
Total (corr.)	4964,94	17			

$R^2 = 95,54\%$; R^2 (ajustada) = $93,69\%$; Error estándar del est. = $4,48$

Se observa que ambas variables ejercen un efecto positivo (diagrama de Pareto) y significativo a un 95 % de confianza (ANOVA) sobre la variable de respuesta, K_La . El diseño permitió establecer un modelo estadístico para predecir la respuesta en función de las variables experimentales. Se presenta a continuación:

$$K_La \left[h^{-1} \right] = 91,289 - 2,723 \times T - 0,00301 \times rpm + 0,0565 \times T^2 + 0,00151 \times T \times rpm + 0,00000870 \times rpm^2 \quad (18)$$

Producción de ácido acético en medio AE 5e

Se realizaron sucesivas experiencias de producción de ácido acético utilizando la cepa comercial C sobre AE 5e, a modo de tener un parámetro control de la fermentación. Se utilizó un volumen de 4L en el reactor, a una velocidad de agitación de 600-1500 rpm. Se determinó la concentración de ácido acético, etanol y biomasa en función del tiempo mediante las técnicas descritas en materiales y métodos. Se determinó la concentración de oxígeno disuelto al inicio y final de la experiencia. En la figura 57 se muestran las experiencias realizadas:

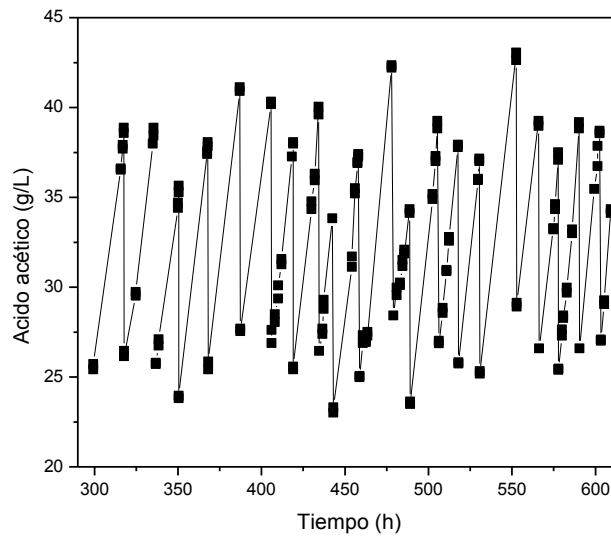


Figura 57: Experiencias de producción de ácido acético sobre medio AE 5e en el reactor piloto.

Modelado cinético

Se analizaron los resultados para la formación de biomasa y producción de ácido acético. La biomasa mostró un crecimiento constante en el tiempo, por lo que se propuso un modelo de orden 1 para el crecimiento de la biomasa. Por otra parte, la producción de ácido acético estuvo directamente asociada al crecimiento de la biomasa, por lo que para representar la formación de producto se propuso un modelo que vincule ésta a la producción de biomasa mediante un coeficiente de rendimiento.

Para el planteo del modelo se consideraron las siguientes asunciones:

a) la mezcla en el reactor es suficiente para garantizar que la composición fue la misma en todos los puntos.

b) la viabilidad celular fue superior al 99 %, no considerándose términos de muerte celular en el modelo. Cabe destacar que ésta asunción es una de las más comprometidas, dado el efecto del oxígeno disuelto, del ácido acético y del etanol final sobre la viabilidad de las bacterias. En este sentido, a través de las mediciones de oxígeno disuelto realizadas en el reactor, se corroboró que su concentración en el medio estuvo siempre por encima de 1.5 mgO₂/L. En las experiencias utilizadas para el cálculo

de los parámetros del modelo, la concentración de etanol fue superior al 0.5 %m/v. Estos valores, de oxígeno disuelto y concentración de etanol, sumado a que los valores de ácido acético estuvieron por debajo del 5 %m/v, permiten asumir una viabilidad superior al 95%, como fue reportado previamente en la literatura (González-Sáiz, et al., 2009; Jiménez-Hornero et al., 2009 I, II y III).

c) la agitación es adecuada, garantizando que la transferencia de masa no es limitante del proceso de fermentación acética.

Las ecuaciones que describen la multiplicación de la biomasa y la producción de ácido acético son las siguientes:

$$\frac{dx}{dt} = \mu_{ac} X \quad (19)$$

$$\frac{dP}{dt} = Y_{P/x} \mu_{ac} X \quad (20)$$

donde μ_{ac} es la velocidad específica de crecimiento de la biomasa de bacterias acéticas en h^{-1} ; x , y P representan las concentraciones de biomasa y ácido acético respectivamente, expresadas en g/L. $Y_{P/x}$ es el coeficiente de rendimiento ácido acético, ($g_{\text{ácido acético}}/g_{\text{biomasa}}$).

Para determinar los valores de los parámetros cinéticos que mejor permiten predecir los valores experimentales, se minimizó la desviación cuadrática media relativa, entre los valores experimentales y los valores predichos por el modelo (Weisberg, 2005).

En la figura 58 se presentan los valores experimentales y los valores predichos por el modelo para tres experiencias sucesivas.

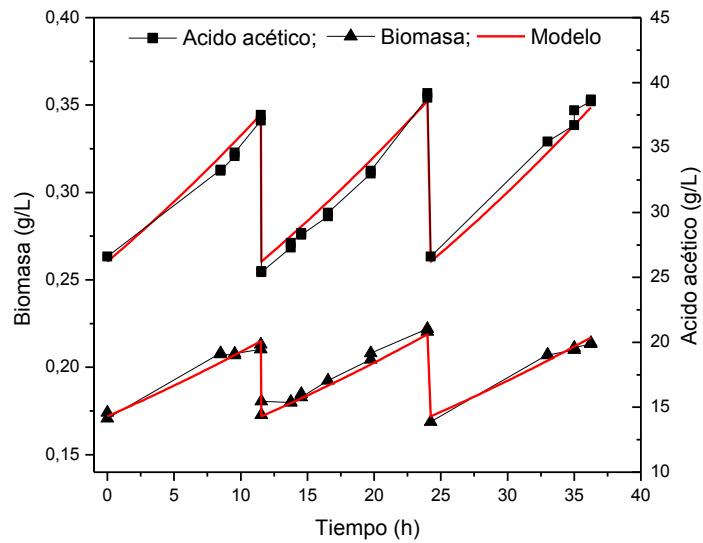


Figura 58: Valores experimentales y valores predichos por el modelo para la producción de ácido acético y el crecimiento de la biomasa.

Si bien se observan algunas desviaciones entre el modelo y los valores experimentales, sobre todo en tiempos medios de las experiencias, éste permite un adecuado ajuste de los datos experimentales. El valor de las constantes fue: $\mu_{ac} = 0.0194 \text{ h}^{-1}$ y $Y_{ac/x} = 26.37 \text{ g}_{\text{ácido acético}}/\text{g}_{\text{biomasa}}$.

Producción de vinagre de cerveza

Se realizaron sucesivas experiencias de producción de vinagre de cerveza en el reactor piloto sobre cerveza libre de SO_2 , suplementada con 2 g/L nutrientes comerciales, utilizando la cepa comercial C. Se determinó la concentración de ácido acético y etanol en función del tiempo. En la figura 59 se presentan los resultados obtenidos para el ácido acético en función del tiempo.

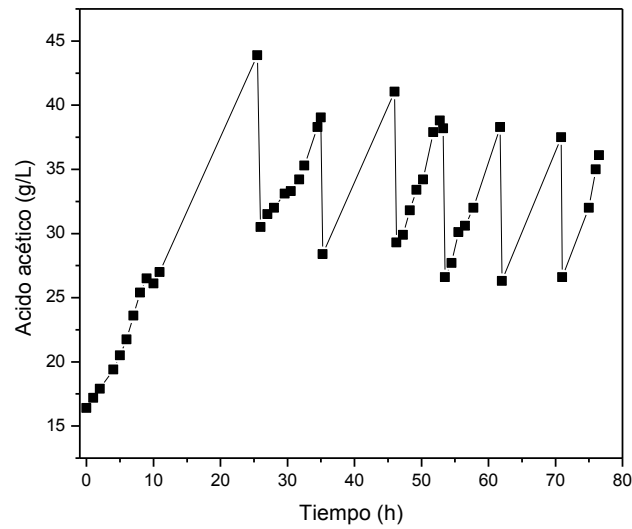


Figura 59: Experiencias de producción de vinagre de cerveza en el reactor piloto

En la tabla 47 se presenta el promedio de los valores para el rendimiento, productividad y duración de los ciclos de fermentación para las experiencias realizadas sobre medio AE 5e y sobre cerveza.

Tabla 47: Comparación de la producción de ácido acético sobre medio AE 5e y sobre Cerveza.

Parámetros	Medio de cultivo AE	Cerveza
Rendimiento (g_{ac}/g_{et})	1.16-1.24	1.00-1.10
% respecto del teórico	89-95%	77-84%
Productividad ($g_{ac}/L\ h$)	0.905 ± 0.103	1.443 ± 0.168
Duración ciclo de fermentación (h)	14.55 ± 2	9.35 ± 1.88

De los resultados presentados en la tabla se puede observar que la fermentación acética sucede más rápidamente sobre cerveza respecto del medio AE 5e, sin embargo, el productividad es inferior, manteniéndose rendimientos cercanos al 80% del valor teórico. Estos resultados confirman la factibilidad de producir vinagre de cerveza a partir de efluentes de cervecería.

Evaluación económica

Se propuso un proceso de tratamiento de la cerveza de descarte y de la fracción líquida del excedente de levaduras, mediante la producción de ácido acético por fermentación en cultivo sumergido. El esquema 7 se presenta en la figura 60. Se realizó un análisis económico considerando el costo operativo del proceso y el crédito obtenido por la producción de vinagre de cerveza. El precio de venta de vinagre se estimó en un 60% del valor de venta de vinagre de manzana a granel en Argentina, representando un valor de 4.25 \$/L.

El costo de electricidad consumida en las bombas es despreciable frente a los otros costos considerados, no así el costo de separación de los sólidos iniciales y filtración de la mezcla de efluentes, como de la etapa de fermentación, que se mencionan anteriormente en materiales y métodos.

Se tuvo en cuenta además el costo de 4 empleados (1 por turno de 8 horas y un encargado general). Se contempló además un tanque para almacenar la mezcla de efluentes filtrados, como así también un tanque de almacenamiento de producto, ambos con capacidad para 2 días de operación, con un volumen de 45 m³.

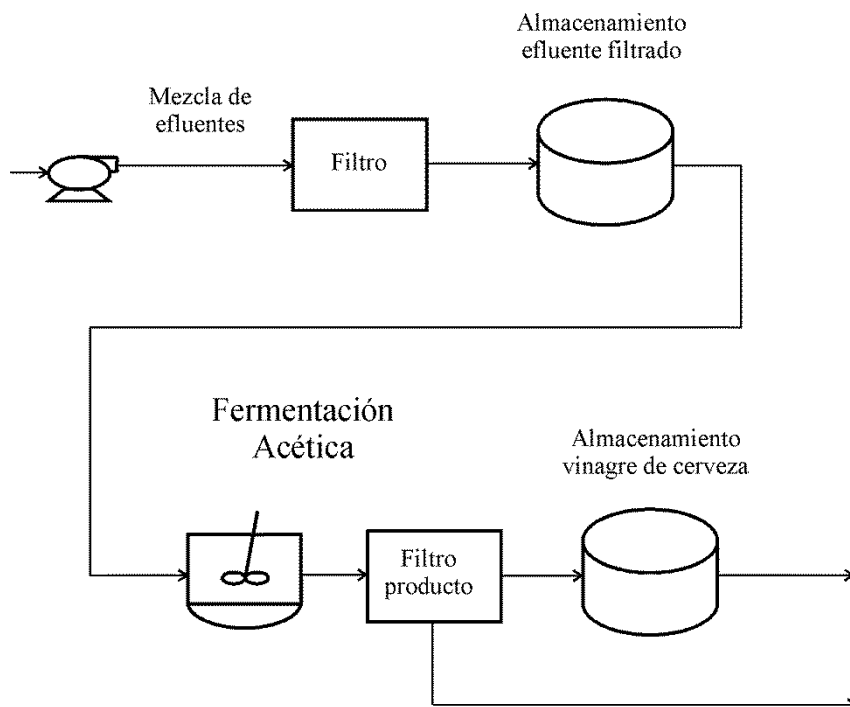


Figura 60: Esquema 7, tratamiento de la mezcla de efluentes mediante ferntacón acética en cultivo sumergido.

Capítulo 5 – Producción de vinagre de cerveza

En la tabla 48 se resumen los costos operativos y de inversión de capital incluyendo una amortización en un período de 15 años para los equipos contemplados en la inversión de capital. Los valores se expresan en pesos argentinos considerando un factor de conversión 1U\$D = 8.55 \$ Argentinos.

Como indicadores económicos se determinó la TIR, VAN y el período de recupero del capital para cada alternativa, analizando un lapso de 15 años con períodos de pago anual.

Tabla 48: resumen de la evaluación económica de las alternativas propuestas para el tratamiento de la vinaza.

	Esquema 7
<i>Costos variables</i>	
	\$/año
Tratamiento de efluentes	14640
Empleados	836100
Electricidad	140000
<i>Otros costos</i>	
Amortización de capital	321687
Total anual	1312427
<i>Crédito</i>	
Vinagre	33660000
Utilidad anual	32347573
<i>Inversión de capital</i>	
	\$
Fermentador y filtro de producto	3575000
Centrífuga Decanter	410000
Filtro de efluentes	600000
Tanques	240300
Total	4825300
<i>Variables económicas</i>	
TIR (anual)	670 %
VAN	121271697 \$
Recupero del capital (meses)	2

Como se observa en la tabla, este proceso de tratamiento y valorización de efluentes de la industria cervecera, es altamente rentable, eliminando prácticamente las necesidades de tratamiento. Si bien la inversión inicial es un monto considerable, el período de recupero del capital es de 2 meses.

Conclusiones parciales

- El estudio del efecto de distintos conservantes presentes en cervezas y en alimentos sobre la fermentación acética, mostró que una concentración mayor o igual a 8 mg/L de SO₂, 800 mg/L de sorbato de potasio y 650 mg/L de benzoato de sodio, tienen un efecto bactericida sobre las bacterias acéticas, comprometiendo la correcta performance de la fermentación.
- Se demostró que los efluentes de la industria cervecera, cerveza de descarte y mezcla de efluentes, son medios adecuados para la fermentación acética, obteniéndose rendimientos y productividades similares a las reportadas por otros autores a nivel industrial.
- Se diseñó y construyó un fermentador piloto, el cual permitió estandarizar los ensayos respecto de las variables oxígeno disuelto y temperatura. Se propuso un modelo cinético para el crecimiento de la biomasa y la producción de ácido acético, que permitió un correcto ajuste de los datos experimentales.
- Se propuso un esquema para el tratamiento de la mezcla de efluentes, utilizándolos como medio en una fermentación acética para obtener vinagre de cerveza. Se realizó un análisis económico del mismo, que puso de manifiesto la elevada rentabilidad del proceso, dado por el elevado valor del VAN, con un período de recupero del capital de 2 meses.

Capítulo 6: Proceso integrado para el tratamiento de efluentes de la industria cervecera.

En los capítulos anteriores se demostró la factibilidad técnica de tratar los efluentes cerveza de descarte y fracción líquida del excedente de levaduras a través de tres procesos:

- 1) Recuperación de etanol por destilación de la mezcla de efluentes. Este proceso permitió reducir la carga orgánica en un 60%, generando un nuevo efluente, la vinaza, que por su elevada carga orgánica puede seguir representando inconvenientes para los sistemas de tratamiento. Este proceso mostró alta rentabilidad con tempos de recupero del capital de 15 meses.
- 2) Hidrólisis y fermentación de la vinaza. Este proceso toma el efluente del proceso anterior y reduce su carga orgánica en un 70%, dejando un efluente con una carga orgánica del 12% del valor inicial de los efluentes, y una DQO 6-7 veces superior a la de las aguas residuales, lo que lo vuelven más manejable dentro de la mismas instalaciones convencionales de tratamiento. Este proceso en sí mismo no es rentable. Por su origen, surge como alternativa de tratamiento a la vinaza generada en el proceso 1. En el presente capítulo se analizará su viabilidad económica acoplada el proceso 1, en comparación con la alternativa de tratamiento anaeróbico convencional utilizado actualmente en la empresa adoptada como caso de estudio.
- 3) Producción de vinagre de cerveza. Este proceso prácticamente elimina la carga orgánica a tratar, ya que todo el efluente pasa a formar parte del producto final. Es el proceso más rentable, con un VAN 1 orden de magnitud superior a los demás proyectos, y un período de recupero del capital de 2 meses.

Capítulo 6 – Proceso integrado para el tratamiento de efluentes de la industria cervecera

Se realizó una evaluación económica del tratamiento convencional de los efluentes, construyendo un sistema anaeróbico similar al que hoy dispone la empresa adoptada como caso de estudio. Se asumieron los costos de construcción y operación presentados en la tabla 7. Al igual que en los procesos anteriores, se contempló una centrífuga para separar los sólidos del excedente de levaduras y un tanque que permita almacenar el efluente previo al tratamiento, con capacidad de 2 días de operación, de 45 m³. Se consideraron 4 empleados, 1 por turnos de 8 horas y un encargado, y se asumió la remoción total de la carga orgánica. Se analizó también el escenario en que la planta posea la capacidad para absorber el tratamiento de dichos efluentes en la misma instalación que dispone. En la tabla 49 se presenta el análisis económico de estas alternativas.

Tabla 49: Evaluación económica del tratamiento convencional en un reactor UASB.

	Con construcción	Sin Construcción
<i>Costos variables</i>	\$/año	\$/año
Tratamiento de efluentes	753180	753180
Empleados	836100	
Electricidad	50000	50000
<i>Otros costos</i>		
Amortización de capital	257433	35133
Total anual	1896713	838313
<i>Crédito</i>		
Gas	107421	107421
Utilidad anual	-1789292	-730892
<i>Inversión de capital</i>	\$	\$
Reactor UASB	3334500	
Centrífuga Decanter	410000	410000
Tanques	117000	117000
Total	3861500	527000

<i>Variables económicas</i>		
TIR (mensual)	-	-
VAN	-	-
Recupero del capital (meses)	-	-

De la tabla se puede observar que esta alternativa representa un gasto superior a 1700000 \$/año. Aún si no se contemplara la inversión de capital del reactor, ni los empleados, asumiendo que la capacidad actual de la planta de tratamiento podría abarcar los efluentes estudiados, esta alternativa representa un costo de anual superior a los 730000 \$.

En los capítulos 3 y 4 se estudiaron los procesos de recuperación de etanol y tratamiento de las vinazas mediante hidrólisis y producción de etanol, respectivamente. Los esquemas estudiados en el capítulo 4, cuando se analizaron separados de los esquemas presentados en el capítulo 3, mostraron no ser rentables en sí mismos, presentando una utilidad negativa del orden de los 500000 \$/año. Por otra parte, los esquemas analizados en el capítulo 4, toman como efluente inicial, el generado en los esquemas del capítulo 3, por lo que se propuso un esquema integrado para estos procesos, más específicamente una integración de los esquemas 3 y 6, con producción de alcohol potable, denominado esquema 8.

Se simuló el sistema para establecer el consumo de energía en la etapa de hidrólisis y destilación y se realizó una evaluación económica del proceso. En la figura 61 se presenta el esquema propuesto.

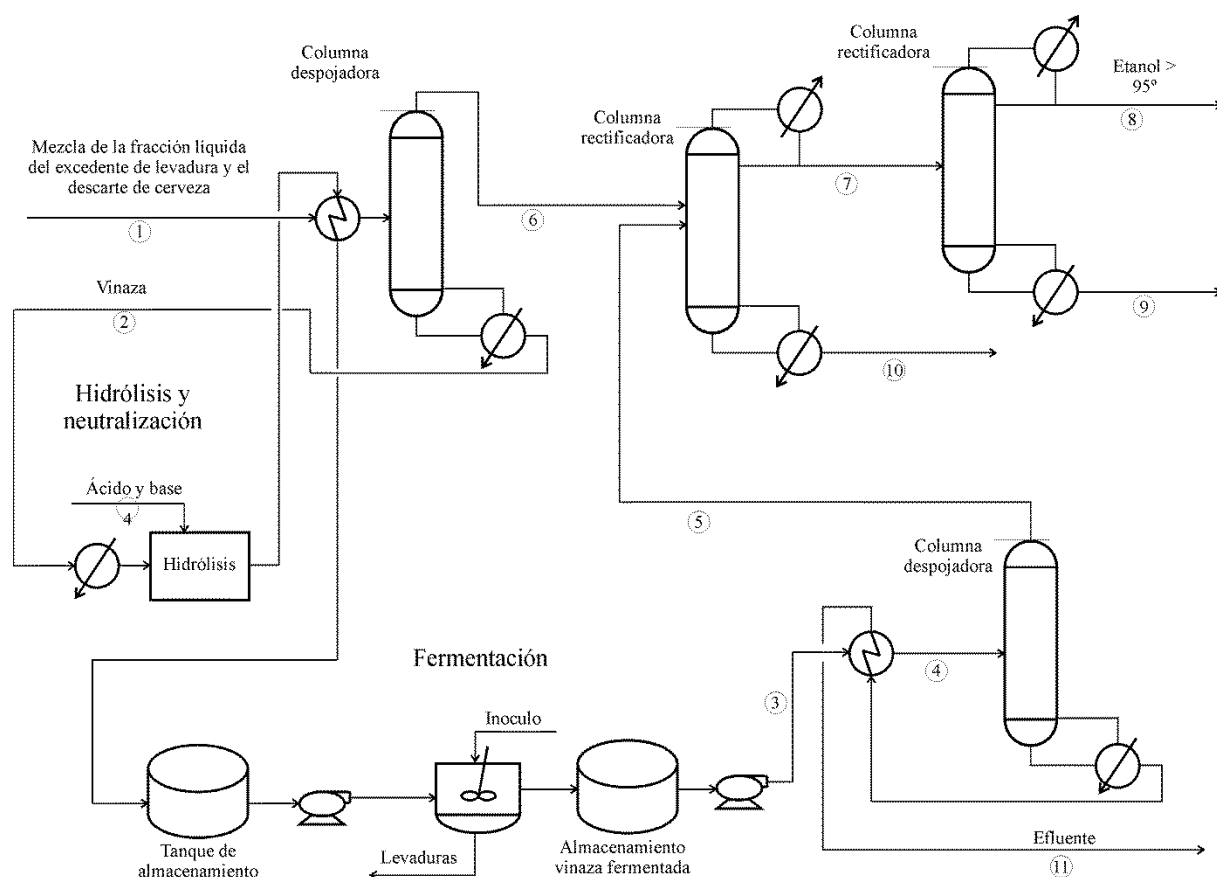


Figura 61: Esquema 8. Proceso integrado para la recuperación y producción de etanol

El esquema simulado permite obtener un producto con una concentración de etanol superior al 94 %m/m, cumpliendo las especificaciones para el alcohol de uso alimentario (ver Anexo I). El consumo de calor obtenido en los re-hervidores de las columnas despojadoras y rectificadoras, fue de 81546, 49337, 11891 y 55807 Kcal/h respectivamente. Para elevar la temperatura de la vinaza hasta el valor de la temperatura de hidrólisis se consumieron 15330 Kcal/h, totalizando un consumo de calor por el esquema de 213900 Kcal/h. Con la configuración simulada se logra obtener una recuperación superior al 99,5% del etanol que ingresa al sistema, con un consumo específico de 3156 Kcal/Kg etanol. Se analizaron 2 escenarios, uno donde un reactor UASB es construido para tratar el efluente generado, y otro donde el efluente es tratado en las instalaciones actuales de la planta.

Tabla 50: Análisis económico del proceso integrado para la recuperación y producción de bioetanol.

	Esquema 8	
	Sin UASB	Con UASB
<i>Costos variables</i>	\$/año	\$/año
Vapor	491285	491285
Acido y base	256000	256000
Tratamiento de efluentes	92110	92110
Empleados	836100	836100
Electricidad	100000	100000
<i>Otros costos</i>		
Amortización de capital	415013	441947
Total anual	2190508	2217442
<i>Crédito</i>		
Etanol	5491290	5491290
Gas	13450	13450
Utilidad anual	3314232	3287298
<i>Inversión de capital</i>	\$	\$
Hidrólisis y Fermentación	2885000	2885000
Reactor UASB		404000
Centrífuga Decanter (2)	810000	810000
Sistema de destilación	2137000	2137000
Tanques	393200	393200
Total sin UASB	6225200	6629200
<i>VARIABLES ECONÓMICAS</i>		
TIR (mensual)	53 %	49 %
VAN	8348352 \$	7898500 \$
Recupero del capital (meses)	23	24

Del análisis de la tabla 50, podemos observar que el proceso integrado para el tratamiento de la mezcla de efluentes, mediante la recuperación y producción de bioetanol es rentable, con un VAN mayor a cero, con un período de recupero del capital

Capítulo 6 – Proceso integrado para el tratamiento de efluentes de la industria cervecera de 25 meses. Este valor es la mitad del límite máximo normalmente establecido por los inversores (48 meses).

En la tabla 51 se presenta una comparación de los principales indicadores económicos para los procesos:

- a) Recuperación de etanol potable, y tratamiento de la vinaza en un UASB nuevo.
- b) Recuperación de etanol, hidrólisis y fermentación de la vinaza para obtener alcohol potable y tratamiento del efluente generado en un UASB nuevo.
- c) Recuperación de etanol, hidrólisis y fermentación de la vinaza para obtener alcohol potable y tratamiento del efluente generado en las instalaciones existentes.
- d) Producción de vinagre de cerveza y tratamiento en las instalaciones existentes.
- e) Construcción de UASB para el tratamiento de los efluentes.

Cabe destacar que no se contempló un proceso donde la vinaza se trate en el UASB existente, por representar una carga orgánica cercana al 40 % del valor inicial, en cambio, el efluente generado luego de hidrolizar y fermentar la vinaza, contiene sólo un 10% del valor inicial, por esto se contemplaron los dos escenarios en este caso.

Tabla 51: Análisis económico del proceso integrado para la recuperación y producción de bioetanol.

VARIABLES ECONÓMICAS	a	b	c	d	e
Costo inversión (\$)	3334780	6629200	6225200	4825300	3861500
Costo operativo (\$/año)	1893608	2217442	2190508	1312427	1896713
Utilidad (\$/año)	2606405	3287298	3314232	32347573	-1789292
TIR (% anual)	78	49	53	670	-
VAN (\$)	7874907	7898500	8348352	121271697	-
PRI (meses)	15	24	23	2	-
Carga orgánica a ser tratada en UASB (%)	40	12	12	2	-

Del análisis de la tabla 51 se observa que el proceso más conveniente es la producción de vinagre de cerveza (d), ya que minimiza la carga orgánica a ser tratada de modo convencional, con una excelente rentabilidad. Por el contrario, el tratamiento convencional es la peor alternativa, ya que representa un gasto para la industria. Desde el punto de vista de la reducción en la carga orgánica a ser tratada de modo convencional, en segundo lugar se encuentran los procesos b y c, donde el etanol es recuperado y las vinazas utilizadas para producir etanol adicional. Estas alternativas tienen un VAN superior al proceso donde solo el etanol contenido inicialmente en los efluentes es recuperado, y las vinazas tratadas de modo convencional (a). Igualmente la selección de estas alternativas depende de la posibilidad de tratar la vinaza en las instalaciones existentes, del costo de oportunidad del capital y del precio al cual los subproductos, especialmente el etanol puede ser comercializado.

Dada la rentabilidad de los procesos propuestos, la posibilidad de cada uno dependerá en gran medida de capacidad de colocar en el mercado el producto de valor agregado obtenido. Dado que el mercado Nacional de vinagres, comercializa un total de 30 millones de litros al año y que el proceso propuesto generaría 7.92 millones de litros de vinagre por año, su colocación en el mercado podría verse obstaculizada. En cambio el mercado del bioetanol es mucho más amplio, teniendo en cuenta además la posibilidad del uso interno del alcohol producido, para la elaboración de licores.

En la tabla 52 se describen ventajas y desventajas de posibles procesos combinados de producción de vinagre de cerveza y producción de alcohol, teniendo en cuenta las posibles dificultades de inserción en el mercado, sobre todo del vinagre de cerveza.

Capítulo 6 – Proceso integrado para el tratamiento de efluentes de la industria cervecera

Tabla 52: Análisis económico del proceso integrado para la recuperación y producción de bioetanol.

Procesos de tratamiento	Ventajas	Desventajas
1) Proceso integrado para la producción de bioetanol utilizando la totalidad de los efluentes	<ul style="list-style-type: none"> *La carga orgánica se reduce al 12% del valor inicial *Se tratan los efluentes a través de un proceso rentable. *No hay que desarrollar mercado. 	
2) Producción de vinagre de cerveza utilizando la totalidad de los efluentes	<ul style="list-style-type: none"> *La carga orgánica prácticamente se elimina. *El proceso de tratamiento es altamente rentable. 	*Requiere desarrollar mercado a nivel nacional o internacional.
3) Producción de vinagre de cerveza utilizando solo la cerveza de descarte. Uso del excedente de levaduras para recuperar y producir bioetanol	<ul style="list-style-type: none"> *Si se mantienen las proporciones, la carga orgánica se reduciría al 9.5% del valor inicial. *Se producirían 1980000 L de vinagre de cerveza, volumen más adaptables a los valores del mercado nacional. *Parte del etanol podría ser usado para suplementar la fermentación acética. *Flexibilidad para ajustar los valores del vinagre exigidos por el CAA. *Puede implementarse en etapas. 	<ul style="list-style-type: none"> *Requiere desarrollar mercado a nivel nacional o internacional. * Mayor complejidad de la instalación.

Capítulo 6 – Proceso integrado para el tratamiento de efluentes de la industria cervecera

<p>4) Destilación de la mezcla de efluentes, uso de parte de la vinaza para producir etanol y parte, suplementada con etanol para producir vinagre de cerveza</p>	<ul style="list-style-type: none"> *La carga orgánica máxima a tratar es del 12%, siendo menor cuanto más vinagre se produzca. *Puede implementarse en etapas. *La destilación del medio garantiza las condiciones sanitarias adecuadas para una correcta fermentación acética. *Flexibilidad para ajustar los valores del vinagre exigidos por el CAA. *Aprovecha los carbohidratos de parte de la vinaza para producir más etanol. 	<ul style="list-style-type: none"> *Requiere desarrollar mercado a nivel nacional o internacional. * Mayor complejidad de la instalación. *Características organolépticas inferiores del vinagre
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Capítulo 7: Conclusiones generales y trabajos futuros.

En el presente trabajo se estudio el tratamiento de ciertos efluentes líquidos de la industria cervecera, de alta carga orgánica, mediante procesos no convencionales. Se propuso el tratamiento de la cerveza de descarte y de la fracción líquida del excedente de levaduras, mediante dos procesos principales: el primero, integra la recuperación de etanol con la hidrólisis y fermentación alcohólica posterior de la vinaza y el segundo utiliza la fracción líquida de los efluentes como medio para llevar a cabo una fermentación acética.

La sola recuperación del etanol a través de un proceso de destilación, permitió reducir la carga orgánica de estos efluentes en un 60%. Se simuló un sistema capaz de obtener etanol próximo al azeótropo, contemplando la separación de los componentes volátiles que acompañan el etanol, dentro del mismo sistema, para cumplir con las exigencias del Código Alimentario Argentino para el alcohol etílico potable. Este sistema presentó un consumo de 3021 Kcal/Kg etanol. Este proceso generó un nuevo efluente, la vinaza, que contiene el remanente de la carga orgánica de los efluentes.

La hidrólisis ácida de la vinaza y la posterior fermentación alcohólica de los azúcares reductores obtenidos, permitió producir etanol adicional, que luego de ser removido por destilación, logró reducir la carga orgánica de las vinazas en un 70%, reduciendo la carga orgánica de los efluentes en un 88%. Se estudiaron las principales variables involucradas en el proceso de hidrólisis, concentración de ácido, tiempo y temperatura, y se determinaron las condiciones que permitieron obtener el mayor rendimiento de azúcares reductores al menor costo. Se estudiaron las principales variables involucradas en la fermentación alcohólica de la vinaza, y se estableció un modelo cinético para la fermentación alcohólica.

Capítulo 7 - Conclusiones generales y trabajos futuros

Se realizó un análisis económico individual y conjunto, que demostró la viabilidad del proceso integrado, el que presentó un valor actual neto de la inversión superior a cero, una tasa interna de retorno mayor al 50% anual y un período de recupero del capital de 24 meses.

Se estudió la factibilidad de utilizar los efluentes como medio para una fermentación acética. En este proceso, como el efluente pasa a formar parte del producto, prácticamente se eliminan las necesidades de tratamiento. Se estudio el efecto de conservantes de uso corriente en alimentos, SO_2 , sorbato de potasio y benzoato de sodio, sobre la viabilidad de bacterias acéticas. Se establecieron las concentraciones mínimas que pueden generar inconvenientes durante la fermentación y se propusieron alternativas para subsanar estos inconvenientes. Se demostró que todos los efluentes como sus mezclas, son aptos para llevar a cabo una fermentación acética adecuada.

Se diseñó, construyó y montó un reactor piloto aeróbico para llevar a cabo las fermentaciones acéticas, confirmando los resultados obtenidos, lo que permitió establecer un modelo cinético para la producción de ácido acético y la formación de biomasa, las que estuvieron estrechamente relacionadas. Finalmente se realizó un análisis económico que demostró la gran rentabilidad del proyecto, con un valor actual neto muy superior a cero, y una tasa interna de retorno de 2 meses.

Finalmente se propusieron distintas combinaciones de los procesos estudiados, en relación a subsanar posibles inconvenientes en la colocación de los productos obtenidos (etanol y vinagre de cerveza) en el mercado, minimizando la carga orgánica remanente a tratar.

Capítulo 7 - Conclusiones generales y trabajos futuros

Los estudios llevados a cabo en esta tesis ponen de manifiesto el potencial de éstos efluentes, cerveza de descarte y excedente de levaduras para ser utilizados como materia prima de procesos productivos, pudiendo ser utilizado para obtener otros productos de mayor valor agregado, como ácidos grasos, antibióticos, proteínas de interés biotecnológico, biomasa (para ingredientes activos), etc.

A partir de los resultados de la presente tesis, surgió como desafío implementar procesos similares de valorización y tratamiento para efluentes de la industria de producción de sidra. En estas industrias se generan efluentes similares al excedente de levaduras y a la cerveza de descarte, y los vertidos representan un porcentaje superior a los de la industria cervecera, debido a la localización de las plantas productoras lejos de las plantas embotelladoras, aumentando las pérdidas por trasiego. Además el producto terminado (sidra) a diferencia de la cerveza, es endulzada con diferentes concentraciones de azúcares simples, directamente fermentables por levaduras, por lo que se podría llevar a cabo la fermentación de los efluentes, sin separar previamente el etanol. Esta estrategia, debe ser estudiada desde el punto de vista de la conveniencia económica de separar el etanol o no, previo a la fermentación alcohólica.

Para continuar y profundizar esta línea de investigación se solicitó una Beca Interna Posdoctoral del Conicet en la convocatoria 2014-2015.

Capítulo 8: Bibliografía

- Agler MT., Aydinkaya Z., Cummings TA., Beers AR., Angenent L. T.** 2010. Anaerobic digestion of brewery primary sludge to enhance bioenergy generation: A comparison between low- and high-rate solids treatment and different temperature. *Bioresour. Technol.*, 101, 5842–5851.
- Ahmetović E., Martín M., Grossmann IE.** 2010. Optimization of Energy and Water Consumption in Corn-Based Ethanol Plants. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 49, pp 7972–7982. DOI: 10.1021/ie1000955.
- Albers E., Larsson C., Liden G., Niklasson C., Gustafsson AL.** 1996. Influence of the nitrogen source on *saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 3187–3195.
- Amer RA., Mady SA., Yusef HH., Sabry S.** 2013. Determination of decimal reduction time (D-value) of chemical agents used in hospitals for killing airborne isolated bacteria. *African Journal of Microbiology Research.* 7(26), pp. 3321-3330. DOI: 10.5897/AJMR2013.5580.
- Asgher M., Bashir F., Nasir Iqbal HM.** 2013. A comprehensive ligninolytic pre-treatment approach from lignocelluloses green biotechnology to produce bio-ethanol. *Chem. Eng. Res. Des.*, DOI: 10.1016/j.cherd.2013.09.003.
- Bafrcova P., Šmogrovicova D., Slavikova I., Patkova S., Dömeny Z.** 1999. Improvement of very high gravity ethanol fermentation by media supplementation using *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* 337–341.
- Bartnicki Garcia S., Nickerson WJ.** 1962. Induction of yeastlike development in *mucor* by carbon dioxide. *J. Bacteriol.* 84, 829-840.
- Bayramoglu M., Kobya M., Can O.T., Sozbir M.** 2004 Operating cost analysis of electrocoagulation of textile dye wastewater. *Sep. Purif. Technol.*, 37, 117–125.

- Bradford MM.**, 1976. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248-254.
- Briggs DE., Boulton CA., Brookes PA., Stevens R.** 2004. *Brewing Science and practice.* Woodhead Publishing Limited, Abington Cambridge, England.
- Brito AG., Peixoto J., Oliveira JM., Oliveira JA., Costa C., Nogueira R., Rodrigues A.** 2007. Brewery and winery wastewater treatment: Some focal points of design and operation. Capítulo 7 del libro: *Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry.* Springer Science Business Media, LLC, NY, USA.
- Canilha L., Carvalho W., Felipe MD., Silva JB., Giuliatti M.** 2010. Ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate using *Pichia stipitis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 161, 84–92
- Casey GP., Magnus CA., Ingledeew WM.** 1984. High-Gravity Brewing: Effects of Nutrition on Yeast Composition, Fermentative Ability, and Alcohol Production. *Appl. Environ. Microbiol.* 639-646.
- Chan YJ., Chong MF., Law CL., Hassell DG.** 2009. A review on anaerobic–aerobic treatment of industrial and municipal wastewater. *Chem. Eng. J.*, 155, 1–18.
- Clark MM.** *Transport Modeling for Environmental Engineers and Scientists.* 2nd Edition. A Wiley-Interscience Publication. John Wiley and Sons, New York, 2009.
- Código Alimentario Argentino** (Ley Nº 18284, Decreto Nº 2126/71).
- Dickinson JR., Schweizer M.** 2004. *The Metabolism and Molecular Physiology of Saccharomyces cerevisiae*, 2nd ed. CRC Press: Boca Raton, FL.
- Dodic JM, Vucurovic DJ, Dodic SN., Grahovac JA, Popov SD, Nedeljkovic NM.** 2012. Kinetic modelling of batch ethanol production from sugar beet raw juice. *Applied Energy.*
- Driessen W., Vereijken T.** 2003. Recent developments in biological treatment of brewery effluent. Inst. & Guild of Brew. Africa Sect. Proc. 9th Brewing Convention, Victoria Falls, Zambia: 165-171.

- Dubois, M.; Gilles, KA.; Hamilton, JK.; Rebers, PA.; Smith, F.** 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28, 350–356.
- Du Toit WJ., Pretorius IS., Lonvaud-Funel A.** 2005. The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 862–871.
- Eaton, AD.; Clescer, LS.; Greenberg, AE.** 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed., American Public Health Association: Washington, DC.
- Eblinger HM.** 2012. Beer. Freiburger Brauhaus gmbh, Freiberg/Sachsen, Germany.
- Entani, E., Ohmori, S., Masai, H., Suzuki, KI.** 1985. *Acetobacter polyoxogenes* sp. nov., a new species of an acetic acid bacterium useful for producing vinegar with high acidity. *The Journal of General and Applied Microbiology.*, 31, 475-490.
- Eyles MJ., Warth AD.** 1989. The response of *Gluconobacter oxydans* to sorbic and benzoic acids. *International Journal of Food Microbiology*, 8, 335-342.
- Frederick WJ., Lien SJ., Courchene CE., DeMartini NA., Ragauskas. AJ, Iisa K.** 2008. Production of ethanol from carbohydrates from loblolly pine: A technical and economic assessment. *Bioresour Technol.* 99, 5051–5057.
- Ferreira IMPLVO., Pinho O., Vieira E., Taveira JG.** 2010. Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. *Trends Food Sci. Technol.*, 21, 77–84.
- Fillaudeau L., Blanpain-Avet P., Daufin G.** 2006. Water, wastewater and waste management in brewing industries. *J. Cleaner Prod.*, 14, 463–471.
- Garrido-Vidal D., Pizarro C., González Sáiz JM.** 2003. Study of Process Variables in Industrial Acetic Fermentation by a Continuous Pilot Fermentor and Response Surfaces. *Biotechnol. Prog.*, 19, 1468–1479.

- Gong CS., Cao NJ., Du J., Tsao GT.** 1999. Ethanol Production from Renewable Resources. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.*, 65.
- González Sáiz JM., Garrido-Vidal D., Pizarro C.** 2009. Modelling the industrial production of vinegar in aerated-stirred fermentors in terms of process variables. *Journal of Food Engineering*. 91, 183–196.
- Govindaswamy S, Vane LM.** 2007. Kinetics of growth and ethanol production on different carbon substrates using genetically engineered xylose-fermenting yeast. *Bioresour. Technol* 98, 677–685.
- Gupta N., Sahai V., Gupta R.** 2007. Alkaline lipase from a novel strain *Burkholderia multivorans*: Statistical medium optimization and production in a bioreactor. *Process Biochem.* 42, 518–526.
- Ha JH. Shehzad O., Khan S., Lee SY., Park JW., Khan T.** 2008. Production of bacterial cellulose by a static cultivation using the waste from beer culture broth. *Korean J. Chem. Eng.*, 25, 812–815.
- Ha JH., Shah N., Ul-Islam M., Park JK.** 2011. Potential of the waste from beer fermentation broth for bio-ethanol production without any additional enzyme, microbial cells and carbohydrates. *Enzyme Microb. Technol.*, 49, 298–304.
- Hough SJ.** 1990. *Biotechnology de la cerveza y de la malta*. Editorial Acribia S.A., Zaragoza, España.
- Hrycyk, G.** 1997. The recovery and disposal of diatomaceous earth in breweries. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* 34.
- Isla MA., Comelli RN., Seluy LG.** 2013. Wastewater from the soft drinks industry as a source for bioethanol production. *Bioresour. Technol.*, 136, 140–147.
- Jiang S., Wang S., Zhang N., Liu J., Zhang H., Xu Z.** 2013. An Approach to Brew Beer Vinegar with Barm Beer from Spent Yeast Slurry. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 71(3):138-143

- Jiménez-Hornero JE., Santos-Dueñas IM., García-García I.** 2009. Optimization of biotechnological processes. The acetic acid fermentation. Part I: The proposed model. *Biochemical Engineering Journal.*, 45, 1–6.
- Jiménez-Hornero JE., Santos-Dueñas IM., García-García I.** 2009. Optimization of biotechnological processes. The acetic acid fermentation. Part II: Practical identifiability analysis and parameter estimation. *Biochemical Engineering Journal.*, 45, 7–21.
- Jiménez-Hornero JE., Santos-Dueñas IM., García-García I.** 2009. Optimization of biotechnological processes. The acetic acid fermentation. Part III: Dynamic optimization. *Biochemical Engineering Journal* 45, 22–29.
- Kadam KL., Newman MM.** 1997. Development of a low-cost fermentation médium for ethanol production from biomass. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 47: 625–629.
- Kato MT., Field JA., Lettinga G.** 1997. Anaerobe tolerance to oxygen and the potentials of anaerobic and aerobic cocultures for wastewater treatment. *Braz. J. Chem. Eng.*, 14, DOI: 10.1590/S0104-66321997000400015.
- Khan T., Hyun SH., Park JK.** 2007. Production of glucuronan oligosaccharides using the waste of beer fermentation broth as a basal médium. *Enzyme Microb. Technol.*, 42, 89–92.
- Khattak WA., Khan T., Ha JH., Ul-Islam M., Kang MK., Park JK.** 2013. Enhanced production of bioethanol from waste of beer fermentation broth at high temperature through consecutive batch strategy by simultaneous saccharification and fermentation. *Enzyme Microb. Technol.*, 53, 322–330.
- Kiss AA., Flores Landaeta SJ., Infante Ferreira CA.** 2012. Towards energy efficient distillation technologies: Making the right choice. *Energy* 47, 531-542.
- Kuhad RC., Gupta R., Khasa YP., Singh A.** 2010. Bioethanol production from Lantana camara (red sage): Pretreatment, saccharification and fermentation. *Bioresour Technol.* 101, 8348–8354.

Capitulo 8 - Bibliografía

Kunze W. 1999. Technology brewing and malting. 2da Ed. VLB berlin, Alemania.

Lie, S. 1973. The ebc-ninhydrin method for determination of free alpha amino nitrogen. *Behalf of the ebc analysis committee* 79, 37-41.

Kwiatkowski JR., McAloon AJ., Taylor F., Johnston DB. 2006. Modeling the process and costs of fuel ethanol production by the corn dry-grind process. *Industrial Crops and Products* 23, 288–296.

Ludwig Narzib, Freising, Germany. DOI: 10.1002/14356007.a03_421.pub2.

Marriaga N. 2009. Indicadores de desempeño de la destilación de Bioetanol. *Dyna*, 159, 85-92

Martín M. Grossmann IE. 2012. Energy optimization of lignocellulosic bioethanol production via Hydrolysis. *AIChE J.*, 58, 1538–1549.

Martín M., Grossmann IE. 2013. On the Systematic Synthesis of Sustainable Biorefineries. *Ind. Eng. Chem. Res.* dx.doi.org/10.1021/ie2030213.

Mazzola PG., Vessoni Penna TC., Martins A. 2003. Determination of decimal reduction time (D value) of chemical agents used in hospitals for disinfection purposes. *BMC Infectious Diseases*, 3.

McAloon A., Taylor F., Yee W., Ibsen K., Wooley R. 2000. Determining the Cost of Producing Ethanol from Corn Starch and Lignocellulosic Feedstocks. NREL/TP-580-28893. Disponible en <http://www.doe.gov/bridge>

Miller, GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31, 426–428.

Moncada J., Jaramillo JJ., Higueta JC., Younes C., Cardona CA. 2013. Production of bioethanol using *Chlorella vulgaris* cake: A techno-economic and environmental assessment in the colombian context. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 52, 16786–16794.

- Mussatto SI., Dragone G., Roberto IC.** 2006. Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. *J. Cereal Sci.* 43, 1–14.
- Mussatto SI., Roberto IC.** 2005. Acid hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain to produce xylitol. *J Sci Food Agric.*, 85, 2453–2460. DOI: 10.1002/jsfa.2276
- Nghiem NP., Ramírez EC., McAloon AJ., Yee W., Johnston DB., Hicks KB.** 2011. Economic analysis of fuel ethanol production from winter hulled barley by the EDGE (Enhanced Dry Grind Enzymatic) process. *Bioresour Technol.* 102, 6696–6701.
- Nigam PSN., Pandey A.** 2009. *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation.* Springer Science Business Media, LLC, NY, USA.
- Olajire AA.** 2012. The brewing industry and environmental challenges. *J. Cleaner Prod.* 1-21.
- Palmarola-Adrados B., Choteborska P., Galbe M., Zacchi G.** 2005. Ethanol production from non-starch carbohydrates of wheat bran. *Bioresour Technol.* P96, 843–850.
- Palmqvist E., Hahn-Hagerdal B.** 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresour. Technol.*, 74, 17–24.
- Palukurty MA., Telgana NK., Reddy Bora HS., Mulampaka SN.** 2008. Screening and optimization of metal ions to enhance ethanol production using statistical experimental designs. *Afr J Microbiol Res.* 2, 087-094.
- Phisalaphong M., Srirattana N., Tanthapanichakoon W.** 2006. Mathematical modeling to investigate temperature effect on kinetic parameters of ethanol fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 28, 36–43.
- Pinelli D., Liu Z., Magelli F.** 2010. Analysis of KLa Measurement Methods in Stirred Vessels: The Role of Experimental Techniques and Fluid Dynamic Models. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, 8, A115.
- Preedy VR.** 2009. *Beer in Health and Disease Prevention.* Elsevier Inc., London, UK.

Capitulo 8 - Bibliografía

- Rafiqul ISM., Mimi Sakinah SM.** 2012. Kinetic studies on acid hydrolysis of Meranti wood sawdust for xylose production. *Chem. Eng. Sci.* 71, 431–437.
- Ripper M.** 1892. Schweflige säure in weinen und deren bestimmung. *J. Prakt. Chem.*, 46:428–473
- Romero LE., Gómez JM., Caro I., Cantero D.** 1994. A kinetic model for growth of *Acetobacter aceti* in submerged cultura. *The Chemical Engineering Journal*, 54, B15-B24.
- Rodrigues AC., Brito AG., Melo LF.** 2001. Posttreatment of a brewery wastewater using a sequencing batch reactor. *Water Environ. Res.*, 73.
- Ruiz A., Ariño J.** 2007. Function and regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* ENA sodium ATPase system. *Eukaryotic Cell.*, 12, 2175–2183.
- Sharda AV., Sharma MP., Kumar S.** 2013. Performance evaluation of brewery wastewater treatment plant. *I.J.E.P.R.*, 2, 3.
- Simate GS., Cluett J., Iyuke SE., Musapatika ET., Ndlovu S., Walubita LF., Alvarez AE.** 2011. The treatment of brewery wastewater for reuse: State of the art. *Desalination*, 273, 235-247.
- Soares EV., Soares HMVM.** 2013. Cleanup of industrial effluents containing heavy metals: a new opportunity of valorising the biomass produced by brewing industry. *Appl. Microbiol Biotechnol*, 97, 6667-6675.
- Sokollek SJ., Hammes WP.** 1997. Description of a Starter Culture Preparation for Vinegar Fermentation System. *Appl. Microbiol.* 20, 481-491.
- Sokollek SJ., Hertel C., Hammes WP.** Description of *Acetobacter oboediens* sp. nov. and *Acetobacter pomorum* sp. nov., two new species isolated from industrial vinegar fermentations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1998 48: 935-940.
- Soyuduru D., Ergun M., Tosun A.** 2009. Application of a Statistical Technique to Investigate Calcium, Sodium, and Magnesium Ion Effect in Yeast Fermentation. *Appl Biochem Biotechnol.*, 152:326–333. DOI 10.1007/s12010-008-8327-8

Capitulo 8 - Bibliografía

- Thomas KC., Hynes SH., Ingledew WM.** 1994. Effects of particulate materials and osmoprotectants on very-high-gravity ethanolic fermentation by *saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1519-152.
- Van Zyl C., Prior BA., Du Preez JC.** 1988. Production of ethanol from sugar cane bagasse hemicellulose hydrolyzate by *Pichia stipitis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 17, 357–369.
- Vane LM.** 2008. Separation technologies for the recovery and dehydration of alcohols from fermentation broths. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* 2:553–588. DOI: 10.1002/bbb.
- Walker GM.** 2004. Metals in yeast fermentation processes. *Adv. Appl. Microbiol.*, 54, 197–229.
- Weisberg S.** 2005. Applied Linear Regression. 3rd ed. Wiley Interscience: Hoboken, NJ.
- Williams & Wilkins.** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume two: The proteobacteria. Part C the Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilon proteobacteria. 2nd ed. East Lansing, MI 48824-4320. Springer; 2005.
- Xiaobo Z., Jiewen Z., Shouyi W., Xingyi H.** 2003. Vinegar Classification Based on Feature Extraction and Selection From Tin Oxide Gas Sensor Array Data. *Sensors*, 3, 101-109.
- Yang DJ., Chen HY., Liu SC.** 2014. Study of the Antibacterial Efficacy of Bainiku-Ekisu against Pathogens. *International Journal of Bacteriology*. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/460395>
- Yue G., Yu J., Zhang X., Tan T.** 2012. The influence of nitrogen sources on ethanol production by yeast from concentrated sweet sorghum juice. *Biomass Bioenergy*, 39, 48–52.
- Zhang M., Wang F., Su R., Qi W., He Z.** 2010. Ethanol production from high dry matter corncob using fed-batch simultaneous saccharification and fermentation after combined pretreatment. *Bioresour. Technol.* 101, 4959–4964.

ANEXO I: Especificaciones del Código Alimentario Argentino para el Etanol

Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos y Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos

CODIGO ALIMENTARIO ARGENTINO

Resolución Conjunta 86/2008 y 339/2008

Modificación.

Bs. As., 23/4/2008

VISTO la Ley 18.284, el Capítulo XVI del Código Alimentario Argentino, las Resoluciones M. S. y A. S. Nº 3/95, 79/95, 110/95 y 433/97 y el Expediente Nº 1-47-2110-1337-03-1 del Registro de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica y,

CONSIDERANDO:

Que las presentes actuaciones se originan a través de una solicitud de la Cámara Argentina de Destiladores Licoristas y algunos representantes de la Cámara de Elaboradores de Whisky.

Que por Resolución del ex Ministerio de Salud y Acción Social Nº 433/97 se incorporó al Código Alimentario Argentino la Resolución GMC Nº 143/96 referida al Destilado Alcohólico Simple.

Que por Resolución del ex Ministerio de Salud y Acción Social Nº 110/95 se incorporó al Código Alimentario Argentino la Resolución GMC Nº 77/94 referida a Bebidas Alcohólicas (con excepción de Fermentadas), Definiciones.

Que por Resolución del ex Ministerio de Salud y Acción Social Nº 79/95 se establece la vigencia de las Condiciones para la Autorización de la Fabricación, Fraccionamiento y

Comercialización de Licor Extra Seco y Licor Seco o Bebida Espirituosa Seca y Caña y Caña Doble.

Que por Resolución del ex Ministerio de Salud y Acción Social Nº 3/95 se incorporaron al Código Alimentario Argentino las Resoluciones GMC Nº 20/94 y 46/93 referidas a Bebidas Alcohólicas, Definiciones y a Reglamento Técnico Mercosur de Aditivos Aromatizantes/Saborizantes.

Que mediante la Actuación Simple Nº 7678/02 la Cámara Argentina de Destiladores Licoristas de la República Argentina solicitó la incorporación al Código Alimentario Argentino de la asignación de aditivos y sus concentraciones máximas para las bebidas alcohólicas, con excepción de las fermentadas, que se propusieran en la Recomendación Nº 5/00 del Subgrupo de Trabajo 3 del Mercosur.

Que la Comisión Nacional de Alimentos ha tratado el tema expidiéndose favorablemente y señalando que corresponde la inclusión de la leyenda pertinente a fin de acotar el límite máximo de aditivos cuando se utilizan en forma conjunta de acuerdo a los requerimientos establecidos por la Resolución Grupo Mercado Común Nº 52/98 "Reglamento Técnico Mercosur sobre Criterios para asignar funciones de aditivos, aditivos y sus concentraciones máximas a todas las categorías de alimentos", según consta en el acta Nº 54/2002.

Que se publicó en internet la modificación propiciada a fin de someterlo a discusión pública, no habiéndose recibido objeciones a su respecto. 39

Que es necesario mantener actualizadas las normas del Código Alimentario Argentino adecuándolas a los adelantos técnicos producidos en cada materia.

Que en virtud de lo expuesto resulta necesario derogar los artículos 1111, 1118, 1123, 1124, 1125, 1126, 1127, 1127 bis, 1129 bis, 1130, 1131, 1132, 1134, 1135 y 1136, sustituir los artículos 1108, 1109, 1110, 1113, 1114, 1115, 1116, 1117, 1119, 1120, 1121, 1122, 1125 bis, 1128, 1129, 1129 tris, 1133 y 1136 bis del Código Alimentario Argentino, e incorporar el artículo 1136 tris al mencionado cuerpo legal.

Anexo I

Que la Comisión Nacional de Alimentos ha intervenido, expidiéndose favorablemente respecto de la incorporación propuesta.

Que los Servicios Jurídicos Permanentes de los organismos involucrados han tomado la intervención de su competencia.

Que se actúa en virtud de las facultades conferidas por el Decreto 815/99.

Por ello,

LA SECRETARIA DE POLITICAS, REGULACION E INSTITUTOS Y EL SECRETARIO DE AGRICULTURA, GANADERIA, PESCA Y ALIMENTOS RESUELVEN:

Artículo 1º — Sustitúyase el artículo 1108 del Código Alimentario Argentino que quedará redactado de la siguiente manera: "Art. 1108: Destilado Alcohólico Simple es el producto con una graduación alcohólica superior a 54% vol. e inferior a 95% vol. a 20 °C, destinado a la elaboración de bebidas alcohólicas y obtenido por la destilación simple o por destilo-rectificación parcial selectiva de mostos y/o subproductos provenientes únicamente de materias primas de origen agrícola de naturaleza azucarada o amilácea, resultante de la fermentación alcohólica.

La destilación deberá ser efectuada de forma que el destilado presente aroma y sabores provenientes de las materias primas utilizadas, de los derivados del proceso fermentativo y de los formados durante la destilación.

Art. 2º — Sustitúyase el artículo 1109 del Código Alimentario Argentino que quedará redactado de la siguiente manera: "Art. 1109: Alcohol Etílico Potable de Origen Agrícola es el producto con una graduación alcohólica mínima de 95% Vol. a 20 °C, obtenido por la destilo-rectificación de mostos provenientes únicamente de materias primas de origen agrícola, de naturaleza azucarada o amilácea, resultante de la fermentación alcohólica, como también el producto de la rectificación de aguardientes o de destilados alcohólicos simples. En la denominación del alcohol etílico potable de origen agrícola, cuando se haga referencia a la materia prima utilizada, el alcohol deberá ser obtenido exclusivamente de esa materia prima."

ESPECIFICACIONES TECNICAS:

1. Características organolépticas No deben detectarse aromas ni sabores extraños a la naturaleza del alcohol.
2. Apariencia Límpido e incoloro antes y después de dilución con agua destilada.
3. Grado alcohólico Mínimo 95% vol. a 20 °C
4. Acidez total expresada en ácido acético mg/100 ml de alcohol anhidro
Máximo 3.0
5. Esteres expresados en acetato de etilo mg/100 ml de alcohol anhidro
Máximo 10.0
6. Aldehídos expresados en acetaldehído mg/100 ml de alcohol anhidro
Máximo 2.0
7. Alcoholes superiores expresados por la sumatoria de los mismos mg/100 ml de alcohol anhidro
Máximo 3.0
8. Furfural (mg/100 ml de alcohol anhidro) Máximo 0.01
9. Metanol (mg/100 ml de alcohol anhidro) Máximo 50.0
10. Residuo seco (mg/100 ml de alcohol anhidro) Máximo 1.5
11. Benceno Ausencia

ANEXO II: Manual Sensor Figaro TGS 2620

FIGARO

PRODUCT INFORMATION

TGS 822 - for the detection of Organic Solvent Vapors

Features:

- * High sensitivity to organic solvent vapors such as ethanol
- * High stability and reliability over a long period
- * Long life and low cost
- * Uses simple electrical circuit

Applications:

- * Breath alcohol detectors
- * Gas leak detectors/alarms
- * Solvent detectors for factories, dry cleaners, and semiconductor

The sensing element of Figaro gas sensors is a tin dioxide (SnO₂) semiconductor which has low conductivity in clean air. In the presence of a detectable gas, the sensor's conductivity increases depending on the gas concentration in the air. A simple electrical circuit can convert the change in conductivity to an output signal which corresponds to the gas concentration.

The TGS 822 has high sensitivity to the vapors of organic solvents as well as other volatile vapors. It also has sensitivity to a variety of combustible gases such as carbon monoxide, making it a good general purpose sensor. Also available with a ceramic base which is highly resistant to severe environments as high as 200°C (model# TGS 823).



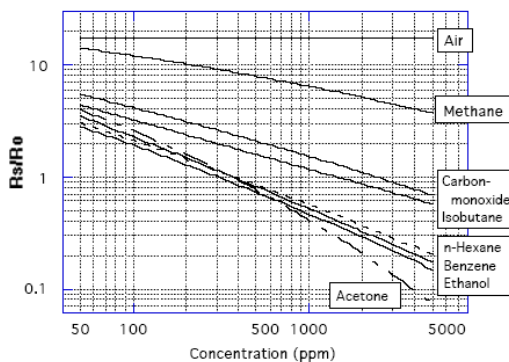
The figure below represents typical sensitivity characteristics, all data having been gathered at standard test conditions (see reverse side of this sheet). The Y-axis is indicated as sensor resistance ratio (Rs/Ro) which is defined as follows:

Rs = Sensor resistance of displayed gases at various concentrations
 Ro = Sensor resistance in 300ppm ethanol

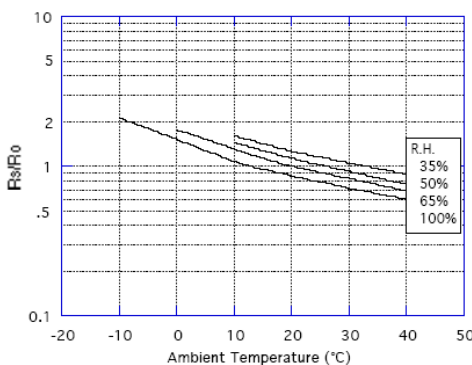
The figure below represents typical temperature and humidity dependency characteristics. Again, the Y-axis is indicated as sensor resistance ratio (Rs/Ro), defined as follows:

Rs = Sensor resistance at 300ppm of ethanol at various temperatures/humidities
 Ro = Sensor resistance at 300ppm of ethanol at 20°C and 65% R.H.

Sensitivity Characteristics:



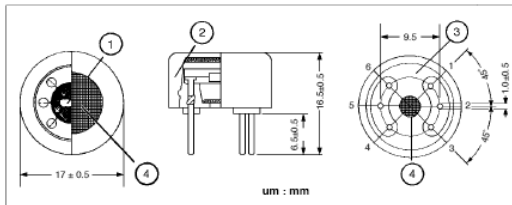
Temperature/Humidity Dependency:



IMPORTANT NOTE: OPERATING CONDITIONS IN WHICH FIGARO SENSORS ARE USED WILL VARY WITH EACH CUSTOMER'S SPECIFIC APPLICATIONS. FIGARO STRONGLY RECOMMENDS CONSULTING OUR TECHNICAL STAFF BEFORE DEPLOYING FIGARO SENSORS IN YOUR APPLICATION AND, IN PARTICULAR, WHEN CUSTOMER'S TARGET GASES ARE NOT LISTED HEREIN. FIGARO CANNOT ASSUME ANY RESPONSIBILITY FOR ANY USE OF ITS SENSORS IN A PRODUCT OR APPLICATION FOR WHICH SENSOR HAS NOT BEEN SPECIFICALLY TESTED BY FIGARO.



Structure and Dimensions:

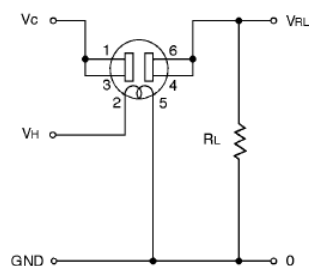


- ① Sensing Element:
SnO₂ is sintered to form a thick film on the surface of an alumina ceramic tube which contains an internal heater.
- ② Cap:
Nylon 66
- ③ Sensor Base:
Nylon 66
- ④ Flame Arrestor:
100 mesh SUS 316 double gauze

Pin Connection and Basic Measuring Circuit:

The numbers shown around the sensor symbol in the circuit diagram at the right correspond with the pin numbers shown in the sensor's structure drawing (above). When the sensor is connected as shown in the basic circuit, output across the Load Resistor (V_{RL}) increases as the sensor's resistance (R_s) decreases, depending on gas concentration.

Basic Measuring Circuit:



Standard Circuit Conditions:

Item	Symbol	Rated Values	Remarks
Heater Voltage	V _H	5.0±0.2V	AC or DC
Circuit Voltage	V _c	Max. 24V	DC only P _s ≤15mW
Load Resistance	R _L	Variable	0.45kΩ min.

Electrical Characteristics:

Item	Symbol	Condition	Specification
Sensor Resistance	R _s	Ethanol at 300ppm/air	1kΩ ~ 10kΩ
Change Ratio of Sensor Resistance	R _s /R ₀	$\frac{R_s(\text{Ethanol at 300ppm/air})}{R_s(\text{Ethanol at 50ppm/air})}$	0.40 ± 0.10
Heater Resistance	R _H	Room temperature	38.0 ± 3.0Ω
Heater Power Consumption	P _H	V _H =5.0V	660mW (typical)

Standard Test Conditions:

TGS 822 complies with the above electrical characteristics when the sensor is tested in standard conditions as specified below:

- Test Gas Conditions: 20°±2°C, 65±5%R.H.
- Circuit Conditions: V_c = 10.0±0.1V (AC or DC),
V_H = 5.0±0.05V (AC or DC),
R_L = 10.0kΩ±1%

Preheating period before testing: More than 7 days

Sensor Resistance (R_s) is calculated by the following formula:

$$R_s = \left(\frac{V_c}{V_{RL}} - 1 \right) \times R_L$$

Power dissipation across sensor electrodes (P_s) is calculated by the following formula:

$$P_s = \frac{V_c^2 \times R_s}{(R_s + R_L)^2}$$

FIGARO USA, INC.
121 S. Wilke Rd. Suite 300
Arlington Heights, IL 60005
Phone: (847)-832-1701
Fax: (847)-832-1705
email: figarousa@figarosensor.com

For information on warranty, please refer to Standard Terms and Conditions of Sale of Figaro USA Inc.

REV: 09/02

ANEXO III: Exigencias del Código Alimentario Argentino para vinagres.

Artículo 1331 - (Res 80, 13.1.82)

“En la elaboración de vinagres quedan permitidos los siguientes tratamientos:

La dilución del vino, solución azucarada o solución alcohólica hecha exclusivamente en la fábrica de vinagre y sin poder salir de ella, en la medida necesaria para su acetificación normal, con agua potable o deionizada.

El empleo de clarificantes admitidos por el presente Código para alimentos y bebidas en general, tales como: Tierra de infusorios, Bentonita, PVP, Tanino y Gelatina.

La aromatización con estragón (hojas desecadas de *Artemisia dracuncululus* L), laurel y otras especies vegetales, condimentos, esencias naturales y naturales reforzadas, esencias y extractos sávido aromatizantes sintéticos y oleorresinas autorizados por el presente Código, exclusivamente para los vinagres de vino y de fruta.

La aromatización deberá declararse en el rotulado en forma bien visible y cuando proceda de aromas artificiales, con la indicación de Aromatizado artificialmente.

El uso de levaduras seleccionadas: *Saccharomyces ellipsoideus*, *Acetobacter aceti* y otras autorizadas para alimentos.

El uso de aditivos químicos aptos para uso alimentario:

Sulfato de amonio y sulfato de potasio, en cantidades tecnológicas apropiadas; Dióxido de azufre y/o sus sales, en un máx 10 mg/100; Oxígeno y ácidos orgánicos: cítrico, tartárico, fumárico, glucónico, málico, láctico y sus sales; Acido ascórbico hasta 0,1% y excluidos los no mencionados, especialmente el ácido fórmico.

La calefacción, sedimentación, refrigeración, trasegado y filtración del vinagre.

El añejamiento o maduración para el vinagre obtenido sin destilación intermedia, y su declaración en el rotulado, siempre que esté amparado por certificación oficial y que sea mayor de 6 meses de duración. La pasteurización y la esterilización industrial,

siempre que se declaren en el rotulado. El destilado del vinagre, siempre que se declare en el rotulado. La rehidratación para el vinagre que en curso de la elaboración, haya excedido el grado de acidez, siempre que esta práctica se realice en el establecimiento elaborador y que el producto resultante cumpla las demás exigencias del presente Código.

Con excepción del vinagre de alcohol, que no debe colorearse, se autoriza la coloración con caramelo para los vinagres claros y con la materia colorante del vino (Enocianina) para los tintos sin declaración en el rotulado.

El uso de otros colorantes naturales (Cochinilla, Carmín, Orchilla, etc) queda reservado a la

aprobación de la autoridad sanitaria competente y a su declaración en el rotulado. La decoloración con carbón activo técnicamente puro y demás sustancias autorizadas para vino

El uso de otros colorantes naturales (Cochinilla, Carmín, Orchilla, etc) queda reservado a la aprobación de la autoridad sanitaria competente y a su declaración en el rotulado.

La decoloración con carbón activo técnicamente puro y demás sustancias autorizadas para vino y cerveza".

Artículo 1333 - (Res 80, 13.1.82)

"Se consideran ineptos para el consumo los vinagres que:

1. Están elaborados fundamentalmente a base de ácido acético, ácido láctico, ácido pirolíneo y ácidos minerales, cualesquiera sean sus denominaciones o nombres de fantasía (sucedáneos de vinagre, vinagre de esencia acética, vinagrina, esencia de vinagre y otros similares).
2. Contienen ácidos minerales agregados y que en consecuencia presentan un pH a 20° menor de 2,8 y/o modifiquen el color del violeta de metilo (sol. al 1%).

Anexo III

3. Contienen más de 0,5% de ácido fórmico.
4. Contienen más de 0,1% de alcohol metílico
5. **(Res 711, 25.4.85)** "Contienen acidez total, expresada en ácido acético, inferior a la reglamentaria o inferior a la indicada en el rotulado, en el caso que sea mayor a la mínima exigida, con una tolerancia no mayor de 0,3%"
6. Tienen olor empireumático o fenólico (procedente del ácido acético comercial) y/o que acusen reacción franca de furfural
7. Precipiten con el agua de bromo (presencia de ácido pirolígnico) o den olor empireumático cuando son saturados por álcalis.
8. Contienen alcohol etílico en una cantidad superior a la décima parte de la acidez total expresada en volumen.
9. Estén elaborados en recipientes metálicos que puedan ser atacados por el ácido acético.
10. Contienen sustancias conservadoras y/o antisépticas (incluida la esencia de mostaza); metales tóxicos, materias acres irritantes y colorantes prohibidos.
11. Contienen madre, sedimento, nematodos (anguilulas), insectos (mosquitas y ácaros), vegetaciones criptogámicas o estén afectados de otras alteraciones (mohos, microorganismos de la putrefacción, del amargor, ennegrecimiento, etc).
Exceptúanse de la exigencia del sedimento a los vinagres obtenidos por métodos tradicionales de fermentación acética (no destilados), que pueden tener sedimentos en cantidad moderada.
12. Tienen sal (cloruro de sodio) agregada.
13. Tienen aromatizantes prohibidos o aromatizantes permitidos no declarados en el rotulado".

Artículo 1335 - (Res 80, 13.1.82)

Anexo III

"Los vinagres no vínicos deberán circular bajo las denominaciones que corresponden a su origen y de las que a continuación se definen:

Vinagre de alcohol: Producido por la fermentación acética de disoluciones de alcohol rectificado o neutro.

Deberá ser incoloro, límpido, transparente, sin sedimento, con sabor picante agradable y olor característico del ácido acético puro.

Deberá tener una densidad a 15° a 1,006 a 1,017; un residuo seco a 100- 105° no mayor a 0,45% y trazas de cenizas determinadas a 500-550° (no más de 0,02%) cuali-cuantitativamente equivalentes a sales del agua utilizada en la elaboración.

Deberá tener una acidez total, expresada en ácido acético, no menor de 5,0% y una acidez volátil, expresada en el mismo ácido, no menor de 96,0% de la acidez total.

Podrá mantener cloruros y sulfatos en cantidad no mayor a la que corresponda a los contenidos en el agua utilizada para la dilución del alcohol.

No podrá contener alcohol etílico en cantidad superior a la décima parte de la acidez expresada en volumen.

No podrá colorearse ni aromatizarse, ni aún cuando estas operaciones se declaren en el rótulo. Este producto se rotulará: Vinagre de alcohol, formando una sola frase, con caracteres de igual tamaño y visibilidad.

El vinagre de alcohol, destilado después de la fermentación acética, deberá dar al análisis residuo seco y cenizas cero (0) o a lo sumo equivalentes a las sales del agua con la que el vinagre se rebajó y se deberá rotular el vinagre de alcohol destilado con caracteres de igual tamaño y visibilidad.

En ningún caso podrá llevar la indicación de la materia prima de origen.

Anexo III

Vinagre de cereal: Obtenido por fermentación alcohólica y subsiguiente fermentación acética de mostos procedentes de cereales y/o de cereales malteados (trigo, maíz, cebada, centeno, etc) en forma conjunta o separada, quedando prohibida la hidrólisis mineral para los vinagres que llevan esta designación.

El vinagre de cereal deberá tener caracteres organolépticos propios relacionados a las materias primas que le dan origen: aspecto límpido o ligeramente opalescente, color ambarino claro y olor acético, con un dejo que recuerda al del cereal empleado en la fabricación.

Exigencias analíticas: Densidad a 15° 1,00 a 1,017, residuo seco 1,0 a 2,0% y acidez en ácido acético no menos de 4,0%; alcohol por ciento en volumen a 15°, vestigios.

Deberá denominarse: Vinagre de cereal o Vinagre de alcohol de cereal, según sea su preparación y a continuación o debajo, el nombre de los cereales utilizados en su elaboración.

El vinagre obtenido a partir de alcohol de cereales sometidos a hidrólisis mineral y subsiguiente fermentación acética deberá denominarse simplemente: Vinagre de alcohol, debiendo cumplir las exigencias correspondientes al mismo.

Vinagre de Malta: Obtenido por fermentación alcohólica y subsiguiente fermentación acética de mostos procedentes de malta (cebada malteada, mediante la diastasa), sin el agregado de otros cereales malteados.

Deberá tener caracteres organolépticos propios: aspecto límpido o ligeramente opalescente, color amarillo ambarino y olor y sabor a malta.

Exigencias analíticas: Densidad a 15° 1,00 a 1,017, residuo seco 1,0 a 2,0; cenizas no menos de 0,10; acidez en ácido acético no menos de 4,0%; azúcares reductores de 1,0 a 4,0% y alcohol, por ciento en volumen a 15°, no más de 0,50.

Este producto deberá denominarse: Vinagre de Malta.

Anexo III

El vinagre elaborado con mezcla de malta y otros cereales, malteados o no, deberá rotularse: Vinagre de cereal o Vinagre de alcohol de cereal, según corresponda y a continuación o debajo del nombre de los cereales, sin especificación alguna el procedimiento de malteado.

Vinagre obtenido de alcohol de malta, deberá cumplir las exigencias de vinagre de alcohol y denominarse simplemente: Vinagre de alcohol.

Vinagre de cerveza: Obtenido por fermentación acética de cerveza de título alcohólico adecuado.

Deberá tener color amarillo y sabor agrio y amargo, que recuerde al de la malta y el lúpulo.

No deberá contener sustancias amargas distintas a las del lúpulo.

Exigencias analíticas: Densidad a 15° 1.017 a 1,040; residuo seco 1,0 a 2,5%, cenizas aproximadamente 0,25%; acidez mínima en ácido acético 4,0%; alcohol máximo 10% de la acidez total. Además su residuo deberá tener una fuerte proporción de proteínas y fosfatos, presencia de maltosa y ausencia de tartratos. Deberá precipitar por el alcohol absoluto (1+2).

Este producto deberá denominarse: Vinagre de cerveza.