

UNIVERSIDAD DE INGENIERÍA Y TECNOLOGÍA

CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA



**DISEÑO DE UN PROCESO DE PRODUCCIÓN DE
ENZIMAS CELULOLÍTICAS A PARTIR DE
BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR**

TESIS

Para optar el título profesional de ingeniero químico

AUTOR

Rodrigo Mariano Venegas Montañez (ORCID: 0000-0002-5099-8097)

ASESORA

Úrsula Fabiola Rodríguez Zúñiga (ORCID: 0000-0001-5426-9871)

Lima – Perú

2021

Dedicatoria:

A mi familia, que me apoyó en los momentos más complicados.

Agradecimientos:

A todos mis profesores de UTEC que me impulsaron a dar siempre lo mejor de mí y a mi asesora Úrsula Rodríguez, ya que sin ella este trabajo no habría sido posible.

TABLA DE CONTENIDO

| | Pág. |
|---|------|
| RESUMEN | 12 |
| ABSTRACT | 13 |
| INTRODUCCIÓN..... | 14 |
| CAPÍTULO I..... | 17 |
| OBJETIVOS..... | 17 |
| 1.1 Objetivo general..... | 17 |
| 1.2 Objetivos específicos | 17 |
| CAPÍTULO II..... | 18 |
| MARCO TEÓRICO | 18 |
| 2.1 Materia lignocelulósica..... | 18 |
| 2.1.1 Celulosa | 18 |
| 2.1.2 Hemicelulosa | 18 |
| 2.1.3 Lignina..... | 19 |
| 2.2 Pretratamientos para el bagazo de caña de azúcar..... | 20 |
| 2.3 Enzimas celulolíticas | 21 |
| 2.3.1 Clasificación | 21 |
| 2.3.2 Unidades de medida para actividad celulolítica | 22 |
| 2.4 Cinética del crecimiento celular para producción enzimática | 22 |
| 2.5 Producción enzimática..... | 24 |
| 2.6 Concentración de las enzimas por precipitación..... | 25 |
| CAPÍTULO III | 26 |
| ESTADO DEL ARTE | 26 |
| 3.1 Producción de enzimas celulolíticas | 26 |
| 3.1.1 A partir de residuos agrícolas | 26 |

| | | |
|-------------------|---|----|
| 3.1.2 | A partir de bagazo de caña de azúcar | 27 |
| 3.2 | Tipos de biorreactores para producción enzimática por fermentación sumergida | 31 |
| 3.2.1 | Reactor de tanque agitado (STR)..... | 31 |
| 3.2.2 | Reactor de columna de burbujas..... | 33 |
| 3.2.3 | Reactor airlift..... | 33 |
| 3.2.4 | Biorreactor de lecho fibroso rotatorio (RFBB)..... | 34 |
| 3.3 | Operaciones aguas abajo de la fermentación..... | 35 |
| 3.3.1 | Precipitación con sulfato de amonio..... | 35 |
| 3.3.2 | Precipitación con etanol..... | 36 |
| 3.4 | Modelamiento matemático de la fermentación..... | 36 |
| 3.5 | Simulación del proceso de obtención de enzimas celulolíticas a escala industrial..... | 39 |
| CAPÍTULO IV | | 42 |
| METODOLOGÍA..... | | 42 |
| 4.1 | Determinación de la capacidad de producción | 42 |
| 4.2 | Simulación de la cinética de la producción enzimática | 42 |
| 4.3 | Diseño del proceso..... | 43 |
| 4.3.1 | Tren de siembra | 43 |
| 4.3.2 | Pretratamiento del bagazo de caña | 44 |
| 4.3.3 | Separación de sólidos de la mezcla de fermentación..... | 44 |
| 4.3.4 | Concentración de las enzimas..... | 44 |
| 4.4 | Evaluación económica | 45 |
| 4.4.1 | CAPEX | 45 |
| 4.4.2 | OPEX..... | 46 |
| 4.4.3 | Planificación del proceso | 47 |
| 4.4.4 | Costo unitario de producción..... | 47 |
| 4.4.5 | Índices de rentabilidad (VAN y TIR) | 48 |
| CAPÍTULO V | | 49 |
| RESULTADOS | | 49 |

| | | |
|-------|--|----|
| 5.1 | Determinación del rendimiento deseado en el proceso de fermentación | 49 |
| 5.2 | Simulación de la cinética de la producción enzimática | 49 |
| 5.2.1 | Fermentación batch..... | 49 |
| 5.2.2 | Estrategias de operación semibatch | 51 |
| 5.2.3 | Dimensionamiento del fermentador principal y consideraciones de diseño | 54 |
| 5.3 | Diseño del proceso..... | 56 |
| 5.3.1 | Descripción del proceso..... | 56 |
| 5.3.2 | Tren de siembra | 57 |
| 5.3.3 | Pretratamiento del bagazo de caña | 59 |
| 5.3.4 | Separación de sólidos de la mezcla de fermentación..... | 59 |
| 5.3.5 | Concentración de las enzimas..... | 61 |
| 5.3.6 | Balance de masa del proceso | 61 |
| 5.3.7 | Consumo de utilidades en el proceso..... | 62 |
| 5.4 | Evaluación económica | 69 |
| 5.4.1 | Inversión de capital (CAPEX) | 69 |
| 5.4.2 | Costos de operación (OPEX)..... | 70 |
| 5.4.3 | Depreciación | 73 |
| 5.4.4 | Planificación del proceso (<i>Scheduling</i>) | 74 |
| 5.4.5 | Costo unitario de producción..... | 77 |
| 5.4.6 | Índices de rentabilidad (VAN y TIR) | 79 |
| | CAPÍTULO VI | 81 |
| | RECOMENDACIONES | 81 |
| | CONCLUSIONES..... | 83 |
| | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 84 |
| | ANEXOS | 92 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | Pág. |
|---|------|
| Tabla 3.1 Actividades enzimáticas del producto de la fermentación de residuos agrícolas con hongos filamentosos de los géneros <i>Aspergillus</i> y <i>Trichoderma</i> | 27 |
| Tabla 3.2 Actividades enzimáticas del producto de la fermentación del bagazo de caña pretratado por SE con tres especies de <i>Trichoderma</i> | 28 |
| Tabla 3.3 Niveles de FPasa, CMCasa y BGL en las soluciones concentradas de enzimas de <i>A. awamori</i> y <i>T. reesei</i> y en los cocktails de enzimas | 29 |
| Tabla 3.4 Actividades enzimáticas del producto de la fermentación del bagazo de caña pretratado por explosión de vapor (SE) y agua caliente (LHW) con tres especies de <i>Aspergillus</i> | 29 |
| Tabla 3.5 Actividades enzimáticas del producto de la fermentación del bagazo de caña con hongos filamentosos de los géneros <i>Aspergillus</i> y <i>Trichoderma</i> | 30 |
| Tabla 3.6 Actividad de celulasa del producto de la fermentación del bagazo de caña a diferentes condiciones de pH..... | 33 |
| Tabla 4.1 Parámetros cinéticos para el crecimiento celular y producción enzimática.... | 43 |
| Tabla 4.2 Porcentajes considerados para el cálculo de DC, IC y OC..... | 46 |
| Tabla 5.1 Parámetros de operación y actividad máxima para distintos modos de operación | 54 |
| Tabla 5.2 Demanda de vapor para la esterilización de los fermentadores | 67 |
| Tabla 5.3 Costo de compra de los equipos principales..... | 69 |
| Tabla 5.4 Costos directos (DC), costos indirectos (IC) y otros costos (OC) asociados al proceso..... | 70 |
| Tabla 5.5 Demanda y costo de materias primas por lote de producción..... | 71 |
| Tabla 5.6 Demanda y costo de utilidades por lote de producción..... | 72 |
| Tabla 5.7 Costos fijos de operación..... | 73 |

| | |
|--|----|
| Tabla 5.8 Depreciación en los primeros seis años de operación | 74 |
| Tabla 5.9 Resultados del <i>scheduling</i> para los casos con distintas cantidades de fermentadores principales (FERM) y trenes de siembra (TS)..... | 77 |
| Tabla 5.10 Costo unitario de producción para los distintos casos..... | 79 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Pág. |
|--|------|
| Figura 2.1 Estructura química de la celulosa..... | 18 |
| Figura 2.2 Estructura química de la hemicelulosa..... | 19 |
| Figura 2.3 Estructura química de la lignina..... | 19 |
| Figura 2.4 Estructura de la materia lignocelulósica | 20 |
| Figura 2.5 Acción de las celulasas..... | 21 |
| Figura 3.1 Actividades enzimáticas del producto de la fermentación de <i>T. reesei</i> en los medios de cultivo A (rombo), B (cuadrado), C (triángulo) y D (círculo) | 32 |
| Figura 3.2 Resultados experimentales y computacionales para la concentración de células (triángulos), celulosa (círculos) y celulasas (cuadrados)..... | 38 |
| Figura 5.1 Actividad enzimática para distintas concentraciones iniciales de celulosa ... | 50 |
| Figura 5.2 Actividad enzimática para $S_0=65$ g/L | 50 |
| Figura 5.3 Actividad enzimática para $S_0=30$ g/L con la estrategia de alimentación A ... | 52 |
| Figura 5.4 Actividad enzimática para $S_0=30$ g/L con la estrategia de alimentación B ... | 53 |
| Figura 5.5 Actividad enzimática (azul) y concentración de sustrato (rojo) en distintos modos de operación: (a) batch, (b) estrategia de alimentación A, (c) estrategia de alimentación B | 53 |
| Figura 5.6 Crecimiento celular en los fermentadores de siembra | 57 |
| Figura 5.7 Condiciones de operación en el tren de siembra..... | 58 |
| Figura 5.8 Caudal máximo de operación en una centrífuga de discos según la fracción de sólidos en la mezcla | 60 |
| Figura 5.9 Agitador de paletas..... | 63 |
| Figura 5.10 Correlación de potencia para fluidos no newtonianos | 64 |
| Figura 5.11 Impulsor de tipo hélice marina..... | 64 |

| | |
|--|----|
| Figura 5.12 Correlación de potencia..... | 65 |
| Figura 5.13 Distribución de los costos de producción..... | 73 |
| Figura 5.14 <i>Scheduling</i> del proceso para el caso base..... | 75 |
| Figura 5.15 <i>Scheduling</i> del proceso para el caso con dos fermentadores..... | 75 |
| Figura 5.16 <i>Scheduling</i> del proceso para el caso con dos fermentadores principales y dos trenes de siembra | 76 |
| Figura 5.17 Costo unitario de producción según la producción anual de celulasas | 78 |
| Figura 5.18 Índices de rentabilidad (VAN y TIR) según la producción anual..... | 80 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | Pág. |
|---|------|
| Anexo 1: Cantidad de sulfato de amonio requerida para alcanzar la saturación deseada..... | 93 |
| Anexo 2: Diagrama de flujo del proceso propuesto | 94 |
| Anexo 3: Balance de materia del proceso propuesto..... | 95 |
| Anexo 4: Flujo de caja para el caso base..... | 98 |

RESUMEN

Se realizó el diseño de un proceso de producción de enzimas celulolíticas a escala industrial por fermentación sumergida utilizando bagazo de caña de azúcar como sustrato inductor y el hongo *Trichoderma reesei* como microorganismo productor. La etapa de fermentación fue seleccionada como el proceso central y se evaluaron distintas concentraciones iniciales de sustrato y estrategias de alimentación semibatch con el objetivo de determinar las mejores condiciones de operación para promover la producción enzimática. Se realizaron simulaciones del proceso de fermentación a concentraciones iniciales de sustrato entre 10 y 70 g/L y con distintos modos de operación a partir de modelos cinéticos de crecimiento y producción enzimática del microorganismo seleccionado. Se obtuvieron los mejores resultados al operar de manera semibatch con alimentaciones de bagazo a las 70 y 120 horas, alcanzando una actividad enzimática de 10 FPU/mL tras 180 horas de operación. A partir de estos resultados se dimensionó el fermentador principal y los fermentadores de siembra aguas arriba para el cultivo del microorganismo. De la misma manera, se establecieron consideraciones de diseño y las condiciones de operación para las unidades de separación de sólidos y concentración de enzimas por precipitación aguas abajo basadas en la composición final de la mezcla de fermentación, con el objetivo de obtener como producto final un cocktail enzimático concentrado con una actividad de 160 FPU/mL. Con base en el análisis económico del proceso propuesto para diferentes capacidades de producción se determinó la viabilidad del mismo a partir del costo unitario de producción y la tasa interna de retorno (TIR) tomando como referencia el remanente de bagazo de una biorrefinería en el norte del Perú con una capacidad de procesamiento de 4 300 toneladas diarias de caña de azúcar.

PALABRAS CLAVES:

Enzimas celulolíticas; Bagazo de caña de azúcar; Fermentación sumergida; Simulación cinética

ABSTRACT

DESIGN OF A CELLULOLYTIC ENZYMES PRODUCTION PROCESS FROM SUGARCANE BAGASSE

An industrial-scale cellulolytic enzymes production process by submerged fermentation was designed using sugarcane bagasse as the substrate and *Trichoderma reesei* as the producing microorganism. The fermentation step was selected as the main process and various substrate initial concentrations and fed batch strategies were analyzed in order to determine the best operating conditions to enhance enzymatic production. Starting from the microorganism growth and enzymatic production kinetic models, simulations of the fermentation process were run by varying the initial substrate concentration between 10 and 70 g/L and introducing different feeding regimes. The best results were obtained when feeding the substrate at 70 and 120 hours into the process, producing a mixture with an enzymatic activity of 10 FPU/mL after 180 hours of operation. The main and seed fermenters were designed from these results. Design considerations and operating conditions for the solids separation and enzyme concentration units were defined based on the composition of the final fermentation mixture in order to obtain a concentrated enzymatic cocktail with an activity of 160 FPU/mL. An economic analysis of the global process for increasing production capacities determined the feasibility to install a facility for cellulolytic enzymes production from sugarcane bagasse appended to a biorefinery located in northern Peru that processes 4 300 MT sugarcane per day.

KEYWORDS:

Cellulolytic enzymes; Sugarcane bagasse; Submerged fermentation; Kinetic simulation

INTRODUCCIÓN

Uno de los grupos de enzimas más importantes actualmente a escala industrial son las enzimas celulolíticas, una clase compuesta por distintas enzimas hidrolasas que actúan sinérgicamente y que ocupa más del 15% del mercado mundial de enzimas [1], mercado con un crecimiento anual acelerado de 4.7% y que se pronostica estará valorizado en US\$ 6.3 mil millones en 2021 [2]. La elevada demanda por estas enzimas se debe a su capacidad para degradar las fibras vegetales, lo cual resulta atractivo para una variedad de industrias. Entre las principales aplicaciones se encuentran la producción de papel, textiles, detergentes, alimentos y biocombustibles.

Entre las industrias mencionadas, una de las que se viene desarrollando más en los últimos años es la de los biocombustibles, debido a la búsqueda de una fuente alternativa de energía para reemplazar a los combustibles fósiles y así reducir las emisiones de contaminantes. Sin embargo, una de las principales limitaciones económicas del proceso de producción de bioetanol es el alto costo de las enzimas celulolíticas requeridas para la descomposición de la biomasa vegetal, el cual se encuentra entre US\$ 0.30 y US\$ 0.40 por galón de combustible y representa aproximadamente el 35% del costo de producción [3]. Por este motivo resulta necesario encontrar nuevas tecnologías y materias primas a precios competitivos para la producción de estas enzimas de elevado valor en la industria.

El proceso de producción de enzimas a partir de biomasa consiste en la secreción de las enzimas de interés por parte de determinadas especies de hongos utilizando la biomasa como sustrato bajo condiciones controladas de temperatura, pH y nutrientes. Entre los distintos tipos de biomasa, se considera que la materia lignocelulósica es la que posee el mayor potencial para la producción de enzimas celulolíticas debido a su composición rica en carbohidratos complejos como la celulosa y hemicelulosa. Esta incluye principalmente residuos agrícolas que usualmente son quemados, de manera que no se aprovecha su potencial como materia prima industrial y además se liberan gases y partículas contaminantes a la atmósfera [1]. En el caso de las biorrefinerías de caña de azúcar, uno de los residuos lignocelulósicos más abundantes es el bagazo que se obtiene en la molienda para la extracción de molasas. Se calcula que por cada tonelada de caña

se generan 280 kg de bagazo, de los cuales aproximadamente el 60% se utiliza para generar energía para la planta y el resto se desecha [4]. Una de las mayores productoras de bioetanol en el escenario peruano es Sucroalcolera del Chira S.A. ubicada en Piura, la cual procesa 4 300 toneladas diarias de caña de azúcar y produce 370 mil litros diarios de etanol [5]. Debido al alto potencial del bagazo de caña como fuente de carbono para la producción enzimática y a la disponibilidad de este residuo en Perú, resulta de gran importancia investigar su uso para producir enzimas de alto valor de manera que se optimice el uso de los recursos y se logre un proceso más económico a través de la integración industrial.

Considerando la importancia y el valor de estas enzimas en la industria, el objetivo de esta investigación es proponer un proceso de producción de enzimas celulolíticas usando bagazo de caña de azúcar como agente inductor. Como primera etapa para el diseño de este proceso se definió la capacidad de producción según la disponibilidad de la materia prima y las características que se desean en el producto final. Una vez definida la capacidad, se llevó a cabo la simulación de la cinética de la producción enzimática en Matlab para obtener las condiciones de operación más adecuadas para el biorreactor de fermentación. Luego, se realizaron los balances de materia y energía de las operaciones aguas arriba y aguas debajo de la fermentación. Por último, se realizó la evaluación económica del proceso propuesto para determinar el costo unitario de las enzimas producidas y compararlo con los precios actuales y los calculados en investigaciones previas donde no se tomó en cuenta la cinética de la fermentación [6] [7].

En el primer capítulo del presente trabajo se definen el objetivo general y los objetivos específicos para lograr la ejecución del primero. En el segundo capítulo se define el marco teórico base para el desarrollo de la investigación. En el tercer capítulo se presentan los principales antecedentes a esta investigación, donde se incluyen resultados de reportes técnico-científicos de producción enzimática a partir de bagazo de caña a escala de laboratorio y en biorreactores a escala piloto, así como las operaciones de concentración de las enzimas por precipitación y modelos matemáticos y simulaciones del proceso de fermentación. En el cuarto capítulo se describe la metodología que se siguió para el desarrollo del presente trabajo. En el quinto capítulo se presentan los resultados de la investigación con respecto al estudio de la cinética de la fermentación, el diseño del proceso y la evaluación económica del mismo. Finalmente, se plantean

recomendaciones para trabajos a futuro y se presentan las conclusiones de la investigación.

CAPÍTULO I

OBJETIVOS

1.1 Objetivo general

- Diseñar un proceso para la producción de enzimas celulolíticas por fermentación sumergida utilizando el bagazo de caña de azúcar como sustrato e inductor de enzimas

1.2 Objetivos específicos

- Simular los modelos matemáticos que caracterizan la cinética de la producción enzimática por fermentación sumergida en Matlab
- Determinar los parámetros de operación que permiten obtener la mayor producción enzimática a través de la simulación de la fermentación sumergida
- Realizar el dimensionamiento de los equipos principales a partir de los balances de materia y energía del proceso
- Evaluar la viabilidad económica del proceso propuesto a través del costo unitario calculado por kg de proteína y la tasa interna de retorno para distintas capacidades de producción

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Materia lignocelulósica

Se conoce como materia lignocelulósica a la biomasa cuyos componentes principales son celulosa, hemicelulosa y lignina. Estos materiales tienen una estructura polimérica compleja con cuatro tipos de enlaces importantes: enlaces éster entre la lignina y la celulosa y hemicelulosa, enlaces éter entre los grupos funcionales, enlaces de hidrógeno entre las cadenas de celulosa y enlaces C-C en los anillos aromáticos [8].

2.1.1 Celulosa

La celulosa, $(C_6H_{10}O_5)_n$, es el componente principal de la materia lignocelulósica, representando aproximadamente el 50% de esta. Este polisacárido de estructura cristalina está compuesto por cadenas de monómeros de glucosa unidas entre ellas por enlaces de hidrógeno (Figura 2.1). La celulosa forma parte importante del soporte estructural de las plantas [8].

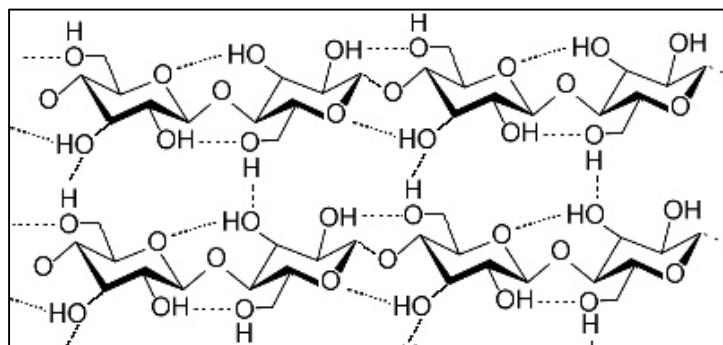


Figura 2.1 Estructura química de la celulosa. Fuente: Dynamic Science. Chemistry of Cellulose and Ironing [9].

2.1.2 Hemicelulosa

La hemicelulosa, $(C_5H_8O_4)_n$, es un carbohidrato similar a la celulosa con la distinción de que en su composición se pueden encontrar pentosas como xilosa y

arabinosa. A diferencia de la celulosa, que es un polímero lineal, la hemicelulosa presenta ramificaciones en su estructura (Figura 2.2).

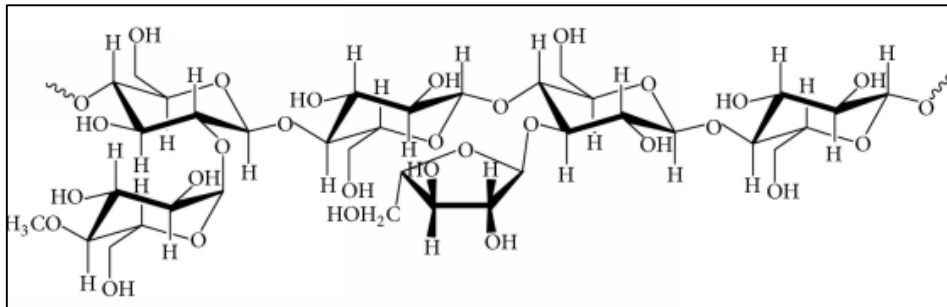


Figura 2.2 Estructura química de la hemicelulosa. Fuente: H. V. et al. Conversion of Lignocellulosic Biomass to Nanocellulose: Structure and Chemical Process [10].

2.1.3 Lignina

La lignina, $(C_9H_{10}O_3(OCH_3)_{0.9-1.7})_n$, es un polímero amorfo compuesto principalmente por guaiacol y siringol (Figura 2.3) que ocupa los intersticios de la matriz celulósica. Representa aproximadamente el 20% de la materia lignocelulósica y es considerada el inhibidor más importante para la utilización de la biomasa en aplicaciones como la producción de azúcares debido a que dificulta el acceso a la celulosa y hemicelulosa [11].

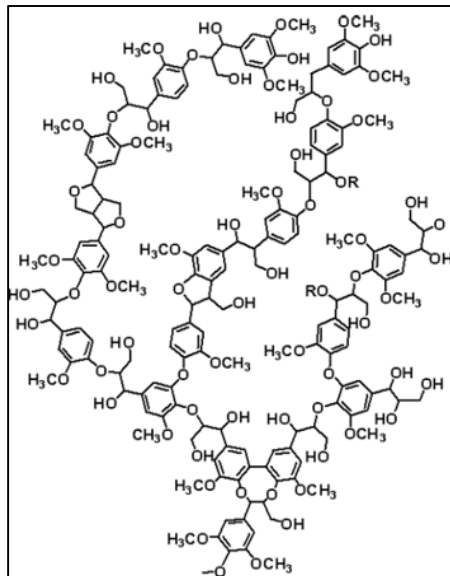


Figura 2.3 Estructura química de la lignina. Fuente: Lignoworks. What is Lignin? [12].

En la Figura 2.4 se muestra una representación de la estructura de la materia lignocelulósica donde se observa cómo los polímeros mencionados anteriormente se encuentran ordenados espacialmente.

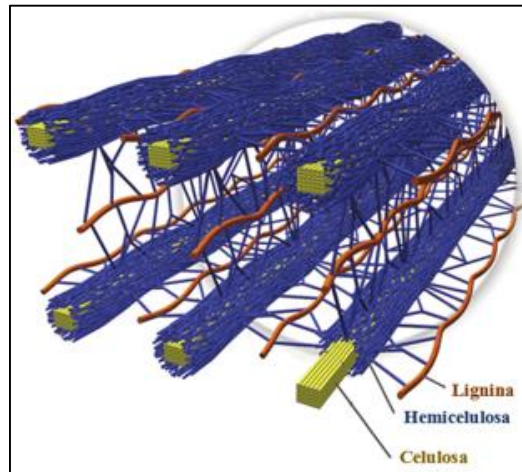


Figura 2.4 Estructura de la materia lignocelulósica. Fuente: Adaptado de A. Brandt et al. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. [13].

2.2 Pretratamientos para el bagazo de caña de azúcar

Para que la fermentación del bagazo de caña sea interesante desde el punto de vista de procesamiento, es necesario que su matriz sea desestructurada a través de la aplicación de un tratamiento previo para reducir el contenido de lignina y para así liberar los carbohidratos en su composición y facilitar el acceso de las enzimas [11]. Para que el pretratamiento sea eficiente debe contar con las siguientes características: (1) debe incrementar la accesibilidad al sustrato, (2) debe minimizar la pérdida de azúcares potenciales, (3) debe prevenir la formación de compuestos que inhiban la acción de las enzimas y (4) debe ser técnica y económicamente viable.

En los últimos años se han desarrollado diversos tipos de pretratamientos con este fin, destacando entre ellos los térmicos y los químicos [14]. Entre los pretratamientos térmicos, el de explosión de vapor es ampliamente utilizado debido a que no requiere la adición de insumos químicos para incrementar la accesibilidad de la biomasa [15]. Este proceso se lleva a cabo en reactores a alta presión con el objetivo de lograr la permeación del vapor saturado en la biomasa para hidrolizar y solubilizar la hemicelulosa y lignina, y así removerlas de la estructura celulósica e incrementar la porosidad del material.

El pretratamiento químico más común para el bagazo de caña es la hidrólisis alcalina. Este consiste en tratar la biomasa con una base fuerte, usualmente soda cáustica, a altas temperaturas para promover la ruptura de los enlaces éster entre la lignina y la matriz celulósica y al mismo tiempo solubilizar la lignina [8].

2.3 Enzimas celulolíticas

2.3.1 Clasificación

Las enzimas celulolíticas o celulasas, biocatalizadores para la conversión de carbohidratos lignocelulósicos en azúcares simples, constituyen un complejo multienzimático que incluye tres componentes principales: endoglucanasa (EG), exoglucanasa o celobiohidrolasa (CBH) y β -glucosidasa (BGL). El mecanismo de descomposición de la celulosa inicia con la hidrólisis de los enlaces β -1,4 del polímero por parte de la EG, creando extremos reductores y no reductores. Luego la CBH rompe las cadenas del lado de los extremos reductores liberando celobiosas. Finalmente, la celobiosa es hidrolizada y convertida en glucosa por la BGL [16]. La acción de estas tres enzimas se ilustra en la Figura 2.5.

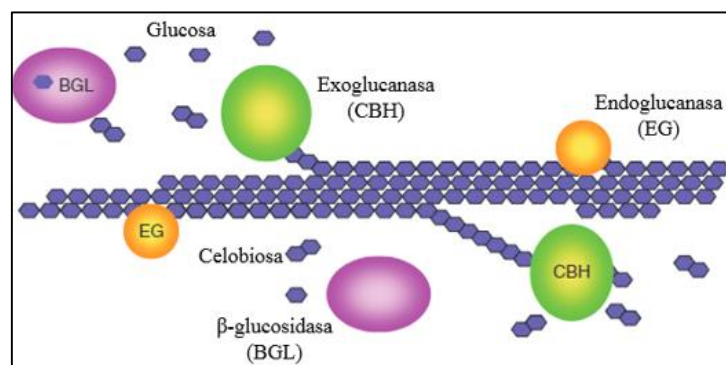


Figura 2.5 Acción de las celulasas. Fuente: Adaptado de R. R. Singhania. Cellulolytic Enzymes [14].

Para asegurar una descomposición eficiente de la materia lignocelulósica, es necesario contar con estas tres enzimas ya que estas actúan de manera sinérgica para degradar los polímeros presentes en la biomasa [16].

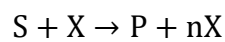
2.3.2 Unidades de medida para actividad celulolítica

El contenido enzimático de una mezcla se mide en función a la unidad de actividad enzimática (U), definida como la cantidad de sustrato convertido a azúcares reductores por unidad de tiempo ($\mu\text{mol}/\text{min}$). Usualmente se expresa la actividad enzimática como U/mg de proteínas (actividad específica) o U/mL de solución [17]. La determinación experimental de la actividad enzimática requiere el uso de distintos sustratos según la enzima que se desea cuantificar. Los sustratos más comúnmente utilizados para la medición de las actividades enzimáticas de EG, CBH y BGL son CMC (carboximetilcelulosa), Avicel y *p*NPG (*p*-nitrofenilglucopiranosido) respectivamente [18].

Generalmente resulta de mayor interés cuantificar la actividad total de celulasas, para lo cual se utiliza papel de filtro como sustrato. El resultado de esta medición se conoce como actividad de papel de filtro o FPA (*filter paper activity*) y se expresa en FPU/mL, unidad que indica las micromoles de equivalentes de glucosa liberados por minuto de 50 mg de papel de filtro Whatman N°1. La actividad total de celulosa es también conocida como FPasa. De manera similar, la actividad de EG es cuantificada utilizando CMC como sustrato y también es conocida como CMCasa [18].

2.4 Cinética del crecimiento celular para producción enzimática

La reproducción celular es la respuesta natural de las células a su entorno, lo cual da como resultado el crecimiento y la replicación de las células. Bajo las condiciones adecuadas de nutrientes o sustratos (S), una cantidad inicial de células (X) se reproducirá dando como resultado una variedad de productos (P) y un mayor número de células (nX) [19]. Esto está representado por la reacción:



La tasa de crecimiento de las células se caracteriza por la velocidad específica neta de crecimiento celular (μ_n), que se define como:

$$\mu_n = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde *X* es la concentración de células en g/L y *t* es el tiempo en h.

Esta también se puede expresar como la diferencia entre la tasa de crecimiento μ_g (h^{-1}) y la tasa de muerte celular k_d (h^{-1}).

$$\mu_n = \mu_g - k_d \quad (\text{Ec. 2})$$

Es importante notar que, si bien los parámetros de la ecuación 2 son independientes de X , a partir de la ecuación 1 se observa que el cambio neto en la cantidad de células (dX/dt) sí depende de la cantidad de células en el cultivo según:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_n X = \mu_g X - k_d X$$

La tasa de crecimiento celular μ_g se puede modelar a través de la ecuación de Monod (Ec. 3), la cual describe la dependencia de la concentración del sustrato (S).

$$\mu_g = \frac{\mu_m S}{K_S + S} \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde μ_m es la velocidad específica de crecimiento máxima (h^{-1}) y K_S es la constante de Monod (g/L).

A elevadas concentraciones de células, sustrato o producto en el medio, el crecimiento celular puede verse reprimido por uno de estos factores o por una combinación de ellos, lo cual resulta en los distintos modelos de crecimiento presentados en las ecuaciones 4-6 [19].

1. Represión celular:

$$\mu_g = \mu_m \left(\frac{S}{K_S + S} \right) \left(1 - \frac{X}{X_m} \right)^r \quad (\text{Ec. 4})$$

2. Represión de sustrato:

$$\mu_g = \frac{\mu_m}{\left(1 + \frac{K_S}{S} \right) \left(1 + \frac{S}{K_I} \right)} \quad (\text{Ec. 5})$$

3. Represión de producto:

$$\mu_g = \frac{\mu_m}{\left(1 + \frac{K_S}{S} \right) \left(1 + \frac{P}{K_P} \right)} \quad (\text{Ec. 6})$$

Donde X_m es la concentración máxima de células (g/L), r es el exponente de represión celular, K_I es la constante de represión de sustrato y K_P es la constante de inhibición de producto.

El modelo de crecimiento celular más adecuado para describir la interacción entre un organismo y el medio debe ser determinado de manera experimental y puede resultar en una combinación de los modelos presentados anteriormente.

Otro parámetro de importancia para el modelamiento del crecimiento celular es el coeficiente de rendimiento $Y_{X/S}$. Este se define como la relación entre el crecimiento celular y el consumo de sustrato [19]:

$$Y_{X/S} = -\frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (\text{Ec. 7})$$

2.5 Producción enzimática

La velocidad de producción de enzimas u otras sustancias por parte de las células (q_P) puede ser modelada de tres formas según su dependencia del crecimiento celular (Ec. 8-10) [19]:

1. Asociado al crecimiento

$$q_P = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} = Y_{P/X} \mu_g \quad (\text{Ec. 8})$$

2. No asociado al crecimiento

$$q_P = \beta = \text{constante} \quad (\text{Ec. 9})$$

3. Mixto

$$q_P = \alpha \mu_g + \beta \quad (\text{Ec. 10})$$

Donde α (adimensional) y β (1/h) son constantes para la producción enzimática.

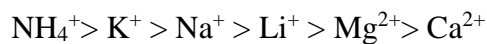
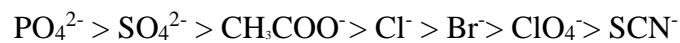
De manera análoga al crecimiento celular, la producción de enzimas también puede sufrir de represión celular, de sustrato o de producto, lo cual determinará el modelo a utilizar.

2.6 Concentración de las enzimas por precipitación

La adición de sales u otro electrolito a una solución compuesta por diversas proteínas incrementa la fuerza iónica del medio y la solubilidad de proteínas específicas, lo cual se conoce como *salting in*. Sin embargo, cuando la concentración de sales supera cierto umbral ocurre el efecto inverso y las proteínas tienden a precipitar, lo que se conoce como *salting out*. Este es el principio del proceso de concentración de proteínas por precipitación [20].

La sal utilizada para este proceso es generalmente sulfato de amonio, el cual se agrega como sólido o como solución saturada. El amplio uso de este compuesto se debe a su bajo costo, alta solubilidad y a que sus iones se encuentran en los extremos de la serie de Hofmeister para la capacidad de precipitar proteínas [20].

Serie de Hofmeister para aniones y cationes:



Diferentes proteínas precipitan en diferentes rangos de concentración de sales, por lo cual este principio es útil para fraccionar soluciones que contienen una diversidad de proteínas. El método consiste en agregar sulfato de amonio u otra sustancia hasta una concentración determinada para precipitar las proteínas no deseadas, recuperar el sobrenadante y agregar nuevamente el electrolito para precipitar y recuperar la proteína de interés [20].

CAPÍTULO III

ESTADO DEL ARTE

3.1 Producción de enzimas celulolíticas

Las actividades enzimáticas reportadas en esta sección fueron determinadas según lo descrito en la sección 2.3.2.

3.1.1 A partir de residuos agrícolas

Entre los distintos tipos de biomasa, se considera que la materia lignocelulósica es la que posee el mayor potencial como sustrato para la producción de enzimas de interés industrial debido a su composición rica en celulosa y hemicelulosa [1]. Bajo esta premisa, en los últimos años se han realizado numerosos estudios con el objetivo de evaluar la actividad enzimática del producto de la fermentación de la biomasa por parte de hongos filamentosos, principalmente de los géneros *Aspergillus* y *Trichoderma*.

En una investigación realizada por Rana et al. en 2014 [21], se cultivaron hongos *Trichoderma reesei* RUT-C30 y *Aspergillus saccharolyticus* en un biorreactor por 7 días a 28°C y a un pH de 4.0 y 4.8 respectivamente utilizando paja de maíz pretratada por explosión de vapor (SE) como fuente de carbono, con el objetivo de determinar la actividad enzimática de la solución obtenida al final del proceso. La solución producida por la fermentación con *T. reesei* mostró una actividad de FPasa de 4.49 FPU/mL, una actividad CMCasa de 20.60 U/mL y una actividad de BGL de 4.77 U/mL. Estos resultados indicaron que la producción de BGL por parte de hongos del género *Trichoderma* es baja, como indica la literatura. Ante esto, los autores sugieren implementar un sistema de ciclos de temperatura y pH para incrementar la producción de BGL en cultivos de *T. reesei*. Por otro lado, la solución obtenida de la fermentación con *A. saccharolyticus* presentó una actividad de BGL de 339.90 U/mL. Con base en este resultado, los autores plantean dos alternativas: (1) cultivar ambos hongos de manera conjunta, advirtiendo que las condiciones de cultivo de cada especie pueden diferir o (2) agregar BGL producida por *A. saccharolyticus* a la solución enzimática producida por *T. reesei*. En el mismo estudio se comparó la eficiencia de la solución enzimática producida

por los autores con una solución comercial y se observó una similar conversión de azúcares por hidrólisis enzimática, por lo cual se concluyó que el cocktail de enzimas producido a partir de paja de maíz mostró una alta eficiencia.

La Tabla 3.1 resume los resultados de los estudios mencionados anteriormente, así como las actividades enzimáticas reportadas en las investigaciones de Saqib et al. [22], Singh et al. [23], Jahdav et al. [24] y Kocher et al. [25] producto de la fermentación de diversos tipos de residuos agrícolas como sustrato. De estos resultados es posible concluir que los residuos agrícolas tienen un gran potencial para ser utilizados como sustratos para la obtención de enzimas celulolíticas. Asimismo, es posible combinar enzimas producidas por distintas especies de hongos para obtener cocktails con actividades elevadas que sean viables para ser utilizados a escala industrial.

| Género | Especie | Sustrato | FPasa (FPU/mL) | CMCasa (U/mL) | BGL (U/mL) | Referencia |
|--------------------|------------------------|--------------------|-------------------|------------------|---------------|------------|
| <i>Aspergillus</i> | <i>fumigatus</i> | Paja de arroz | - | 321 | - | [22] |
| | <i>heteromorphus</i> | Paja de arroz | 13.05 | - | - | [23] |
| | <i>niger</i> | Cáscara de arroz | 12.2 | 10.9 | - | [24] |
| | <i>niger</i> | Cáscara de plátano | 12.4 | 11.3 | - | [24] |
| | <i>saccharolyticus</i> | Paja de maíz | - | - | 0.34 | [21] |
| <i>Trichoderma</i> | <i>harzianum</i> | Paja de arroz | 0.08 | 0.1 | 0.39 | [25] |
| | <i>reesei</i> QM9414 | Paja de arroz | 0.05 | 0.15 | 0.27 | [25] |
| | <i>reesei</i> RUT-C30 | Paja de maíz | 4.49 | 20.6 | 4.77 | [21] |

Tabla 3.1 Actividades enzimáticas del producto de la fermentación de residuos agrícolas con hongos filamentosos de los géneros *Aspergillus* y *Trichoderma*. Fuente: Elaboración propia.

3.1.2 A partir de bagazo de caña de azúcar

Uno de los residuos agrícolas que presenta el mayor potencial a nivel nacional para ser utilizado como sustrato para la obtención de enzimas celulolíticas es el bagazo de caña de azúcar, por lo cual este ha sido estudiado extensivamente en los últimos años. Perú es un país productor de caña de azúcar (11 mil toneladas procesadas en 2019 [5]) y por lo tanto el bagazo de caña se encuentra altamente disponible en el país, lo que lo convierte en una materia prima de gran interés para esta investigación.

Florencio et al. [26] investigaron la producción de enzimas celulolíticas en la fermentación del bagazo de caña crudo y el bagazo de caña pretratado por explosión de vapor (SE). Asimismo, en el estudio se evaluaron dos métodos de fermentación: fermentación sumergida y fermentación secuencial. La última combina la fermentación sumergida con una etapa previa de fermentación en estado sólido para promover la producción enzimática. La fermentación en estado sólido escapa del alcance de esta tesis debido a las dificultades que presenta para ser llevada a escala industrial y la escasez de modelos cinéticos disponibles para el sistema heterogéneo, por lo cual a continuación solo se analizan los resultados de la fermentación sumergida.

Para comparar el efecto del pretratamiento del bagazo, los cultivos se realizaron con *T. reesei* RUT-C30 a 30°C por 72 horas. Los autores lograron determinar que la actividad de CMCasa incrementó desde 159 U/L hasta 650 U/L cuando se realizó el cultivo con bagazo de caña pretratado a comparación del cultivo con bagazo de caña sin pretratamiento. Esto comprueba la importancia de un tratamiento previo de la biomasa para facilitar la accesibilidad al sustrato y así obtener una mayor producción de enzimas. Posteriormente, en el mismo estudio se analizó la producción de distintas enzimas por parte de tres especies de hongos *Trichoderma* sobre bagazo de caña pretratado.

Los resultados obtenidos (Tabla 3.2) muestran que se logró obtener elevadas actividades para una variedad de enzimas por parte de las tres especies de hongo cuando se utilizó el bagazo de caña pretratado como sustrato, lo cual resalta la importancia de partir de una materia prima pretratada para alcanzar una mayor eficiencia en la producción de enzimas.

| Especie | FPasa (FPU/L) | CMCasa (U/L) | BGL (U/L) |
|----------------------------|--------------------------|-------------------------|----------------------|
| <i>T. reesei</i> RUT-C30 | 5.2 | 649.7 | 6.3 |
| <i>T. harzianum</i> P49P11 | 21.2 | 619.4 | 26.1 |
| <i>T. INPA</i> 666 | 5.3 | 619.4 | 11.9 |

Tabla 3.2 Actividades enzimáticas del producto de la fermentación sumergida del bagazo de caña pretratado por SE con tres especies de *Trichoderma*. Fuente: Adaptado de C. Florencio et al. Validation of a Novel Sequential Cultivation Method for the Production of Enzymatic Cocktails from *Trichoderma* Strains [26].

El bagazo de caña pretratado por SE también fue utilizado por Gottschalk et al. [27] como sustrato para la producción de enzimas con *T. reesei* y *A. awamori*. Tras 7 días de incubación a 30°C, se filtraron las muestras y se midió la actividad de diversas enzimas obtenidas en cada una (Tabla 3.3).

| Enzimas | FPasa (FPU/L) | CMCasa (U/L) | BGL (U/L) |
|-----------------------------------|----------------------|---------------------|------------------|
| <i>T. reesei</i> | 1 700 | 20 000 | 340 |
| <i>A. awamori</i> | 420 | 4 900 | 45 600 |
| 25/75 <i>T. reesei/A. awamori</i> | 1 550 | 16 820 | 32 790 |
| 40/60 <i>T. reesei/A. awamori</i> | 1 900 | 22 160 | 27 760 |
| 50/50 <i>T. reesei/A. awamori</i> | 2 120 | 23 550 | 22 790 |
| 60/40 <i>T. reesei/A. awamori</i> | 2 340 | 25 490 | 19 380 |
| 75/25 <i>T. reesei/A. awamori</i> | 1 390 | 31 300 | 12 090 |

Tabla 3.3 Niveles de FPasa, CMCasa y BGL en las soluciones concentradas de enzimas de *A. awamori* y *T. reesei* y en los cocktails de enzimas. Fuente: Adaptado de L. M. F. Gottschalk et al. Cellulases, xylanases, β -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse [27].

En un estudio llevado a cabo por Cunha et al. en 2015 [15] se comparó la producción de enzimas celulolíticas por parte de tres especies de *Aspergillus* sobre bagazo de caña pretratado por explosión de vapor (SE) y por agua caliente (LHW), con el objetivo de determinar las diferencias en las actividades enzimáticas del producto obtenido de cada proceso. En todos los casos, la fermentación se llevó a cabo a 32°C por 72 horas. Los resultados se muestran en la Tabla 3.4.

| Especie | CMCasa (U/mL) | | BGL (U/mL) | |
|------------------------|----------------------|-----|-------------------|------|
| | SE | LHW | SE | LHW |
| <i>A. niger</i> A12 | 1.6 | 1.3 | 0.8 | 3.8 |
| <i>A. niger</i> 3T5B8 | 1.4 | 0.9 | 1.25 | 3.0 |
| <i>A. oryzae</i> P27C3 | 0.4 | 0.2 | 0.1 | 0.15 |

Tabla 3.4 Actividades enzimáticas del producto de la fermentación del bagazo de caña pretratado por explosión de vapor (SE) y agua caliente (LHW) con tres especies de *Aspergillus*. Fuente: Adaptado de F. M. Cunha et al. Liquid Hot Water and Steam Explosion Pretreatment of Sugarcane Bagasse for Enzyme Production by a Sequential Solid-State and Submerged Method [15].

Los resultados mostraron que el pretratamiento por SE favoreció a la producción de CMCasa, mientras que el pretratamiento por LHW favoreció a la producción de BGL. La especie que mostró la mayor producción de enzimas fue *A. niger* A12 pretratada por LHW, mientras que *A. oryzae* mostró una producción mínima. Los autores sugieren la posibilidad de que la producción de enzimas por parte de esta especie se vea inhibida por algunos productos liberados durante el pretratamiento [15].

Los resultados mencionados previamente se resumen en la Tabla 3.5 junto a las actividades enzimáticas determinadas en estudios similares por Cunha et al. [28] y Delabona et al. [29].

| Género | Especie | Pretratamiento | FPasa (FPU/mL) | CMCasa (U/mL) | BGL (U/mL) | Referencia |
|--------------------|-------------------------|----------------|----------------|---------------|------------|------------|
| <i>Aspergillus</i> | <i>awamori</i> | SE | 0.42 | 4.9 | 45.6 | [27] |
| | <i>niger</i> A12 | - | - | 8.24 | - | [28] |
| | <i>niger</i> A12 | SE | - | 1.6 | 0.8 | [28] |
| | <i>niger</i> A12 | LHW | - | 1.3 | 3.8 | [15] |
| | <i>niger</i> 3T5B8 | SE | - | 1.4 | 1.25 | [15] |
| | <i>niger</i> 3T5B8 | LHW | - | 0.9 | 3.0 | [15] |
| | <i>oryzae</i> | SE | - | 0.4 | 0.1 | [15] |
| | <i>oryzae</i> | LHW | - | 0.2 | 0.15 | [15] |
| <i>Trichoderma</i> | <i>harzianum</i> P49P11 | SE | 21.2 | 0.62 | 2.61 | [26] |
| | <i>harzianum</i> P49P11 | SE | 0.78 | - | 9.18 | [29] |
| | <i>harzianum</i> P49P11 | DSE | 0.50 | - | 1.21 | [29] |
| | INPA 666 | SE | 5.3 | 0.62 | 11.9 | [26] |
| | <i>reesei</i> RUT-C30 | SE | 1.7 | 2.0 | 0.34 | [27] |
| | <i>reesei</i> RUT-C30 | - | - | 0.16 | - | [26] |
| | <i>reesei</i> RUT-C30 | SE | 5.2 | 0.65 | 6.3 | [26] |

Tabla 3.5 Actividades enzimáticas del producto de la fermentación del bagazo de caña con hongos filamentosos de los géneros *Aspergillus* y *Trichoderma* (SE: explosión de vapor, LHW: tratamiento por agua caliente, DSE: explosión de vapor y delignificación con NaOH). Fuente: Elaboración propia.

Con base en los estudios mencionados, se concluyó que esta investigación estaría enfocada en la fermentación sumergida del bagazo de caña pretratado por SE utilizando hongos *T. reesei*. La especie de hongo mencionada presentó altas actividades enzimáticas en el producto de la fermentación en diversas investigaciones, por lo cual se considera que es una de las especies con mayor viabilidad para ser utilizada en este proceso.

3.2 Tipos de biorreactores para producción enzimática por fermentación sumergida

3.2.1 Reactor de tanque agitado (STR)

En un estudio de 2008, Ahamed y Vermette [30] evaluaron la productividad volumétrica de las enzimas producidas por *T. reesei* RUT-C30 en cuatro medios distintos en un STR en operación semi batch por 6 días. Los medios utilizados fueron: (1) celulosa + extracto de levadura, (2) licor de maíz + glucosa, (3) celulosa + extracto de levadura + peptona y (4) celulosa + base nitrogenada de levadura + carboximetilcelulosa (CMC). Luego de 48 horas de cultivo, se agregaron en total 3 L de una solución de lactosa y ácido lactobiónico en períodos de 2 horas durante 3 días para inducir a la producción de enzimas. El biorreactor utilizado contaba con sistemas de monitoreo y controles de agitación, pH, temperatura, aireación y formación de espuma. La temperatura se mantuvo en 30°C y la agitación en 250 rpm. El porcentaje de oxígeno disuelto (%OD) se mantuvo por encima del 20% de saturación de aire por medio de una aireación de 5 L/min. El pH del medio se fijó en 4.8 y las variaciones fueron compensadas por la adición de HCl o NaOH de manera automática. Finalmente, la formación de espuma se controló agregando un agente antiespumante de silicona automáticamente. El control de estos parámetros es de gran importancia ya que desviaciones significativas pueden inhibir la producción de celulasas por parte de *T. reesei* resultando en una menor productividad.

El medio de cultivo A mostró ser el más eficiente, ya que se obtuvo una productividad volumétrica de 69.8 U/L.h. Por otro lado, la productividad de los medios de cultivo B, C y D fue de 19.9, 31.2 y 18.9 U/L.h. Las actividades enzimáticas de papel de filtro y de CMCasa de las soluciones incrementaron de manera notable a partir de las 48 horas de cultivo (Figura 3.1), lo cual indica que la lactosa es un buen inductor para la producción de enzimas celulolíticas por parte de *T. reesei* [30].

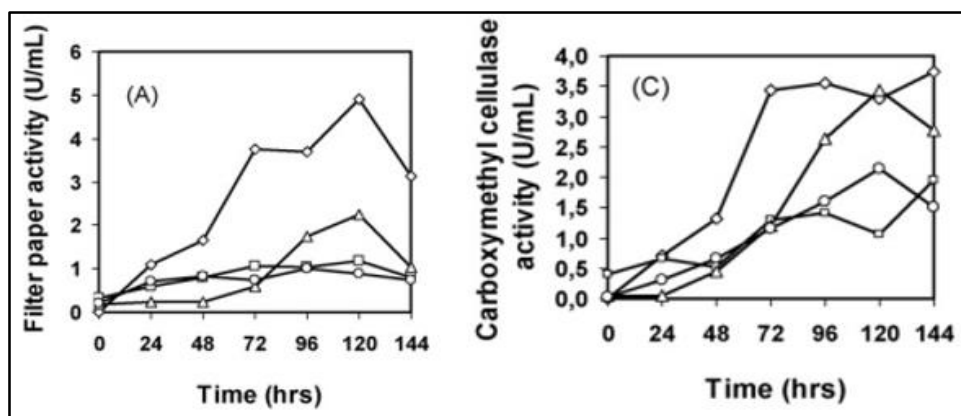


Figura 3.1 Actividades enzimáticas del producto de la fermentación de *T. reesei* en los medios de cultivo A (rombo), B (cuadrado), C (triángulo) y D (círculo). Fuente: A. Ahamed y P. Vermette. Enhanced enzyme production from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* LMA grown as fed batch in a stirred tank bioreactor [30].

En un estudio similar por parte de Ahamed y Vermette [31], se cultivó *A. niger* bajo las mismas condiciones que en [30], obteniéndose una productividad volumétrica de 47.7 U/L.h. Posteriormente, se co-cultivó *T. reesei* con *A. niger* en igual proporción bajo las mismas condiciones para analizar la sinergia entre las enzimas producidas por ambas especies de manera conjunta. La productividad medida en el co-cultivo fue de 98.4 U/L.h, que corresponde a 41% y 210% más que las del cultivo de *T. reesei* y *A. niger* respectivamente. Este hallazgo concuerda con lo observado por Gottschalk et al. en [27].

La investigación de Delabona et al. [29] también incluyó el escalamiento del proceso hacia un biorreactor STR a escala piloto. La temperatura del medio se fijó en 29°C, el %OD se mantuvo por encima del 30% de saturación por medio de un sistema de control de aireación y la formación de espuma fue controlada utilizando un agente antiespumante de polipropilenglicol. Se llevaron a cabo tres series de experimentos: a pH 5.0, a pH 6.0 y a pH variable entre 5.0 y 6.0. El pH fue ajustado agregando H₂SO₄ y NH₄OH según fuera necesario.

Las actividades de celulasa obtenidas se muestran en la Tabla 3.6. El método de pH variable no mostró una mejora significativa en cuanto a la producción de enzimas por parte de *T. harzianum*. De igual manera, no se observó una diferencia importante entre los resultados a pH 5.0 y pH 6.0, pero los autores sugieren operar a pH 5.0 para prevenir la contaminación bacteriana [29]. Por último, se realizó el cultivo de *T. harzianum* a pH 5.0 bajo las condiciones mencionadas anteriormente y agregando sacarosa al medio. La presencia de la sacarosa como fuente adicional de carbono incrementó la productividad

de la fermentación del bagazo SE de 10.1 a 11.5 FPU/L.h y del bagazo DSE de 11.1 a 16.8 FPU/L.h, demostrando que la adición de sacarosa al medio de cultivo incrementó la producción de enzimas por parte de *T. harzianum*.

| Pretratamiento | pH | FPasa (FPU/mL) |
|----------------|----------|----------------|
| SE | 5.0 | 0.73 |
| | 6.0 | 0.80 |
| | Variable | 0.57 |
| DSE | 5.0 | 0.80 |
| | 6.0 | 0.95 |
| | Variable | 0.98 |

Tabla 3.6 Actividad de celulasa del producto de la fermentación del bagazo de caña a diferentes condiciones de pH. Fuente: Adaptado de P. da S. Delabona et al. Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production [29].

3.2.2 Reactor de columna de burbujas

Para poder determinar la viabilidad del uso de un reactor de columna de burbujas para la fermentación del bagazo de caña con *A. niger*, Cunha et al. [28] llevaron a cabo este proceso por 30 horas a 32°C con un flujo de aire de 4 vvm (volumen de aire a condiciones estándar por volumen de líquido por minuto) para mantener el %OD por encima del 25% de saturación. Los resultados mostraron que al llevarse a cabo la fermentación en un reactor de columna de burbujas, la productividad volumétrica incrementó hasta 19 U/L.h en comparación con la productividad de 13 U/L.h obtenida en la prueba a menor escala en un recipiente con agitación mecánica. Los autores plantean que este incremento se debe a que la agitación neumática en el reactor de la columna de burbujas promueve el contacto entre las fases, aumentando así la transferencia de masa y la disponibilidad de oxígeno para el crecimiento de los microorganismos.

3.2.3 Reactor airlift

Con el objetivo de comparar los resultados obtenidos para la fermentación con *T. reesei* en un biorreactor STR en [30], Ahamed y Vermette [32] condujeron el mismo experimento empleando un reactor airlift bajo las mismas condiciones de pH (4.8), temperatura (30°C) y aireación (%OD > 20% de saturación). Se utilizó el mismo sistema

de control de pH y formación de espuma que en [30]. Para tomar en cuenta el efecto de la agitación mecánica, se realizó una serie de experimentos con agitación neumática y otra con agitación neumática y mecánica (400 rpm) en simultáneo.

Los resultados mostraron que la fermentación sin agitación mecánica presentó una mayor actividad de celulasa (17 FPU/mL) que la fermentación con agitación mecánica (12 FPU/mL). De manera similar, la productividad volumétrica sin agitación (200 FPU/L.h) fue mayor que la productividad con agitación (147 FPU/L.h). Los autores atribuyen esta diferencia al efecto que tiene la agitación mecánica sobre la morfología de *T. reesei*. El esfuerzo cortante que genera la agitación mecánica altera la morfología de los hongos de tal forma que disminuyen las ramificaciones y la elongación de las células, reprimiendo así la secreción de enzimas [32]. En comparación con los resultados de [30] para un biorreactor STR, el reactor airlift mostró una mejora importante en la productividad desde 68.9 FPU/L.h hasta 200 FPU/L.h. Sin embargo, los autores advierten que para hacer una comparación rigurosa de estos valores se deben definir parámetros para correlacionar los distintos diseños de los reactores y los modos de operación [32].

3.2.4 Biorreactor de lecho fibroso rotatorio (RFBB)

Lan et al. [33] utilizaron un RFBB para comparar la producción de enzimas por parte de *T. viride* sobre bagazo de caña y fibra de trigo con el método tradicional en un STR. El lecho fibroso fue construido a base de una matriz de polipropileno para lograr la inmovilización de las células. El reactor se operó a 28°C con una aireación entre 0.5 y 1.0 vvm para mantener el %OD por encima del 10% de saturación. La velocidad de rotación del lecho inicialmente fue de 60 rpm y se incrementó a 90 rpm cuando los sólidos se adsorbieron sobre el lecho.

La solución de enzimas producida por la fermentación en el RFBB mostró una actividad enzimática máxima de 0.31 FPU/mL de celulasa, 0.61 U/mL de CMCasa y 0.22 U/mL de BGL. En comparación con la fermentación en un STR, el producto del RFBB presentó una mayor actividad de celulasa (0.23 FPU/mL en el STR). Sin embargo, la actividad de CMCasa y BGL obtenida en el RFBB fue menor que la obtenida en el STR (0.67 U/mL y 0.26 U/mL respectivamente). Los autores concluyeron que la fermentación con *T. viride* en el RFBB presentó ventajas importantes en cuanto a la producción de

enzimas celulolíticas, ya que al evitar el excesivo esfuerzo cortante que genera la agitación mecánica de un STR sobre las células se logró obtener 35.5% más celulasas que por el método tradicional [33].

El biorreactor que se simuló y diseñó en esta investigación es del tipo STR, ya que este permite un mejor sistema de control de temperatura, pH, aireación y formación de espuma que otros tipos de reactor. Este es un punto clave ya que es importante asegurar que se mantengan las condiciones adecuadas para asegurar un buen rendimiento en el proceso de fermentación. Asimismo, este tipo de reactores ha sido estudiado de manera más extensa y por lo tanto fue posible tener los parámetros cinéticos necesarios para el desarrollo de la simulación.

3.3 Operaciones aguas abajo de la fermentación

3.3.1 Precipitación con sulfato de amonio

Esta operación unitaria es una de las técnicas más comúnmente utilizadas para la purificación de diversos tipos de proteínas y por lo tanto su aplicación en la concentración de enzimas celulolíticas ha sido ampliamente estudiada. En una investigación de 2015, Megha et al. [34] cultivaron *A. terreus* sobre CMC con el objetivo de verificar la eficiencia del sulfato de amonio en la concentración de la solución enzimática. Para tal fin, se agregó una solución saturada de sulfato de amonio a la mezcla de fermentación y se recogió el precipitado formado entre el 60 y 80% de saturación de sulfato de amonio. Los autores determinaron que bajo estas condiciones se logró concentrar la celulasa en un factor de 15 con un rendimiento del 96.18% de la actividad enzimática inicial. Por su parte, Narashima et al. [35] estudiaron la purificación de BGL producida por *A. niger* durante la fermentación del aserrín. Utilizando sulfato de amonio al 90%, se alcanzó una purificación de 45.10 veces con un rendimiento de 63.10%. Es posible agregar una etapa de filtración previa a la concentración con sulfato de amonio, tal como se realizó en el estudio de Abdul-Hadi et al. [36]. En esta investigación, la celulasa producida por *T. reesei* sobre CMC fue sometida a ultrafiltración (UF) y luego a precipitación con sulfato de amonio al 70%. Al aplicar la UF, se obtuvo una purificación de 1.70 veces y un rendimiento de 77.63%. Luego de la precipitación, la purificación fue de 2.41 veces y el rendimiento de 59.51%.

3.3.2 Precipitación con etanol

Si bien el método más común para la concentración de enzimas es el de la precipitación con sulfato de amonio, también es posible precipitarlas agregando etanol a la solución enzimática. Mariño et al. [37] investigaron la purificación de enzimas celulolíticas producidas por *T. harzianum* sobre bagazo de caña utilizando etanol al 60-90% v/v en el rango de pH de 5.0 a 8.0 y en el rango de temperatura de 5 a 25°C. Se determinó que las mejores condiciones para llevar a cabo la precipitación de las enzimas fue a pH 5.0, a una temperatura de 5°C y con etanol al 90%. Bajo estas condiciones, se obtuvo un rendimiento de aproximadamente 77, 100 y 100 de la actividad de FPasa, CMCasa y BGL respectivamente. Si bien se logró la recuperación casi el total de la actividad, no se reportó el nivel de purificación alcanzado por este método. Es importante notar que para alcanzar la recuperación reportada es necesario utilizar grandes volúmenes de etanol, lo cual puede resultar poco práctico a escala industrial.

Al comparar ambos métodos para la precipitación de las enzimas de interés, se concluyó que se utilizaría el método con sulfato de amonio al 60-80% en esta investigación para la concentración de las enzimas producidas a partir del bagazo de caña de azúcar.

3.4 Modelamiento matemático de la fermentación

Para poder predecir la cinética de la producción de enzimas, del consumo de sustrato y demás sustancias en un fermentador es necesario determinar los parámetros cinéticos que permitan describir el comportamiento de estas variables. Los parámetros obtenidos y asociados a modelos cinéticos permiten identificar estrategias de operación para la mejora del proceso sin necesidad de realizar numerosos experimentos.

Ma et al. [38] estudiaron la cinética del proceso de producción de celulasas por *T. reesei* en un fermentador batch con el objetivo de determinar los parámetros cinéticos y termodinámicos necesarios para el modelamiento matemático del proceso. Para esto, se realizaron experimentos de fermentación y se resolvieron las ecuaciones diferenciales que modelan el crecimiento microbiano utilizando el software Matlab v7.0.

En el modelo propuesto se asumió que la celulosa es el único sustrato que se utiliza para la producción de celulasas y que la concentración de azúcares iniciales como glucosa y celobiosa es despreciable, por lo cual no inhiben la producción de celulasa. Para el crecimiento de las células se empleó el modelo de Monod para el crecimiento celular descrito en la sección 2.4:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_m \frac{SX}{K_S+S} - k_d X \quad (\text{Ec. 11})$$

La actividad enzimática de celulasas, E (FPU/mL), fue modelada por la siguiente ecuación:

$$\frac{dE}{dt} = \frac{k_1 X}{1+\frac{S}{K_I}} - k_2 E \quad (\text{Ec. 12})$$

Donde k_1 es la constante de velocidad de síntesis de celulasas (U/L.h) y k_2 es la velocidad de decaimiento de celulasas (h^{-1}).

Por último, el consumo de celulosa (S) se modeló por la siguiente ecuación:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \frac{dX}{dt} - m_S X \quad (\text{Ec. 13})$$

Donde $Y_{X/S}$ es el coeficiente rendimiento estequiométrico del sustrato (g/g) y m_S es el coeficiente de mantenimiento específico (h^{-1}).

La resolución de las ecuaciones anteriores en base a los resultados experimentales obtenidos permitió determinar los parámetros cinéticos necesarios para el modelamiento del proceso. En la Figura 3.2 se comparan los resultados experimentales con los predichos por la simulación para la concentración de células, celulasas y enzimas durante el proceso de fermentación. La data generada de manera computacional mostró un buen ajuste con un coeficiente de correlación R^2 entre 0.85 y 0.98 [38], lo cual confirmó la validez de los resultados obtenidos.

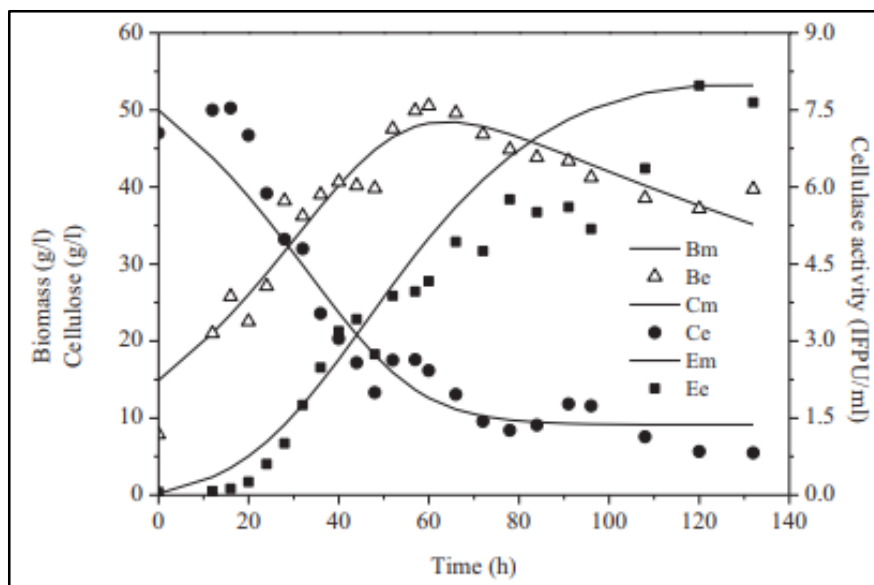


Figura 3.2 Resultados experimentales y computacionales para la concentración de células (triángulos), celulosa (círculos) y celulasas (cuadrados). Fuente: L. Ma et al. Kinetic studies on batch cultivation of *Trichoderma reesei* and application to enhance cellulase production by fed-batch fermentation [38].

Una investigación similar fue conducida por Gelain et al. [39] para estudiar la cinética de la producción de celulasas durante la fermentación del bagazo de caña pretratado por SE con *T. reesei*. Los modelos matemáticos propuestos fueron similares a los de las ecuaciones 11-13. Sin embargo, para tomar en cuenta el bajo consumo de celulosa y la baja producción de celulasas en las primeras T_L horas se introdujo un factor adicional $f(t)$:

$$f(t) = 1 - \exp\left(-\frac{t}{T_L}\right) \quad (\text{Ec. 14})$$

De manera similar, se introdujo un parámetro adicional para describir la represión en la producción de enzimas conforme se forma más producto:

$$a = \left(1 - \frac{E}{E_m}\right)^y \quad (\text{Ec. 15})$$

Donde E_m es la actividad máxima (U/L) e y es el exponente de represión de las enzimas.

Al comparar los modelos generados con la data recolectada de forma experimental, se observó que los modelos predecían la concentración de células, sustrato y enzimas de manera adecuada con coeficientes de correlación R^2 entre 0.80 y 0.94. Además, las simulaciones permitieron determinar que la producción de enzimas es mayor a bajas concentraciones de sustrato, por lo que los autores sugieren que la fermentación

sea llevada a cabo en operación semi batch para mantener esta condición durante todo el proceso [39].

3.5 Simulación del proceso de obtención de enzimas celulolíticas a escala industrial

Con el objetivo de realizar una evaluación económica de la implementación de una planta de producción de celulasas para la industria del bioetanol, Zhuang et al. [6] simularon este proceso utilizando el software SuperPro Designer 5.5. En esta investigación se simularon las operaciones necesarias para producir celulasas a partir de la fermentación de celulosa por parte de *Clostridium thermocellum* y para la concentración del producto.

La primera parte del proceso consiste en un tren de fermentadores (SF-101 y SF-102) para cultivar *C. thermocellum* e incrementar la cantidad de células que ingresan al fermentador principal (LF-101). El tren de fermentadores es alimentado con una concentración inicial de inóculo cultivado en laboratorio (SFR-101) y el medio de cultivo proviene de los tanques mezcladores MB-101 y MB-102. Son necesarios los esterilizadores HS-101 y HS-102 para prevenir la contaminación de la materia prima. La fuente de carbono utilizada por Zhuang et al. fue celulosa proveniente de pulpa de papel almacenada en HP-101, la cual se alimenta a LF-101 junto con las cepas de hongos cultivados en SF-102 y el medio de cultivo apropiado para la fermentación. En el biorreactor LF-101 se tiene una corriente de salida líquida, que contiene las enzimas producidas, y una corriente de gases producidos durante la fermentación, los cuales son enviados hacia un filtro antes de ser desechados por razones de bioseguridad. El proceso de concentración de las enzimas consiste en dos etapas: la evaporación parcial del agua en el concentrador EV-101 y la liofilización de la solución enzimática en FD-101. Las enzimas pueden ser vendidas y transportadas en su forma liofilizada hacia otra localidad, pero si se requieren para uso interno se puede prescindir de FD-101 y utilizar la solución concentrada que se obtiene de EV-101 [6].

Para la operación de esta planta en modo batch, se determinó una capacidad de producción de 757 567 kg de celulosa por año. El costo de los equipos, los costos de instalación y los costos de operación fueron calculados utilizando la data incluida en

SuperPro Designer. La evaluación económica del proceso propuesto resultó en un costo de operación anual estimado de \$30 576 000, que resulta en un costo unitario de producción de \$40.36 por kg de celulasa. Por último, el análisis de sensibilidad realizado evidenció que es posible reducir el costo unitario de producción hasta \$37.77 si se incrementa la capacidad de producción de la planta en un 80% [6].

Una investigación similar fue realizada por Ferreira et al. en 2018 [7], donde se propuso el diseño de una planta de producción de BGL a partir de la fermentación por parte de *Escherichia coli* con glucosa y amoníaco como sustratos. La simulación y la evaluación económica del proceso planteado fueron realizadas en SuperPro Designer v9.5.

El proceso propuesto por Ferreira et. al se encuentra dividido en tres secciones: la sección de cultivo, la sección de fermentación y la sección de recuperación del producto. La sección de cultivo consta de dos tanques de fermentación con arreglos similares al del diagrama de Zhuang et al. en [6], con la diferencia de que en [7] se incluye un sistema de aireación compuesto por un compresor y un filtro para proveer aire esterilizado al proceso. De la misma forma, la sección de fermentación es similar a la de Zhuang et al. pero se incluye un sistema de aireación al fermentador. La sección de recuperación de producto propuesta por Ferreira et al. es más compleja que la de Zhuang et al. ya que presenta cuatro unidades de proceso para la concentración del producto. La solución enzimática producida en el fermentador pasa a un tanque de almacenamiento (V-101) y luego a un homogeneizador de alta presión (HG-101), donde se provoca la lisis de las células para recuperar las enzimas producidas de manera intracelular. A continuación, la solución se dirige hacia una centrífuga, donde se retira el 70% de los restos de las células y luego a un filtro para remover los sólidos por completo. Por último, la solución ingresa a un sistema de diafiltración donde se estabiliza en un buffer de citrato a pH 5.8 y se lleva a la concentración deseada de 15 g de enzima por litro.

El análisis económico del proceso simulado permitió calcular un costo unitario de producción de \$316/kg de BGL para el caso inicial. Sin embargo, el análisis de sensibilidad mostró que sería posible reducir este costo por debajo de \$40/kg a través de la variación de ciertos parámetros como la capacidad de producción, el tiempo de producción, los insumos utilizados, entre otros. Finalmente, los autores hacen énfasis en

la necesidad de diseñar sistemas alternativos para la recuperación del producto, ya que el sistema utilizado representó más del 50% del costo total.

Las simulaciones realizadas en [6] y [7] son un buen punto de partida para el diseño de una planta de producción de enzimas celulolíticas a partir de bagazo de caña en el Perú, que es el objetivo de esta investigación. Ambos diseños presentan similitudes entre ellos pero difieren principalmente en el producto y en las operaciones unitarias para la concentración enzimática, lo cual impacta de manera significativa en el costo unitario de producción. Por esta razón, es necesario desarrollar otros sistemas de concentración o mejorar los planteados en estos estudios para lograr disminuir los costos. Es importante resaltar que ambas investigaciones se basaron en resultados obtenidos por otros autores a escala de laboratorio, es decir que se escaló el proceso basándose en la similitud en la productividad enzimática y asumiendo que la cantidad de enzimas producidas incrementan de manera lineal con la cantidad de sustrato. La investigación realizada en esta tesis toma en cuenta el crecimiento celular y la cinética de la producción de enzimas para el escalamiento del proceso, lo cual permite tener mejores estimados acerca del rendimiento de la fermentación y de las mejores condiciones de operación.

CAPÍTULO IV

METODOLOGÍA

4.1 Determinación de la capacidad de producción

La capacidad productiva del proceso a diseñar se calculó tomando como referencia la cantidad de bagazo de caña residual de la biorrefinería Sucroalcolera del Chira S.A. en la región de Piura, Perú. Considerando que se obtienen 280 kg de bagazo por cada tonelada de caña de azúcar y que se procesan 4 300 toneladas de caña de azúcar, la cantidad de bagazo disponible resulta en aproximadamente 1 204 toneladas de bagazo por día [5]. Aproximadamente el 60% del bagazo producido se destina a la quema para la cogeneración [40], con lo cual se tiene un remanente de 40% de bagazo (482 toneladas) que se puede destinar para otros usos. Si bien en principio se tendrían 482 toneladas disponibles para ser utilizadas en el proceso, una capacidad de procesamiento de 482 toneladas es excesiva para un proceso de este tipo. Por esta razón, se optó por considerar una capacidad de 4.82 toneladas de bagazo de caña (el 1% del bagazo remanente) por lote para el diseño del proceso.

4.2 Simulación de la cinética de la producción enzimática

Debido a la falta de modelos cinéticos para la fermentación con materia prima local (tanto el bagazo de caña como los hongos *T. reesei*), se consideraron los modelos disponibles en la literatura. Por esta razón, es necesario validar los resultados del modelo de manera experimental con materia prima local como se discute en el Capítulo VI.

El modelamiento matemático del proceso de fermentación para la producción de celulasas se realizó a partir de las ecuaciones de crecimiento planteadas por Ma et al. (Ec. 11-13) y los parámetros cinéticos determinados en [38] a partir de *T. reesei* en bagazo de caña de azúcar a 26°C y pH 5.0. Los parámetros cinéticos utilizados se muestran en la Tabla 4.1.

| Parámetro | Unidad | Valor |
|------------------|---------------|--------------|
| μ_m | 1/h | 0.096 |
| K_S | g/L | 11.27 |
| K_I | g/L | 1138.74 |
| k_d | 1/h | 0.048 |
| k_1 | FPU/g.h | 0.004 |
| k_2 | 1/h | 0.018 |
| $Y_{X/S}$ | g/g | 1.19 |
| m_S | 1/h | 0.0047 |

Tabla 4.1 Parámetros cinéticos para el crecimiento celular y producción enzimática.

Fuente: Adaptado de L. Ma et al. Kinetic studies on batch cultivation of *Trichoderma reesei* and application to enhance cellulase production by fed-batch fermentation [38].

La resolución de las ecuaciones 11-13 en Matlab permitió obtener las curvas de producción enzimática para las distintas condiciones de operación evaluadas.

En el caso de la operación batch del fermentador se realizaron simulaciones para distintas concentraciones iniciales de sustrato. Luego se evaluó la operación del fermentador con alimentaciones periódicas para mejorar la productividad de celulasas en el proceso. Una vez obtenidos los resultados de los distintos escenarios, se seleccionaron las condiciones de operación que permitieron lograr una mayor actividad enzimática. Las dimensiones del fermentador principal se determinaron a partir del consumo de bagazo por lote de producción y teniendo en cuenta las consideraciones de diseño mencionadas en [19].

4.3 Diseño del proceso

4.3.1 Tren de siembra

El proceso de producción de enzimas comienza con el cultivo de las células de *T. reesei* en laboratorio y su posterior escalamiento en una serie de fermentadores de siembra con diferentes capacidades para producir la cantidad de células necesarias para la fermentación en el fermentador principal. El cultivo en el tren de siembra se lleva a cabo en presencia de celulosa como fuente de carbono y utilizando el medio de nutrientes descrito en [38].

Para definir la cantidad de fermentadores de siembra, la capacidad y el tiempo de fermentación en cada biorreactor se utilizó la concentración inicial de células para la fermentación en el reactor principal como punto de partida. Así, considerando las diluciones sucesivas y las concentraciones máximas alcanzadas en los fermentadores de siembra se determinaron los parámetros mencionados a partir del modelo cinético de crecimiento.

4.3.2 Pretratamiento del bagazo de caña

El pretratamiento por explosión de vapor se lleva a cabo en un contenedor a presión con vapor saturado a 190°C y 12.75 bar [41]. La capacidad del tanque se determinó a partir de la cantidad de vapor requerida a estas condiciones para tratar la cantidad de bagazo de caña requerida para el proceso. Luego de la explosión de vapor, los sólidos se lavan con agua en el mismo tanque para retirar las sustancias no deseadas que pueden actuar como inhibidores en la fermentación.

4.3.3 Separación de sólidos de la mezcla de fermentación

La separación de los sólidos remanentes luego de la fermentación se realiza de manera continua en un filtro seguido de una centrífuga de discos como se recomienda en la literatura para la separación de biomasa en mezclas de fermentación [7]. El caudal de operación y la velocidad de rotación de la centrífuga se determinaron a partir de las condiciones de operación recomendadas para la concentración de sólidos presentes en la mezcla de fermentación.

4.3.4 Concentración de las enzimas

La concentración de las enzimas por precipitación con sulfato de amonio se realiza en dos etapas. En la primera se agrega una solución saturada de sulfato de amonio a la mezcla de fermentación en un tanque de mezclado hasta alcanzar el 60% de saturación para precipitar las proteínas no deseadas. La suspensión pasa a una centrífuga para retirar el precipitado y el sobrenadante regresa al tanque de mezclado. En la segunda etapa se agrega sulfato de amonio hasta el 80% de saturación para precipitar las celulasas, la

suspensión se centrifuga y el precipitado recuperado se estabiliza en un buffer de fosfato a pH 7.0 para obtener como producto final el cocktail enzimático concentrado.

La cantidad de solución de sulfato de amonio requerida para este proceso se calculó utilizando como referencia la tabla de precipitación de Sigma Aldrich mostrada en el Anexo 1 [42] y la capacidad del tanque fue determinada según el volumen final de la mezcla. Las centrifugas se seleccionaron según el flujo de mezcla a procesar y las velocidades de rotación adecuadas para las enzimas. Se asumió un rendimiento de purificación de 16 veces como se indica en [34].

4.4 Evaluación económica

4.4.1 CAPEX

El CAPEX del proceso fue calculado tomando en cuenta la inversión inicial asociada a la compra e instalación de los equipos, la instrumentación del proceso, la construcción de la planta, el capital de trabajo y otros puntos que se detallan a continuación.

El costo de compra de los equipos (*PC, Purchased-equipment cost*) se obtuvo de [43] y [44] según su capacidad. El costo obtenido de estas referencias fue actualizado al precio del presente año utilizando el índice de costos para plantas de ingeniería química (*CEPCI, Chemical Engineering Plant Cost Index*) [45] del año correspondiente.

Adicionalmente al *PC*, se determinaron los costos directos (*DC*), costos indirectos (*IC*) y otros costos (*OC*) asociados a la instalación, instrumentación, tuberías, ingeniería, construcción, contingencias, entre otros. Estos se estimaron como porcentajes del *PC* utilizando valores comunes sugeridos en [46] y [47], los cuales se indican en la Tabla 4.2.

| | Porcentaje (%) | Costo de referencia |
|-------------------------------|----------------|---------------------|
| Costos directos (DC) | | |
| Equipos no listados | 20 | |
| Instalación de equipos | 30 | |
| Tuberías | 35 | |
| Instrumentación | 40 | |
| Aislamiento | 3 | PC |
| Sistemas eléctricos | 10 | |
| Instalaciones | 45 | |
| Mejora del terreno | 15 | |
| Facilidades auxiliares | 40 | |
| Costos indirectos (IC) | | |
| Ingeniería | 25 | DC |
| Construcción | 35 | |
| Otros costos (OC) | | |
| Honorarios del contratista | 5 | |
| Contingencias | 10 | DC + IC |

Tabla 4.2 Porcentajes considerados para el cálculo de DC, IC y OC. Fuente: Elaboración propia.

La inversión de capital fijo (FCI) se determinó como la suma del PC, DC, IC y OC. El CAPEX del proceso se calculó considerando que el FCI representa el 85% del mismo y que el 15% restante es capital de trabajo [47].

4.4.2 OPEX

El OPEX se calculó como la suma de los costos variables y los costos fijos de manufactura. Dentro de los costos variables de manufactura se incluyeron los costos de materia prima y utilidades, cuya demanda se calculó a partir de los balances de materia y energía del proceso. Los costos fijos de manufactura (mantenimiento y depreciación de los equipos, impuestos, seguros, mano de obra, entre otros) se calcularon de la siguiente manera [46] [47]:

- Los costos de mantenimiento se asumieron como el 10% del PC

- El costo de los seguros e impuestos se calcularon como el 1 y 2% del FCI respectivamente
- Se consideró un costo base de mano de obra de \$6/h y los costos de beneficios, supervisión, suministros y administrativos se aproximaron como el 40, 20, 10 y 60% del costo de mano de obra respectivamente
- El costo de los laboratorios, control de calidad y aseguramiento de calidad se determinaron como el 15% del costo total de mano de obra
- La depreciación se calculó utilizando el método de depreciación MACRS para un período de recuperación de 5 años

4.4.3 Planificación del proceso

La planificación o *scheduling* del proceso es una etapa importante para el diseño del mismo ya que permite determinar la capacidad anual de producción de celulasas según la disponibilidad de los recursos [48]. Para realizar el *scheduling* del proceso se listó la secuencia de operaciones tomando en cuenta los tiempos de carga, operación, descarga y limpieza de los equipos. Según la cantidad de recursos disponibles se determinó la secuencia de operaciones que optimiza el uso de estos recursos.

El *scheduling* del proceso permite identificar las etapas limitantes o cuellos de botella. Según estos resultados se agregaron recursos a estas etapas críticas para optimizar el proceso y así incrementar la producción anual de enzimas, para finalmente analizar cómo esto impacta en el costo unitario de producción y en los indicadores económicos en cada escenario.

4.4.4 Costo unitario de producción

Una vez calculados los costos totales de producción (US\$/año), se calculó el costo unitario de producción de las enzimas en cada escenario según la ecuación 16 [6]:

$$\text{Costo unitario} = \frac{\text{Costo total de producción}}{\text{kg de enzimas por lote} \times \text{N}^\circ \text{ lotes por año}} \quad (\text{Ec. 16})$$

4.4.5 Índices de rentabilidad (VAN y TIR)

Para el cálculo del valor actual neto (VAN) y la tasa interna de retorno (TIR) del proceso propuesto, se construyó el flujo de caja proyectado a lo largo de 20 años de operación para los distintos escenarios. Para esto se consideró un costo promedio ponderado de capital (CPPC) del 16% como se sugiere en [47] para nuevas tecnologías de proceso para un producto ya existente en el mercado y una tasa de impuesto a la renta del 26% [49]. Estos indicadores se analizaron en los distintos escenarios propuestos para observar su tendencia según la producción anual de celulasas.

CAPÍTULO V

RESULTADOS

5.1 Determinación del rendimiento deseado en el proceso de fermentación

Para determinar la actividad enzimática que se desea en el producto final, se tomaron como referencia los cocktails enzimáticos comerciales Cellic Ctec2 y Cellic Ctec3 de Novozymes, cuyas actividades son de 113 y 213 FPU/mL respectivamente [50]. Al promediar ambos valores se obtuvo que en el producto final del proceso a diseñar se desea encontrar una actividad enzimática de aproximadamente 160 FPU/mL. Como se indicó previamente se asumen rendimientos de purificación de 16 veces [34], con lo cual la actividad al final del proceso de fermentación debe ser de 10 FPU/mL.

5.2 Simulación de la cinética de la producción enzimática

5.2.1 Fermentación batch

En la Figura 5.1 se muestran los resultados de las simulaciones de la producción enzimática para valores de concentración inicial de sustrato (S_0) entre 10 y 70 g/L en incrementos de 10 g/L. En todos los casos se observa que las curvas presentan un valor máximo de actividad enzimática entre las 100 y 120 horas y luego este valor decrece producto de la degradación de las enzimas. Se puede inferir que si se desea obtener una actividad enzimática aproximada de 10 FPU/mL al finalizar la fermentación, se puede optar por iniciar el proceso con una concentración de celulosa entre 60 y 70 g/L y operar el reactor por 120 horas.

La gráfica mostrada en la Figura 5.2 corresponde al proceso de fermentación con $S_0=65$ g/L y se aprecia que a las 120 horas se alcanza una actividad enzimática de 10 FPU/mL. Sin embargo, es importante notar que en todos los modelos cinéticos considerados, el parámetro S_0 corresponde a la concentración de celulosa, que sería alcanzada adicionando 112 g/L de bagazo con un contenido de celulosa de 58%.

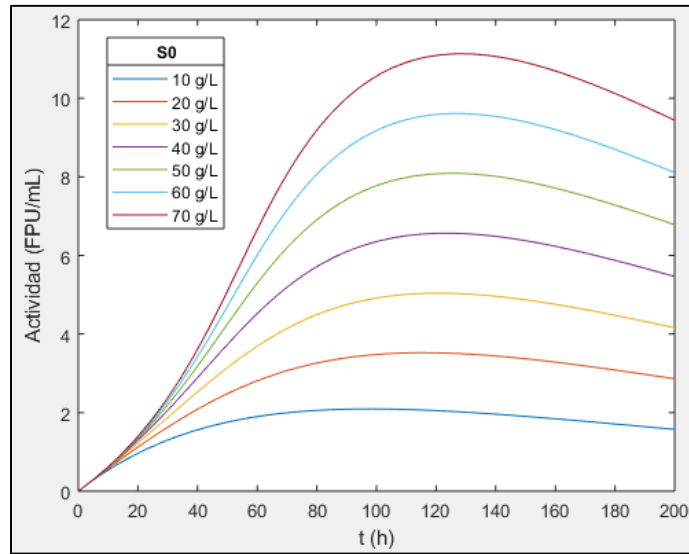


Figura 5.1 Curvas de productividad enzimática para distintas concentraciones iniciales de celulosa.
Fuente: Elaboración propia.

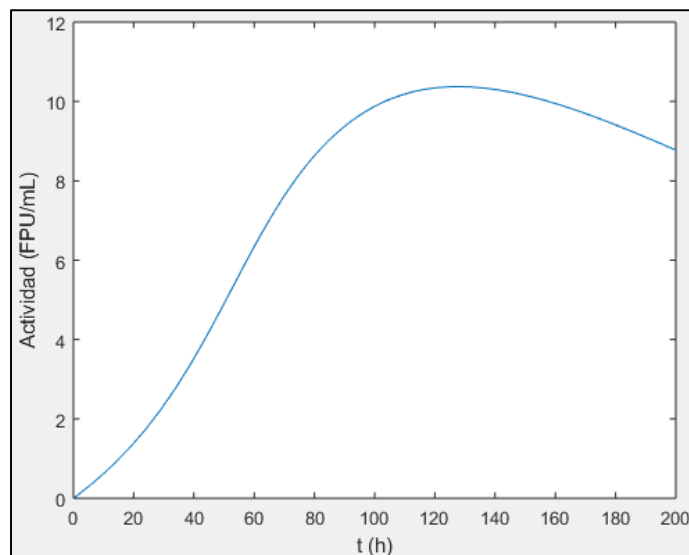


Figura 5.2 Productividad enzimática para $S_0=65$ g/L. Fuente: Elaboración propia.

El bagazo de caña es una materia prima insoluble y con baja densidad aparente, por lo cual el uso de concentraciones elevadas podría provocar problemas en el mezclado del reactor y a su vez influenciar negativamente en la homogeneidad y transferencia de masa dentro del sistema [51]. Asimismo, es posible que el modelo cinético utilizado ya no sea capaz de explicar el proceso con precisión a concentraciones de sustrato muy elevadas. Por este motivo, en la siguiente sección se proponen estrategias de operación para operar con una menor concentración inicial de sustrato y con alimentaciones

sucesivas, para de esta manera evitar los problemas mencionados y asegurar la producción enzimática deseada.

5.2.2 Estrategias de operación semibatch

Los problemas de operación en relación a la homogeneidad y transferencia de masa ocasionados por una elevada concentración inicial de bagazo de caña pueden ser prevenidos operando el fermentador en un modo semibatch o discontinuo. De esta manera, se puede iniciar la operación a una concentración media de sustrato y luego de un tiempo determinado agregar cierta cantidad de bagazo para promover la producción de enzimas y así alcanzar la actividad enzimática deseada de 10 FPU/mL. Para el análisis de la fermentación semibatch se seleccionó una concentración inicial de 30 g/L de celulosa (52 g/L de bagazo de caña) y se simuló el proceso en el caso de una y dos alimentaciones posteriores a la carga inicial.

En la Figura 5.1 se observó que la producción enzimática en modo batch para $S_0=30$ g/L empieza a desacelerar de manera significativa desde las 70 horas, por lo cual se decidió simular este proceso de manera discontinua agregando sustrato al cabo de 70 horas hasta alcanzar nuevamente la concentración inicial (estrategia de alimentación A). Los resultados de esta simulación se ilustran en la Figura 5.3 y demuestran que es posible incrementar la producción enzimática en gran medida a través de una operación discontinua. Mientras que en la operación batch con $S_0=30$ g/L se alcanzó una actividad máxima cercana a 4.9 FPU/mL, al implementar la estrategia de alimentación A se alcanzó un máximo de 7.67 FPU/mL.

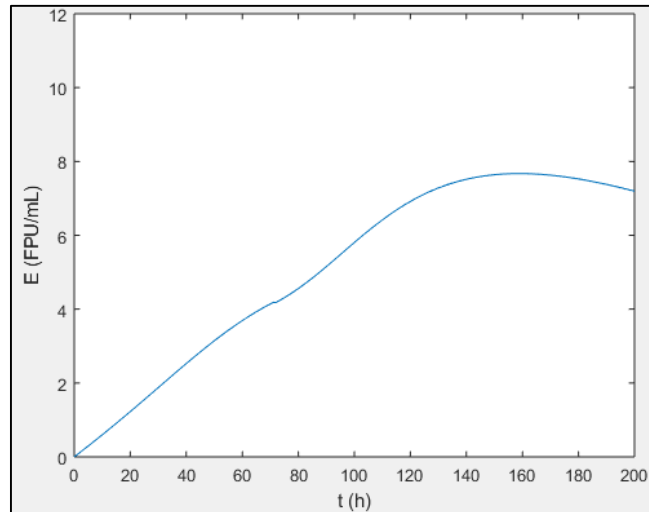


Figura 5.3 Productividad enzimática para $S_0=30$ g/L con la estrategia de alimentación A.
Fuente: Elaboración propia.

Es posible aplicar el mismo razonamiento al proceso representado por la Figura 5.3 para implementar una nueva estrategia de alimentación que mejore el rendimiento del proceso de tal forma que se pueda alcanzar la actividad deseada de 10 FPU/mL. En este caso la curva muestra una desaceleración a las 120 horas de iniciada la fermentación, por lo cual resulta conveniente agregar más sustrato en ese instante. La Figura 5.4 muestra la actividad enzimática durante el proceso de fermentación con $S_0=30$ g/L y con la estrategia de alimentación B, en la cual se alimenta sustrato a las 70 y 120 horas, en cada caso llevando la concentración de la mezcla hasta S_0 . En este caso se logra cumplir con la especificación de 10 FPU/mL al cabo de 180 horas de fermentación y se previenen problemas operativos al mantener una concentración relativamente baja de bagazo dentro del reactor.

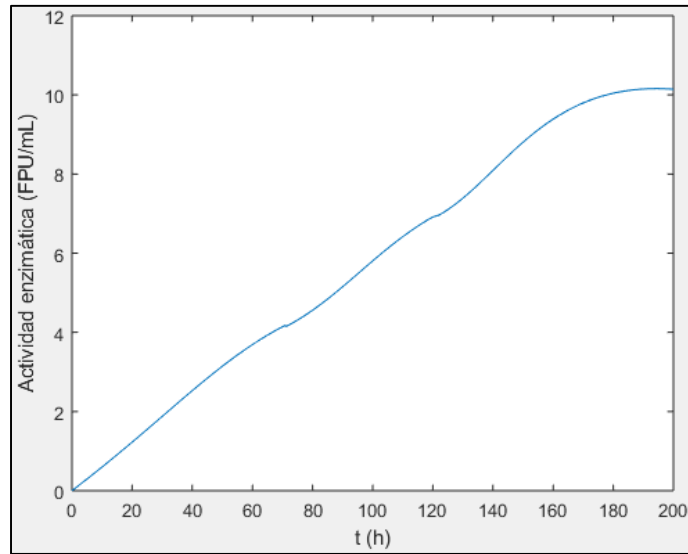


Figura 5.4 Productividad enzimática para $S_0=30$ g/L con la estrategia de alimentación B.
Fuente: Elaboración propia.

Las tres estrategias de operación analizadas partiendo de una concentración inicial de 30 g/L de celulosa se comparan en la Figura 5.5. De estas gráficas se evidencia que la adición de sustrato en los casos (b) y (c) evita la desaceleración de la producción enzimática y permite obtener una mayor actividad manteniendo una concentración media de sustrato. En la Tabla 5.1 se resumen los parámetros de operación en los tres casos, así como la actividad máxima alcanzada.

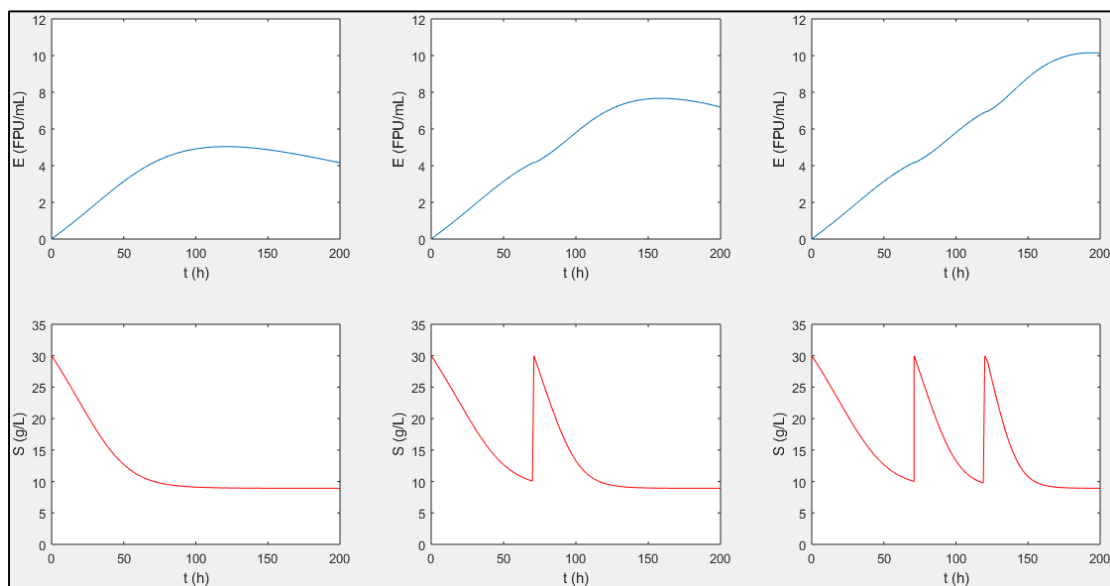


Figura 5.5 Actividad enzimática (azul) y concentración de sustrato (rojo) en distintos modos de operación: (a) batch, (b) estrategia de alimentación A, (c) estrategia de alimentación B. Fuente: Elaboración propia.

| Modo de operación | Concentración inicial de celulosa / bagazo (g/L) | Tiempo de fermentación (h) | Actividad máxima (FPU/mL) | Consumo total de celulosa / bagazo (g/L) |
|------------------------------|---|-----------------------------------|----------------------------------|---|
| Batch | 30 / 52 | 100 | 4.9 | 30 / 52 |
| Estrategia de alimentación A | 30 / 52 | 160 | 7.67 | 50 / 86 |
| Estrategia de alimentación B | 30 / 52 | 180 | 10.0 | 70 / 121 |

Tabla 5.1 Parámetros de operación y actividad máxima para distintos modos de operación.
Fuente: Elaboración propia.

Luego de analizar los distintos modos de operación se optó por la estrategia de alimentación B para el proceso de producción de enzimas a diseñar. Si bien el tiempo requerido para alcanzar la actividad deseada a través de este modo de operación es mayor que el obtenido para la operación batch con $S_0=65$ g/L (120 horas), la adición discontinua de sustrato tiene la ventaja de trabajar con menores cargas de sólidos dentro del reactor, además de favorecer la productividad y evitar problemas de inhibición.

5.2.3 Dimensionamiento del fermentador principal y consideraciones de diseño

Como se mencionó anteriormente, la capacidad de trabajo es de 4.82 toneladas de bagazo de caña por lote. Sin embargo, es necesario realizar un pretratamiento a la materia prima para facilitar el acceso de los microorganismos a la celulosa y en este proceso se pierde parte del contenido del bagazo. El pretratamiento seleccionado es el de explosión de vapor estudiado por Rocha en [41] que presenta un rendimiento del 69% en relación a la recuperación de sólidos y una concentración final de celulosa en el bagazo de 58%. Tomando como referencia estos resultados se obtienen 3.32 toneladas de bagazo pre tratado para alimentar al proceso, de las cuales se utilizarán 3 toneladas para alimentar al fermentador principal y lo restante para los fermentadores de siembra.

Considerando que la disponibilidad de bagazo de caña para el fermentador principal es de 3 toneladas por cada lote de producción y que se consumen 121 g de bagazo por cada litro de mezcla, esta debe tener un volumen de 24.79 m^3 . Típicamente el volumen de trabajo en fermentadores es del 75% [19] debido a la formación de gases

durante la fermentación, por lo cual el volumen del equipo debe ser de 33 m³. La relación de aspecto (altura/diámetro) sugerida por autores como Shuler et al. [19], Jagani et al. [52] y Wu et al. [53] para fermentadores agitados es entre 2 y 3. Estos autores indican que esta relación de aspecto permite reducir la potencia de agitación manteniendo una buena aireación y un mezclado homogéneo dentro del reactor. Considerando una relación de aspecto de 2.5, el fermentador principal debe tener una altura de 6.4 m y un diámetro de 2.6 m.

Algunas consideraciones que deben ser tomadas en cuenta para el diseño del fermentador son las siguientes [19] [52]:

- El reactor debe contar con serpentines internos para el enfriamiento o calentamiento de la mezcla según sea necesario, así como un sistema de control de temperatura para regular el flujo a través de este con el fin de mantener la temperatura dentro del rango deseado ($26 \pm 1^\circ\text{C}$)
- El reactor debe contar con un sistema de control de pH para mantener este en 5.0 mediante la adición de NaOH o HCl [38]
- El reactor debe contar con un sistema de dosificación de agente antiespumante
- Si bien no se considera en este trabajo, debe evaluarse el uso de deflectores para evitar la formación de vórtices durante la agitación (a 140 rpm)
- El material de construcción debe ser uno no tóxico y resistente a la corrosión, como acero inoxidable
- Se debe contar con un sistema interno de lavado capaz de dispersar eficientemente los fluidos de limpieza (CIP, *cleaning-in-place*)
- Es necesario contar con una válvula de alivio de presión para evitar la acumulación excesiva de gases dentro del reactor y así evitar problemas de seguridad
- Para evitar el ingreso de microorganismos y sustancias no deseadas al fermentador los accesorios deben estar sellados adecuadamente, las juntas deben ser soldadas (no roscadas) y se recomienda operar a una presión positiva

5.3 Diseño del proceso

5.3.1 Descripción del proceso

El diagrama de flujo del proceso de producción de enzimas propuesto se muestra en el Anexo 2. El proceso inicia con la preparación y el cultivo del inóculo en un tren de siembra compuesto fermentadores en serie (SF-101, 102, 103 y 104). El primero se alimenta con *T. reesei* incubado en laboratorio y en los siguientes se agrega el sustrato, aire y los insumos para preparar el medio de cultivo para promover el crecimiento de la cepa. De manera paralela se realiza el pretratamiento del bagazo de caña en el contenedor a presión TK-101 con vapor saturado a 190°C para obtener bagazo pretratado con un 58% de celulosa [41]. El bagazo pretratado es lavado con agua caliente dentro del mismo contenedor para retirar sustancias no deseadas durante la fermentación.

El fermentador principal (FERM-101) se alimenta con el bagazo pretratado, las células, los insumos para preparar el medio de cultivo y aire, y se opera por 180 horas bajo las condiciones definidas en el apartado anterior. La mezcla que sale de FERM-101 con una actividad enzimática de 10 FPU/mL es enviada a la sección de separación de sólidos, que incluye el filtro F-101 y la centrífuga CF-101.

La solución enzimática libre de sólidos pasa al proceso de concentración por precipitación con sulfato de amonio. En los tanques de mezclado TK-102 y TK-103 se agrega una solución saturada de sulfato de amonio hasta alcanzar el 60% de saturación y luego se envía la mezcla a la centrífuga CF-102, donde se descarta el precipitado que contiene diversas proteínas no deseadas, y el sobrenadante, que contiene las celulasas, es reciclado a los tanques de mezclado. Luego se agrega nuevamente sulfato de amonio hasta alcanzar el 80% de saturación y la mezcla es separada en la centrífuga CF-102, donde se descarta el sobrenadante y las celulasas precipitadas se estabilizan en una solución buffer de fosfato a pH 7.0. Asumiendo que la purificación lograda por este proceso es de 16 veces [34], se tiene el cocktail enzimático con una actividad de 160 FPU/mL como producto final.

5.3.2 Tren de siembra

El tren de siembra es un conjunto de fermentadores colocados en serie aguas arriba del fermentador principal en los cuales se realiza el cultivo de los hongos de *T. reesei* hasta obtener la concentración de masa microbiana requerida para la fermentación. Para determinar el tiempo de fermentación en la siembra se considera que la concentración inicial de células y de celulosa en los fermentadores de siembra es de 5 g/L y 60 g/L respectivamente y, utilizando el modelo cinético presentado anteriormente en [38], se obtiene una concentración máxima de células de aproximadamente 50 g/L luego de 96 horas o 4 días de fermentación (Figura 5.6).

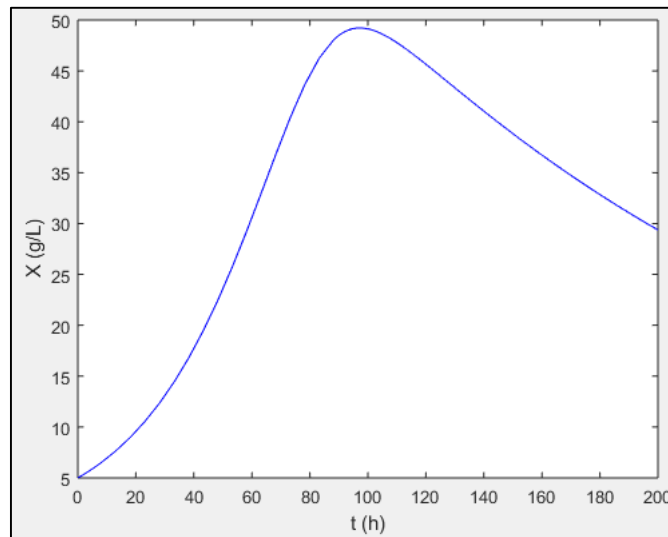


Figura 5.6 Crecimiento celular en los fermentadores de siembra. Fuente: Elaboración propia.

La cantidad y la capacidad de los fermentadores de siembra se calculan considerando las diluciones que ocurren entre los fermentadores. El volumen de mezcla con una concentración de células de 50 g/L que se alimenta al fermentador principal ($V=24.79 \text{ m}^3$) para tener una concentración inicial de células de 15 g/L se calcula como:

$$V_1 = \frac{15 \text{ g/L}}{50 \text{ g/L}} \times 24.79 \text{ m}^3 = 7.43 \text{ m}^3$$

De manera similar se calcula el volumen de la mezcla en los demás fermentadores de siembra:

$$V_2 = \frac{5 \text{ g/L}}{50 \text{ g/L}} \times 7.43 \text{ m}^3 = 0.743 \text{ m}^3 = 743 \text{ L}$$

$$V_3 = \frac{5 \text{ g/L}}{50 \text{ g/L}} \times 743 \text{ L} = 74.3 \text{ L}$$

$$V_4 = \frac{5 \text{ g/L}}{50 \text{ g/L}} \times 74.3 \text{ L} = 7.43 \text{ L}$$

El volumen de mezcla necesario en el primer fermentador del tren de siembra (7.43 L) corresponde a una escala de laboratorio. De esto se concluye que el tren de siembra debe iniciar con el cultivo de *T. reesei* a 5 g/L en una solución de 7.43 L con 60 g/L de celulosa durante 4 días. Luego esta mezcla pasa a los fermentadores de 74.3, 743 y 7 430 L sucesivamente permaneciendo 4 días en cada uno bajo las mismas condiciones que el primero, con lo cual se tiene un tiempo total de cultivo de 16 días. Considerando un volumen de trabajo de 75% [19], los fermentadores de siembra deben tener volúmenes de 10, 100, 1 000 y 10 000 L.

Los parámetros de operación y volúmenes de los tanques de cultivo del inóculo se muestran en la Figura 5.7. El medio de cultivo que utiliza es el medio utilizado por Ma et al. en [38], compuesto por 17 g/L de licor de maíz, 5 g/L(NH₄)SO₃, 6 g/L KH₂PO₄, 1 g/L MgSO₄, 2.5 g/L CaCO₃, 2.5 g/L glicerina y 2 mL/L Tween-80. El sustrato utilizado para el cultivo de *T. reesei* en el tren de siembra es celulosa micro cristalina (MC), sin embargo, para que las células se adapten a utilizar el bagazo como inductor de celulasas en la fermentación se anticipa la adición de esta materia prima en los fermentadores de 1 000 y 10 000 L para aportar el 50% de la celulosa requerida para el cultivo.

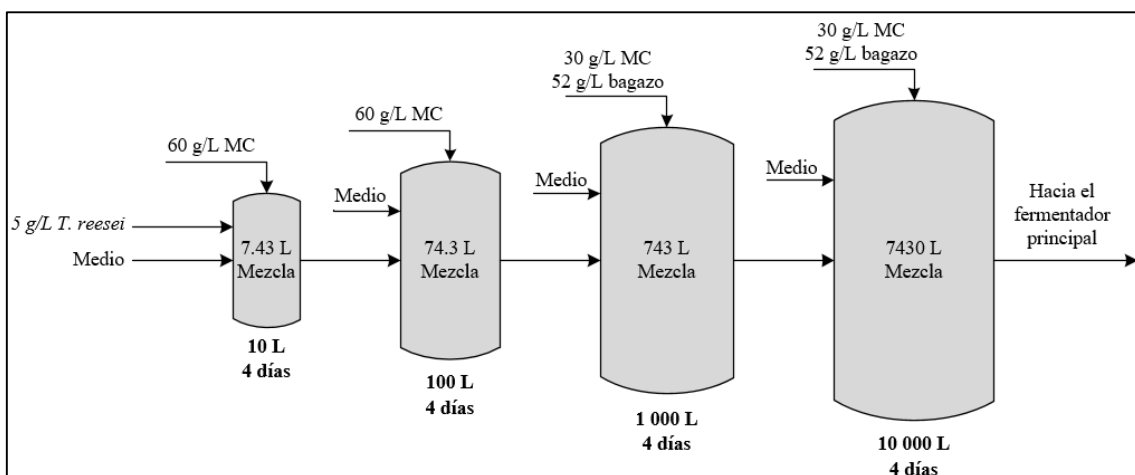


Figura 5.7 Condiciones de operación en el tren de siembra. Fuente: Elaboración propia.

5.3.3 Pretratamiento del bagazo de caña

Tomando como referencia el proceso de explosión de vapor estudiado por Rocha en [41], el pretratamiento del bagazo de caña se realiza en un contenedor a presión con vapor saturado a 190°C en una proporción de bagazo/vapor de 10 a 1. Luego de mantener el interior del tanque a 12.75 bar durante 20 minutos, éste se despresuriza súbitamente para lograr el efecto de explosión de vapor y así lograr la desestructuración de la matriz celular e incrementar la porosidad del material. Teniendo en cuenta que se alimenta vapor en una proporción de 1 a 10, se requieren 482 kg de vapor para tratar las 4.82 toneladas de bagazo determinadas anteriormente. Bajo las condiciones mencionadas el vapor saturado presenta un volumen específico de 0.1563 m³/kg [54], a partir de lo cual se calcula que se necesita un tanque de 75 m³ para el proceso de explosión de vapor descrito. Para evitar utilizar un tanque de estas dimensiones, se separa el pretratamiento del bagazo por lotes. Esto es posible ya que el tiempo de residencia en este tanque es significativamente menor que el tiempo de residencia en los fermentadores y por lo tanto no afectará la secuencia de las operaciones. Un número elevado de lotes resulta en un elevado consumo energético, mientras que un número bajo de lotes resulta en un tanque de dimensiones muy elevadas. Considerando ambos factores, se determinó que el pretratamiento se realizará en 5 lotes de 0.96 toneladas de bagazo en un tanque de 15 m³.

Al finalizar el proceso de explosión de vapor es necesario retirar los productos residuales que se encuentran adheridos a la superficie del bagazo pretratado mediante un proceso de lavado con agua. La etapa de lavado es importante ya que los azúcares, ácidos y otros compuestos separados en el pretratamiento pueden actuar como inhibidores durante el proceso de fermentación. Para lograr una buena remoción de estos compuestos se utiliza agua en una proporción de 5:1 como es sugerido por Miller en [55]. El bagazo pretratado se lava durante 2 horas en el mismo tanque donde ocurre el pretratamiento, que cuenta con una malla n°4 (4.76 mm, *U.S. STD Sieve*) para retener los sólidos y poder retirar los líquidos por la parte inferior.

5.3.4 Separación de sólidos de la mezcla de fermentación

Para obtener un rendimiento elevado en la separación de los sólidos de la mezcla de fermentación se utiliza una centrífuga de discos ya que esta cuenta con una elevada

área para la deposición de sólidos. En la Figura 5.8 se muestra gráficamente la relación hallada por Salte et al. [56] entre el contenido de sólidos en la mezcla de fermentación y el caudal máximo de operación en una centrífuga de discos a 7 200 rpm. La mezcla que sale del fermentador contiene aproximadamente un 9% de sólidos (< 5 cm), por lo cual el caudal máximo de operación es de 2 000 L/h. Considerando un volumen total de la mezcla de 24.79 m³, resulta en un tiempo de centrifugación de 12 h.

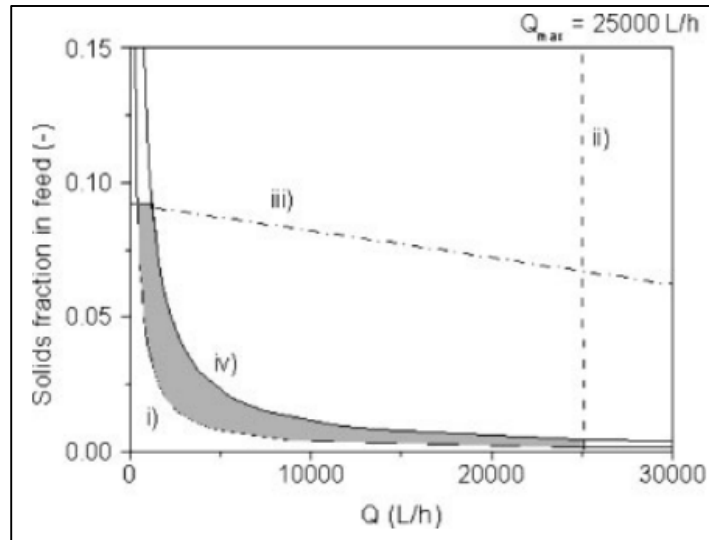


Figura 5.8 Caudal máximo de operación en una centrífuga de discos según la fracción de sólidos en la mezcla. Fuente: H. Salte et al. A Methodology for Centrifuge Selection for the Separation of High Solids Density Cell Broths by Visualisation of Performance Using Windows of Operation [56].

Este tiempo de centrifugación puede ser reducido de dos formas: utilizando centrífugas en paralelo o disminuyendo la fracción de sólidos en la alimentación. La segunda opción es la más viable ya que el uso de centrífugas en paralelo implicaría un costo elevado para esta etapa del proceso. Para disminuir la fracción de sólidos en la alimentación se utiliza un filtro de malla n°35 (0.5 mm, *U.S. STD Sieve*) antes de la centrífuga, donde se remueven la celulosa, hemicelulosa y lignina remanentes en la mezcla y se deja pasar principalmente la suspensión que contiene las células. De esta manera se logra reducir significativamente el contenido de sólidos en la alimentación a la centrífuga, con lo cual es posible operar con un caudal de hasta 10 000 L/h que corresponde a un tiempo de centrifugación de 3.1 horas.

5.3.5 Concentración de las enzimas

El volumen de la mezcla enzimática que llega a la sección de concentración por precipitación es de 24.79 m³. Teniendo en cuenta la cantidad de sulfato de amonio necesaria para alcanzar el 60% de saturación (Anexo 1) y que la concentración de la solución saturada es de 4.1 M o 542 kg/m³ [42], y asumiendo que el proceso de precipitación de celulasas no se ve afectado por la presencia de otras sustancias en la mezcla de fermentación, se calculó que se deben agregar 37.20 m³ de solución saturada a la solución enzimática para precipitar las proteínas no deseadas en la primera etapa del proceso de concentración. Esto hace un volumen total de 62 m³, que para efectos de diseño se distribuyen en dos tanques de mezclado de 31 m³ con dimensiones de 2.73 m de diámetro y 6.83 m de altura.

La suspensión, con un contenido de sólidos menor al 0.1%, se centrifuga a razón de 20 000 L/h por 3.1 horas a 7200 rpm. Esta velocidad de rotación permite la precipitación de los sólidos suspendidos y evita la desnaturalización de las proteínas de interés [57].

Para elevar la concentración de los 62 m³ de mezcla desde el 60% hasta el 80% de saturación se deben agregar 62 m³ de solución de sulfato de amonio 4.1 M, resultando en un volumen total de 124 m³ que se distribuye en cuatro tanques de mezclado de 31 m³.

La solución se centrifuga nuevamente con un caudal de alimentación de 20 000 L/h por 6.2 horas y el precipitado, que contiene las enzimas de interés, se solubiliza en otro tanque de mezclado con una solución buffer de fosfato a pH 7.0 para obtener una cocktail enzimático al 50% w/v [58].

5.3.6 Balance de masa del proceso

En el Anexo 3 se muestra el balance de masa del proceso por secciones. Para hacer los balances se realizaron las siguientes asunciones:

Sección 1: Tren de siembra

- La celulosa y el medio se consumen en su totalidad en los fermentadores de siembra [6]

- La cantidad de celulasas producidas en la siembra es mínima en relación con las que se producen en el fermentador principal

Sección 2: Pretratamiento, fermentación y separación de sólidos

- El bagazo ingresa al fermentador con un 50% de humedad
- En F-101 se separa el 100% de la materia lignocelulósica y en CF-101 el 100% de masa celular
- Se consideró una pérdida de proteínas del 10% en F-101 para tomar en cuenta la adhesión de las proteínas a la superficie de la materia lignocelulósica
- Se usó un factor de conversión de actividad enzimática a concentración de enzimas (FPU/mL a g/L) de 0.31 [38]

Sección 3: Concentración

- El 20.6% de las proteínas producidas son celulasas [59] y las proteínas restantes precipitan en la primera etapa de concentración y se separan en CF-102

A partir del balance de masa del proceso se determinó que, con las consideraciones mencionadas previamente, se obtienen 14.25 kg de celulasas por lote de producción. En cuanto a los residuos del proceso, la materia lignocelulósica que se separa en el filtro (corriente 35) es incinerada por razones de bioseguridad para evitar la propagación de los microorganismos y el sobrenadante de la última etapa de centrifugación (corriente 61), que contiene azúcares producto de la descomposición de la celulosa, puede ser tratado para fermentar los azúcares o ser utilizado como medio de nutrientes para el cultivo de microorganismos.

5.3.7 Consumo de utilidades en el proceso

Potencia de agitación

Las mezclas en el fermentador principal y en los fermentadores de siembra son mezclas no newtonianas de comportamiento pseudoplástico [60]. La agitación de estas mezclas se realiza a razón de 140 rpm [21]. Para el caso del fermentador principal, la

viscosidad aparente de la mezcla a una concentración promedio de sólidos de 30 g/L es de aproximadamente 100 Pa.s [59]. Para 24.79 m³ de mezcla con esta viscosidad, se seleccionó un agitador de paletas (Figura 5.9) como se sugiere en [61].



Figura 5.9 Agitador de paletas. Fuente: Trade India. Paddle Agitator [62].

La potencia requerida para la agitación de la mezcla se determina a partir de la correlación entre el número de potencia (N_p) y el número de Reynolds (N_{Re}), que se definen como:

$$N_p = \frac{P}{\rho N^3 D^5} \quad (\text{Ec. 17})$$

$$N_{Re} = \frac{D^2 N \rho}{\mu} \quad (\text{Ec. 18})$$

Donde P es la potencia requerida (W), ρ es la densidad de la mezcla (kg/m³), N es la velocidad de rotación del impulsor (rps), D es el diámetro del impulsor (m) y μ es la viscosidad del fluido (Pa.s) [60]. Asumiendo que la densidad de la mezcla es igual a la densidad del agua (1000 kg/m³) debido a la baja densidad aparente del bagazo, para una agitación a razón de 140 rpm con un impulsor de 1.64 m de diámetro (0.6 veces el diámetro del tanque) se obtiene:

$$N_{Re} = \frac{(1.64 \text{ m})^2 \left(140 \text{ rpm} \times \frac{1 \text{ min}}{60 \text{ s}}\right) \left(1000 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3}\right)}{100 \text{ Pa.s}} = 62.6$$

En la Figura 5.10 se muestra gráficamente la correlación entre N_{Re} y N_P para distintas condiciones de operación, siendo la curva 1 (superior) la que representa la correlación para fluidos pseudoplásticos. Para $N_{Re} = 62.6$, se tiene $N_p=2.5$. De la ecuación 17 se obtiene $P = 374 \text{ kW}$. Para 180 horas de operación, el consumo energético de FERM-101 es de 67 408 kWh. Escalando la potencia de agitación para los

fermentadores de siembra según su volumen y considerando 96 horas de operación a 140 rpm, se obtienen consumos de 11, 108, 1 075 y 10 750 kWh, haciendo un total de 79 352 kWh en el tren de fermentación.

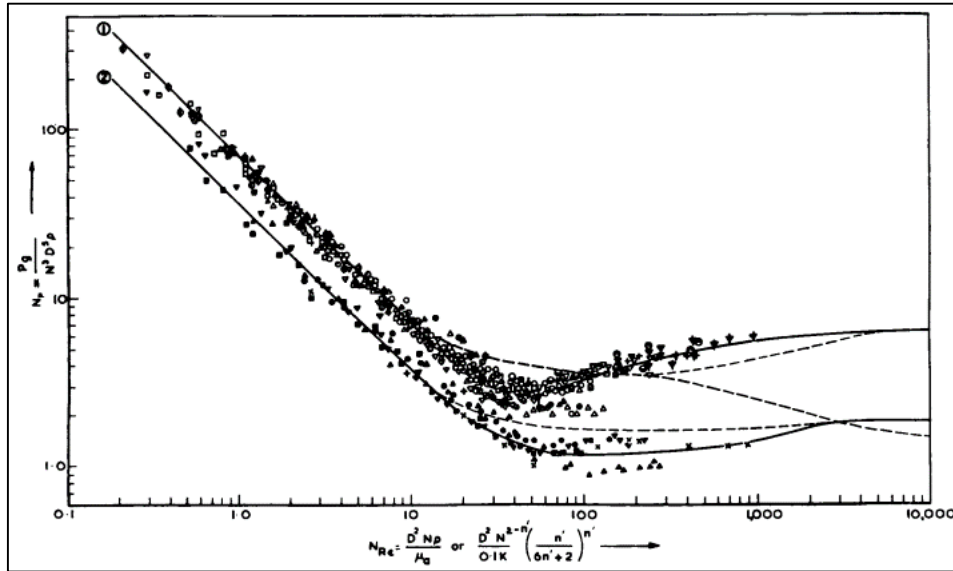


Figura 5.10 Correlación de potencia para fluidos no newtonianos. Fuente: V. Uhl y J. Gray. *Mixing Theory and Practice* [61].

Para el cálculo del consumo energético en la agitación de los tanques de mezclado TK-102 y TK-103 se consideró el uso de un impulsor de tipo hélice marina (Figura 5.11) con un diámetro igual a un tercio del diámetro del tanque, como se sugiere en [44] para la mezcla de soluciones de baja viscosidad en un tanque de esta capacidad.



Figura 5.11 Impulsor de tipo hélice marina. Fuente: Indiamart. *Propeller Agitator* [63]

Teniendo en cuenta que la densidad de la solución saturada de sulfato de amonio es de $1\,250\text{ kg/m}^3$ [42], para una agitación a razón de 1 200 rpm con un impulsor de 0.91 m de diámetro (1/3 del diámetro del tanque) se obtuvo:

$$N_{Re} = \frac{(0.91 \text{ m})^2 \left(1200 \text{ rpm} \times \frac{1 \text{ min}}{60 \text{ s}}\right) \left(1125 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3}\right)}{8.9 \times 10^{-4} \text{ Pa} \cdot \text{s}} = 2.09 \times 10^7$$

Bajo estas condiciones el sistema se encuentra en un régimen turbulento. En la Figura 5.12 se muestra gráficamente la correlación entre N_{Re} y N_p para distintas condiciones de operación, siendo la curva 2 la que representa el sistema seleccionado. Para regímenes altamente turbulentos el número de potencia es independiente de N_{Re} , con lo cual se tiene para este caso $N_p=0.25$. De la ecuación 17 se obtiene $P = 1.25 \text{ kW}$, que para la agitación de los 31 m^3 de mezcla resulta en 0.04 kW/m^3 y concuerda con los valores típicos de mezclado presentados en [44].

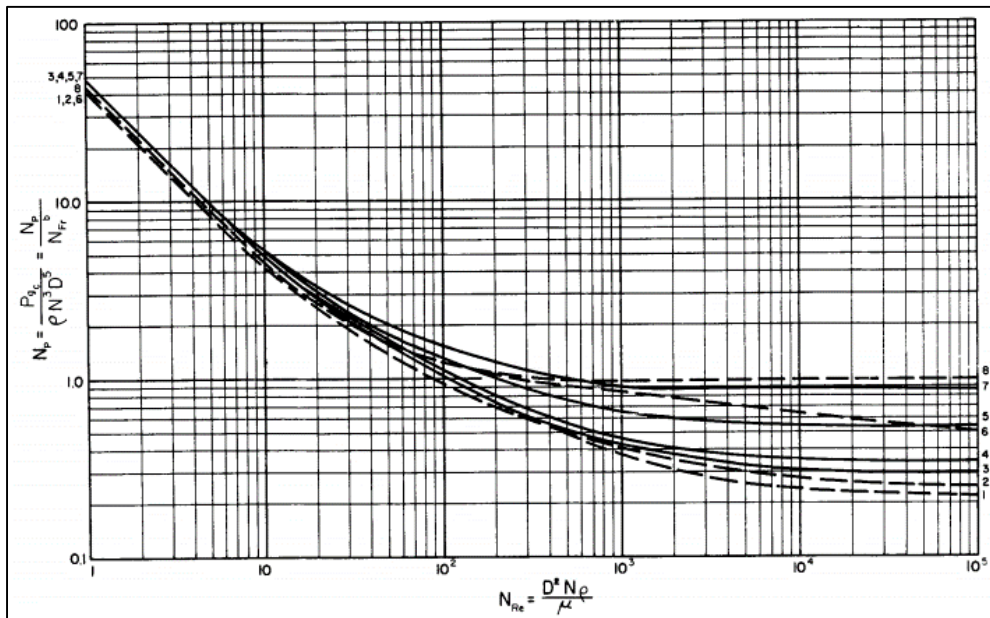


Figura 5.12 Correlación de potencia. Fuente: V. Uhl y J. Gray. *Mixing Theory and Practice* [61].

Para definir el tiempo de residencia de la mezcla en los tanques de precipitación, se debe tomar en cuenta tanto el tiempo de mezclado entre el agua y la solución de sulfato de amonio como el tiempo de precipitación de las enzimas. Para el cálculo del tiempo de mezclado se utiliza la correlación determinada por Van de Vusse [61] para el mezclado con impulsores de hélice marina en sistemas altamente turbulentos:

$$\left(\frac{\theta ND^2 p}{V}\right) \left(\frac{\rho D^2 N^2}{g Z_L \Delta \rho}\right)^{0.25} = 9 \quad (\text{Ec. 19})$$

Donde θ es el tiempo de mezclado (s), p es el *pitch* del impulsor (m) que se asume igual a su diámetro, V es el volumen de la mezcla (m^3), g es la aceleración debido a la gravedad

(m/s^2), Z_L es la altura de líquido en el tanque (m) y $\Delta\rho$ es la diferencia de densidades entre los fluidos (kg/m^3).

Resolviendo la ecuación 19 para θ , se determinó un tiempo de mezclado de 8 s. Es de esperar que el tiempo de mezclado sea corto ya que el sistema se encuentra en un régimen altamente turbulento que promueve la mezcla de ambas sustancias y además ambos fluidos presentan densidades similares.

En [64] se determinó un tiempo de 3 horas para la precipitación de celulosa utilizando una solución saturada de sulfato de amonio, con lo que el tiempo de mezclado se puede considerar despreciable. Sabiendo que el agitador opera con una potencia de 1.25 kW, esto representa un consumo energético de 3.75 kWh para la agitación de un tanque de mezclado. Tomando en cuenta las dos etapas de precipitación se tienen 6 operaciones de mezclado con el mismo volumen de trabajo y que en todas se aplican las mismas consideraciones mencionadas previamente, se asume que en los 6 tanques se tiene un consumo energético de 3.75 kWh, haciendo un consumo total de 22.5 kWh en los tanques de mezclado de la etapa de concentración.

Potencia de centrifugación

El consumo energético de las centrífugas se calculó según la data provista en [65] para centrífugas con las características requeridas para este proceso. De esta manera, para una capacidad de 10 000 L/h en CF-101 se requieren 9.25 kW de potencia mientras que para una capacidad de 20 000 L/h en CF-102 se requieren 18.5 kW de potencia. La centrífuga CF-101 se opera por 3.1 horas, mientras que CF-102 se opera primero por 3.1 horas y luego por 6.2 horas, con lo que se tiene un gasto energético total de 200 kWh en las tres operaciones de centrifugación.

Esterilización de los biorreactores

Para asegurar la condición aséptica de los fermentadores, es necesario realizar una operación de esterilización previa a su uso. Para esto, se inyecta vapor a 120°C y 15 psi [66] por un lapso de 15 minutos y luego se despresuriza el contenedor. Sabiendo que a las condiciones mencionadas el vapor tiene un volumen específico de 0.8913 m^3/kg [54],

se calcula la demanda de vapor para la esterilización de los fermentadores de siembra y el fermentador principal según el volumen de cada contenedor. Estos resultados se muestran en la Tabla 5.2.

| Reactor | Volumen (L) | Demanda de vapor (kg) |
|--------------|-------------|-----------------------|
| SF-101 | 10 | 0.01 |
| SF-102 | 100 | 0.11 |
| SF-103 | 1000 | 1.12 |
| SF-104 | 10000 | 11.22 |
| FERM-101 | 33000 | 37.02 |
| Total | | 49.49 |

Tabla 5.2 Demanda de vapor para la esterilización de los fermentadores. Fuente: Elaboración propia.

Control de temperatura

Es importante que la temperatura dentro del fermentador principal se mantenga constante en aproximadamente 26°C para promover la producción enzimática, por lo cual el equipo debe contar con un sistema de enfriamiento para asegurar esta condición debido a la naturaleza exotérmica de la fermentación. Para determinar la cantidad de energía que se debe remover del sistema para mantener una temperatura constante, se consideró una entalpía de reacción de $\Delta\bar{H} = -86.9$ kJ/mol para la formación de celulasas [67] y una masa molar del producto de 42 000 g/mol [68]. Así, para la formación de 15.83 kg de celulasas durante la fermentación se generan:

$$E_{generada} = 89.9 \frac{kJ}{mol \text{ celulasa}} \times \frac{15830 \text{ g celulasa}}{42\,000 \frac{g \text{ celulasa}}{mol \text{ celulasa}}} = 32.75 \text{ kJ}$$

Para este cálculo se consideró solo la liberación de energía debido a la producción de celulasas. Sin embargo, existen otras reacciones en paralelo donde se producen proteínas y otras sustancias que no son de interés para el proceso pero que deben tomarse en cuenta para el enfriamiento del sistema. Asumiendo que la masa molar y la entalpía de reacción para la formación de otras proteínas es similar a la de las celulasas, y sabiendo que estas últimas representan el 20.6% del total de proteínas producidas [57], se obtiene un total de:

$$E_{generada} = \frac{32.75 \text{ kJ}}{0.206} = 159 \text{ kJ}$$

Haciendo un balance de energía en el fermentador:

$$E_{entrada} - E_{salida} + E_{generada} = \Delta E$$

Para mantener la temperatura constante se debe cumplir $\Delta E = 0$ kJ. Se calcula el cambio de temperatura de la mezcla de fermentación aproximando el calor específico de la mezcla al del agua:

$$m_{agua}h_{entrada} - m_{agua}h_{salida} + E_{generada} = 0$$

$$E_{generada} = m_{agua}c_{p,mezcla}\Delta T$$

$$\Delta T = \frac{E_{generada}}{m_{agua}c_{p,mezcla}} = \frac{159 \text{ kJ}}{(24790 \text{ kg}) \left(4.184 \frac{\text{kJ}}{\text{kg} \cdot ^\circ\text{C}}\right)} = 0.00153^\circ\text{C}$$

Este cambio de temperatura no es significativo, por lo cual no sería necesario incluir una corriente continua de agua de enfriamiento por la chaqueta del fermentador.

El proceso de mezclado en la etapa de concentración involucra un cambio de energía debido a la disolución del sulfato de amonio en la solución enzimática. En la primera etapa de concentración se requieren 10 081 kg de sulfato de amonio para alcanzar el 60% de saturación en una mezcla de 31 m³. La entalpía de solución del sulfato de amonio es de $\Delta\bar{H}_{sol} = +6.57 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$ [69], por lo tanto la energía absorbida por este proceso endotérmico es de:

$$\Delta H_{sol} = 6.57 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}} \times 10\,081 \text{ kg} \times \frac{1 \text{ mol}}{0.1324 \text{ kg}} = 500\,243 \text{ kJ}$$

Tratando al tanque de mezclado como un sistema aislado, la energía absorbida por el proceso de disolución debe ser igual a la energía que pierde la mezcla. Asumiendo que el calor específico de la mezcla es igual al calor específico del agua, se calcula el cambio de temperatura debido a la disolución de la sal:

$$\Delta E_{mezcla} = -\Delta H_{sol}$$

$$m_{mezcla}c_{p,mezcla}\Delta T = -\Delta H_{sol}$$

$$\Delta T = \frac{-500\,243\text{ kJ}}{31\,000\text{ kg} \times 4.184 \frac{\text{kJ}}{\text{kg}\cdot^{\circ}\text{C}}} = -3.86^{\circ}\text{C}$$

El descenso de temperatura en la primera etapa de concentración es de 3.86°C. Repitiendo los cálculos para la segunda etapa de concentración, la disminución de temperatura es de 3.21°C. Considerando que en el proceso no se alimenta sulfato de amonio sólido sino en una solución saturada, la variación de temperatura es aún menor. En [64] se determinó que el tiempo de precipitación de las celulasas no varía de manera significativa con la temperatura, con lo cual se concluye que en este caso no se requiere un sistema de control de temperatura ya que la variación es mínima y esta no afecta al rendimiento del proceso.

5.4 Evaluación económica

5.4.1 Inversión de capital (CAPEX)

Para el cálculo de la inversión de capital fue necesario determinar primero el costo de compra de los equipos principales (PC, *Purchase cost*). Estos costos se muestran en la Tabla 5.3.

| Ítem | Capacidad | Costo unitario (US\$) | Cantidad | Referencia |
|-----------------------|--------------------|-----------------------|----------|------------|
| SF-102 | 0.1 m ³ | 19 322 | 1 | [44] |
| SF-103 | 1 m ³ | 33 273 | 1 | [44] |
| SF-104 | 10 m ³ | 103 195 | 1 | [44] |
| FERM-101 | 33 m ³ | 217 321 | 1 | [44] |
| TK-101 | 15 m ³ | 77 463 | 1 | [44] |
| CF-101 | 10 000 L/h | 169 696 | 1 | [43] |
| CF-102 | 20 000 L/h | 296 968 | 1 | [43] |
| TK-102, 103, 104, 105 | 40 m ³ | 89 430 | 4 | [43] |
| Total | | 1 274 957 | | |

Tabla 5.3 Costo de compra de los equipos principales. Fuente: Elaboración propia.

Sabiendo que el PC para el proceso propuesto es de \$1 274 957, se calcularon los costos directos (DC, *direct costs*), costos indirectos (IC, *indirect costs*) y otros costos

asociados (OC, *other costs*) utilizando los porcentajes indicados en la Tabla 4.2. Estos costos se muestran en la Tabla 5.4.

| Ítem | Costo (US\$) |
|----------------------------|------------------|
| Equipos no listados | 254 991 |
| Instalación | 382 487 |
| Tuberías | 446 235 |
| Instrumentación | 509 983 |
| Aislamiento | 38 249 |
| Sistemas eléctricos | 127 496 |
| Instalaciones | 573 731 |
| Mejora del terreno | 191 244 |
| Facilidades auxiliares | 509 983 |
| Total DC | 4 309 354 |
| Ingeniería | 1 077 339 |
| Construcción | 1 508 274 |
| Total IC | 2 585 612 |
| Honorarios del contratista | 344 748 |
| Contingencias | 689 497 |
| Total OC | 1 034 245 |
| Total FCI | 9 204 168 |

Tabla 5.4 Costos directos (DC), costos indirectos (IC) y otros costos (OC) asociados al proceso.
Fuente: Elaboración propia.

Una vez calculado el FCI como la suma de todos los componentes listados en la Tabla 5.4, se determinó el capital de trabajo considerando que este representa el 15% del CAPEX, con lo que se obtuvo un capital de trabajo de \$1 624 265. Así, se obtuvo un CAPEX de \$10 828 433 para el proceso de producción de celulasas propuesto.

5.4.2 Costos de operación (OPEX)

Costos variables

Para el cálculo del OPEX se determinaron los costos variables y costos fijos involucrados en el proceso. Para los costos variables se calcularon la demanda y el costo de materias primas y utilidades en cada lote de producción, los cuales se muestran en las

Tablas 5.5 y 5.6 respectivamente. Dentro de las utilidades no se considera el aire que se alimenta a los fermentadores ya que se asume que este recurso está disponible libremente [44] y los filtros y compresores necesarios para su esterilización y distribución se incluyeron dentro de los equipos no listados (Tabla 5.4). Asimismo, dentro de las utilidades se incluye el manejo de residuos sólidos y efluentes del proceso. Los residuos sólidos corresponden a la materia lignocelulósica retenida en F-101 y a las células y proteínas descartadas en la centrifugación, mientras que para los efluentes se considera el agua residual de la explosión de vapor y el sobrenadante de la centrifugación.

| Materia prima | Cantidad (kg) | Costo unitario (\$/kg) | Costo (US\$) |
|---|----------------------|-------------------------------|---------------------|
| (NH ₄) ₂ SO ₄ (medio) | 41 | 0.28 [70] | 11.35 |
| Glicerina | 21 | 1.75 [70] | 36.18 |
| MgSO ₄ | 8 | 1.89 [70] | 15.60 |
| CaCO ₃ | 21 | 0.66 [70] | 13.62 |
| KH ₂ PO ₄ | 50 | 1.40 [71] | 69.34 |
| Polisorbato 80 | 17 | 2.00 [72] | 33.02 |
| Licor de maíz | 140 | 0.50 [73] | 70.17 |
| Celulosa microcristalina | 250 | 3.67 [74] | 917.84 |
| Bagazo de caña | 4820 | 0.05 [75] | 242.30 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ (precipitación) | 53766 | 0.10 [70] | 5215.30 |
| NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O | 0.02 | 2.90 [70] | 0.05 |
| Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O | 0.04 | 2.20 [70] | 0.10 |
| Total | | | 6 624.86 |

Tabla 5.5 Demanda y costo de materias primas por lote de producción. Fuente: Elaboración propia.

| Utilidades | Operación | Cantidad | Precio unitario | Costo (US\$) |
|----------------------------|-----------------|------------|---------------------|--------------|
| Vapor | Pretratamiento | 0.482 ton | US\$ 12/ton [46] | 5.78 |
| | Esterilización | 0.049 ton | | 0.59 |
| Electricidad | Tren de siembra | 11 944 kWh | US\$ 0.074/kWh [46] | 884 |
| | Fermentación | 79 352 kWh | | 5872 |
| | Concentración | 22.5 kWh | | 1.66 |
| | Centrifugación | 200 kWh | | 14.80 |
| Agua de proceso | Tren de siembra | 7.01 ton | US\$ 0.53/ton [47] | 3.71 |
| | Fermentación | 14.36 ton | | 7.61 |
| | Concentración | 99.20 ton | | 52.58 |
| Manejo de residuos sólidos | Filtración | 1.483 ton | US\$ 36/ton [47] | 53.39 |
| | Centrifugación | 1.295 ton | | 46.62 |
| Manejo de efluentes | Pretratamiento | 0.482 ton | US\$ 0.53/ton [47] | 0.25 |
| | Centrifugación | 123 ton | | 65.19 |
| Total | | | | 7 008 |

Tabla 5.6 Demanda y costo de utilidades por lote de producción. Fuente: Elaboración propia.

Costos fijos

Dentro de los costos fijos de operación se consideraron los costos de mantenimiento de los equipos, seguros, impuestos, mano de obra y laboratorios de control de calidad. Como se mencionó anteriormente, el costo de mantenimiento de los equipos se aproximó como el 10% del PC mientras que los costos de seguros e impuestos se aproximaron como el 1 y 2% del FCI respectivamente [46]. Para el cálculo del costo de mano de obra se consideraron 27 operadores en turnos de 8 horas durante 330 días laborables al año, con lo cual se obtuvo una demanda anual de 71 280 horas-hombre. Asumiendo un costo base de mano de obra de US\$ 6/h, se calculó un costo total de mano de obra de US\$ 983 664 incluyendo beneficios, supervisión, suministros y gastos

administrativos. El costo de los laboratorios y control de calidad se aproximó como el 15% del costo total de mano de obra [46]. Estos resultados se muestran en la Tabla 5.7.

| Ítem | Costo (US\$) |
|-----------------------------------|------------------|
| Mantenimiento | 276 739 |
| Seguros | 199 783 |
| Impuestos | 399 568 |
| Mano de obra | 983 664 |
| Laboratorios y control de calidad | 147 550 |
| Total | 4 814 094 |

Tabla 5.7 Costos fijos de operación. Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 5.13 se muestra la distribución de los costos de producción, donde se observa que los costos fijos representan el 42%, las materias primas el 28% y las utilidades el 30%. Esta distribución de los costos de producción concuerda con lo determinado en estudios similares como el de Ferreira et al. [7].

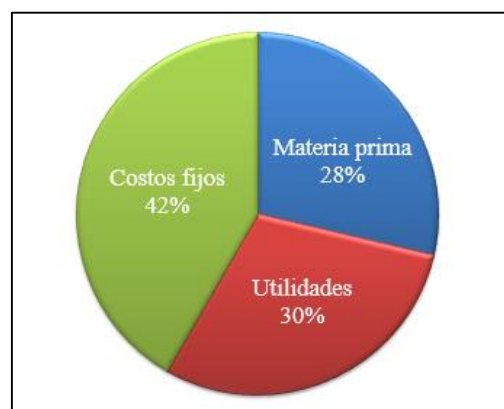


Figura 5.13 Distribución de los costos de producción. Fuente: Elaboración propia.

5.4.3 Depreciación

La depreciación de los equipos utilizados en el proceso se calculó utilizando el método MACRS (*Modified accelerated cost recovery system*) para la recuperación acelerada de este costo. Para esto se consideró un período de recuperación de 5 años y se calculó la depreciación en los primeros seis años de operación como porcentajes del FCI

definidos en [47]. La depreciación en los primeros años de operación se muestra en la Tabla 5.8.

| Año | % de FCI | Depreciación (US\$) |
|-----|----------|---------------------|
| 1 | 20 | 1 840 833 |
| 2 | 32 | 2 945 333 |
| 3 | 19.2 | 1 767 200 |
| 4 | 11.52 | 1 060 320 |
| 5 | 11.52 | 1 060 320 |
| 6 | 5.76 | 530 160 |

Tabla 5.8 Depreciación en los primeros seis años de operación. Fuente: Elaboración propia.

5.4.4 Planificación del proceso (*Scheduling*)

Para determinar el número de lotes que se producen al año se realizó la planificación o *scheduling* del proceso. Esto consistió en identificar en qué instante se empieza a producir el siguiente lote tomando en cuenta la disponibilidad de los equipos que se tienen así como los tiempos de operación, carga, descarga y limpieza de cada uno.

En la Figura 5.14 se muestra el *scheduling* para el caso base, en el cual se cuenta con los equipos listados en la Tabla 5.3. La escala de esta gráfica fue ajustada para poder observar de manera esquemática el tiempo durante el cual cada equipo está siendo utilizado (incluyendo la operación y la limpieza y preparación para el siguiente lote). Los distintos colores representan diferentes lotes de producción y a partir de esto se determinó que en este caso se tiene un tiempo de 191 horas entre cada lote, que equivale a 41 lotes al año y una producción anual de 591 kg de celulosas.

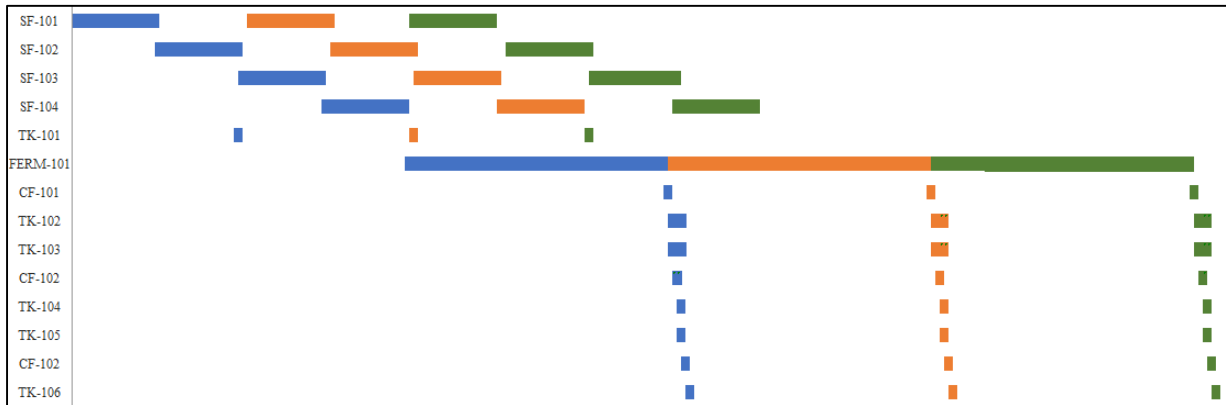


Figura 5.14 *Scheduling* del proceso para el caso base. Fuente: Elaboración propia.

Con el objetivo de optimizar el proceso y lograr producir un mayor número de lotes anuales fue necesario identificar la etapa limitante. En el caso base se identificó como etapa limitante la fermentación en FERM-101 ya que este equipo mostró el menor tiempo de inactividad entre lotes [48], por lo cual el siguiente paso fue observar el cambio en el *scheduling* al agregar un fermentador (FERM-102) para operar en paralelo a FERM-101. La nueva secuencia de operaciones se muestra en la Figura 5.15. Se determinó que con esta ampliación se logró reducir el tiempo de cada lote a 95 horas, lo que equivale a 83 lotes y 1 188 kg de celulasas al año. Esto representa un incremento en la producción de más del 100% con respecto a la capacidad determinada en el caso anterior.

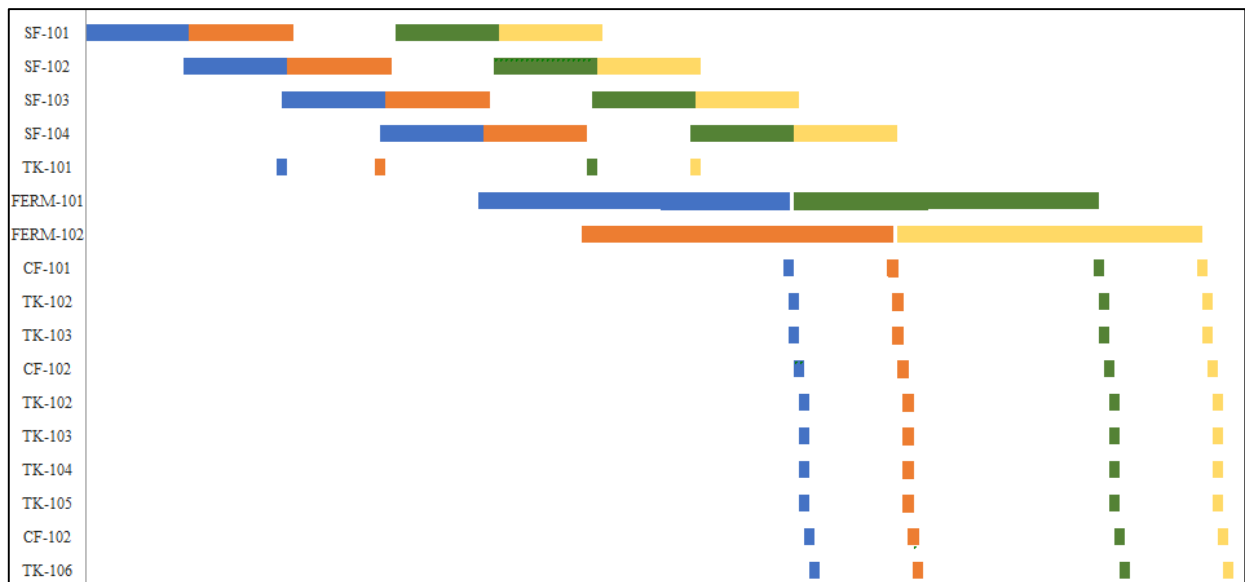


Figura 5.15 *Scheduling* del proceso para el caso con dos fermentadores. Fuente: Elaboración propia.

A partir de la figura anterior se identificó que la etapa limitante del proceso se ubicaba en los fermentadores de siembra, por lo cual el siguiente paso fue agregar una nueva serie de fermentadores de siembra. En la Figura 5.16 se muestra el caso con dos fermentadores principales y dos trenes de siembra. En este caso se tiene un tiempo de 91 horas por lote, equivalente a 87 lotes y 1240 kg de celulasas al año.

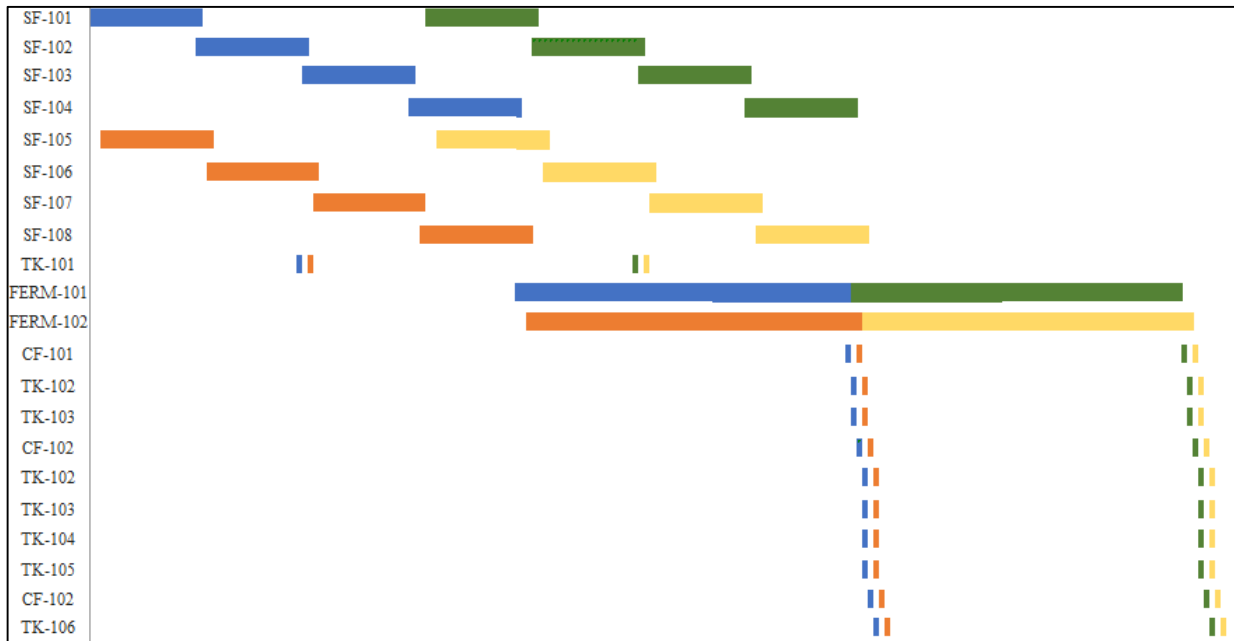


Figura 5.16 *Scheduling* del proceso para el caso con dos fermentadores principales y dos trenes de siembra. Fuente: Elaboración propia.

De la misma forma que se procedió anteriormente, el siguiente paso en la optimización del proceso sería agregar un nuevo fermentador FERM-103, pero debido a que previamente no se observó una diferencia significativa entre los casos analizados en las Figuras 5.15 y 5.16 se concluyó que la adición de un fermentador principal debe ir acompañada de la adición de un tren de siembra. Por esta razón, se analizaron también los escenarios con tres, cuatro y cinco fermentadores principales (FERM) y trenes de siembra (TS). En la Tabla 5.9 se resumen los resultados obtenidos a partir del *scheduling* del proceso en los diferentes casos mencionados.

| Caso | Tiempo por lote (h) | Lotes al año | Producción de celulasas (kg/año) |
|---------------|----------------------------|---------------------|---|
| 1 FERM y 1 TS | 191 | 41 | 591 |
| 2 FERM y 1 TS | 95 | 83 | 1188 |
| 2 FERM y 2 TS | 91 | 87 | 1240 |
| 3 FERM y 3 TS | 63 | 125 | 1782 |
| 4 FERM y 4 TS | 47 | 168 | 2389 |
| 5 FERM y 5 TS | 38 | 208 | 2970 |

Tabla 5.9 Resultados del *scheduling* para los casos con distintas cantidades de fermentadores principales (FERM) y trenes de siembra (TS). Fuente: Elaboración propia.

De este análisis se concluyó que es posible disminuir el tiempo entre lotes para incrementar la producción anual de enzimas al agregar más recursos al proceso de tal forma que se logra utilizar al máximo cada recurso y se minimiza el tiempo de inactividad de los equipos. Sin embargo, la adición de equipos implica un incremento en el CAPEX del proceso, que finalmente impacta al costo unitario de producción de las enzimas. En la siguiente sección se evalúa el impacto del incremento de la producción anual de celulasas a costas de un aumento en el CAPEX según el costo unitario de producción y los indicadores económicos obtenidos para cada caso.

Cabe resaltar que en todos los casos presentados anteriormente se varía solo el número de equipos para la fermentación y en los trenes de siembra, mas no en el pretratamiento del bagazo ni en la sección de concentración. Esto se debe a que los tiempos de residencia en estos últimos son relativamente cortos a comparación de los tiempos en la fermentación y el tren de siembra, por lo cual no es necesario agregar más equipos en estas secciones ya que no representan una etapa limitante para el proceso. Es posible introducir más equipos en estas secciones para reducir el tiempo de cada lote, pero esta reducción es mínima y no justifica la inversión de capital para la compra de los equipos.

5.4.5 Costo unitario de producción

El costo unitario de producción fue calculado en función al CAPEX y OPEX del proceso, así como a la producción anual de celulasas. En la sección anterior se plantearon

escenarios con distintas cantidades de equipos de fermentación (reactor principal y trenes de siembra) lo que permitió incrementar el número de lotes que se realizan en un año y por lo tanto también la producción anual de enzimas. Se calculó el costo unitario de producción para cada caso según la ecuación 16 y los resultados se muestran en la Figura 5.17. En esta gráfica se observa que se logró reducir el costo unitario de producción a medida que se incrementó la producción anual de enzimas.

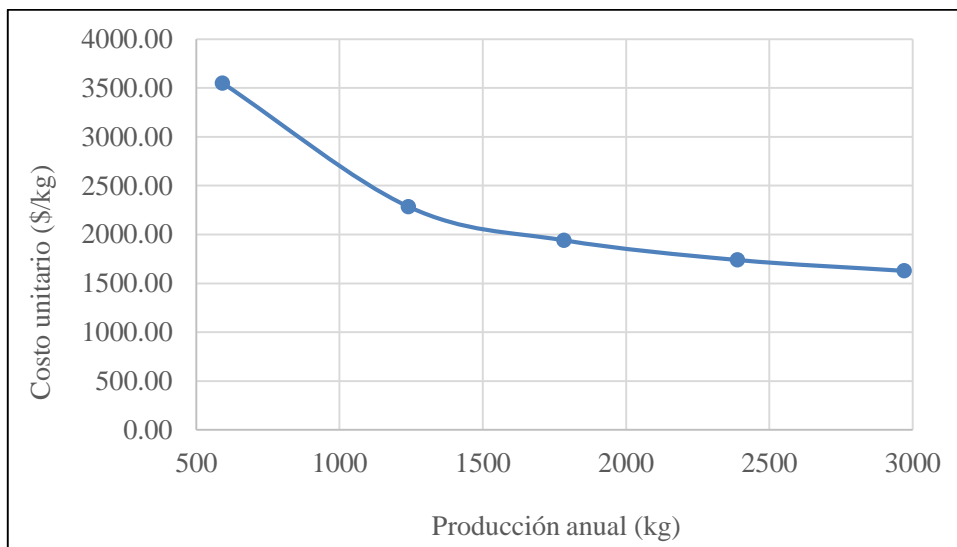


Figura 5.17 Costo unitario de producción según la producción anual de celulasas.
Fuente: Elaboración propia.

Para realizar una comparación con las enzimas comerciales que se utilizan actualmente en la industria, se tomó como referencia el cocktail enzimático Cellic Ctec2 de Novozymes con una actividad de 113 FPU/mL cuyo precio de venta en abril de 2021 es de US\$ 129.34 por 50 mL de producto [76]. Considerando una densidad de 1.15 g/mL y una concentración del 40% según lo reportado para este producto, esta enzima comercial tiene un costo de US\$ 5 623/kg. En la Tabla 5.10 se muestran los costos de producción por kg de proteína en cada caso para ser comparados con el costo de Cellic Ctec2. Cabe mencionar que el costo reportado para Cellic Ctec2 es el precio de venta del producto, y que su costo de producción debe ser menor. Si bien se desconoce este costo de producción, los resultados obtenidos muestran que es posible producir celulasas a un costo significativamente menor al precio de venta de las enzimas comerciales, lo cual resultaría atractivo para reducir costos en una biorrefinería que utiliza estas enzimas como insumo para otros procesos. Asimismo, es importante resaltar que el cocktail enzimático producto del proceso planteado tiene una actividad de 160 FPU/mL, que es mayor a la de

Cellic Ctec2, con lo cual la diferencia resulta aún mayor ya que se logró obtener un producto con mayor actividad a un menor costo.

| Caso | Costo de producción (US\$/kg) |
|---------------|-------------------------------|
| 1 FERM y 1 TS | 3551 |
| 2 FERM y 2 TS | 2303 |
| 3 FERM y 3 TS | 1942 |
| 4 FERM y 4 TS | 1740 |
| 5 FERM y 5 TS | 1629 |

Tabla 5.10 Costo unitario de producción para los distintos casos. Fuente: Elaboración propia.

El costo unitario de producción obtenido en estos escenarios fue significativamente mayor al que se determinó en otras investigaciones como la de Zhuang et al. [6] para la producción de celulasas a partir de residuos lignocelulósicos. Esto se debe a que en esta investigación se consideraron parámetros conservadores como una fracción de celulasas en las proteínas del 20.6% y una pérdida de enzimas del 10% aguas abajo de la fermentación debido a su adhesión sobre la materia lignocelulósica removida, en comparación con [6] donde no se consideraron pérdidas de celulasas durante el proceso y se asumió que estas fueron las únicas proteínas producidas durante la fermentación. Asimismo, en esta investigación se despreció la producción enzimática durante el cultivo en el tren de siembra.

Si bien el costo unitario calculado fue menor al precio de venta de enzimas comerciales, es posible disminuir este costo aún más. Una manera de incrementar el rendimiento de la fermentación sería realizar modificaciones genéticas a las células de *T. reesei* para que puedan fermentar el bagazo a mayores temperaturas aumentando su metabolismo y de esta manera alcanzar una mayor actividad enzimática en un menor tiempo. En el Capítulo VI se discuten diversas alternativas a evaluar para reducir el costo de producción de estas enzimas.

5.4.6 Índices de rentabilidad (VAN y TIR)

El flujo de caja para el caso base (1 FERM y 1 TS) se muestra en el Anexo 4. Para construir el flujo de caja para el proyecto se consideró un precio de venta igual al doble del costo de producción, un CPPC de 16% [47] y una tasa de impuestos del 26% [49].

Asimismo, se analizó un período de operación de 20 años y se asumió que el total del CAPEX se invierte un año antes del inicio de este período. Según los resultados de los flujos de caja para cada caso analizado, se calcularon el valor actual neto (VAN) y la tasa interna de retorno (TIR) de la inversión. Estos resultados se ilustran en la Figura 5.18.

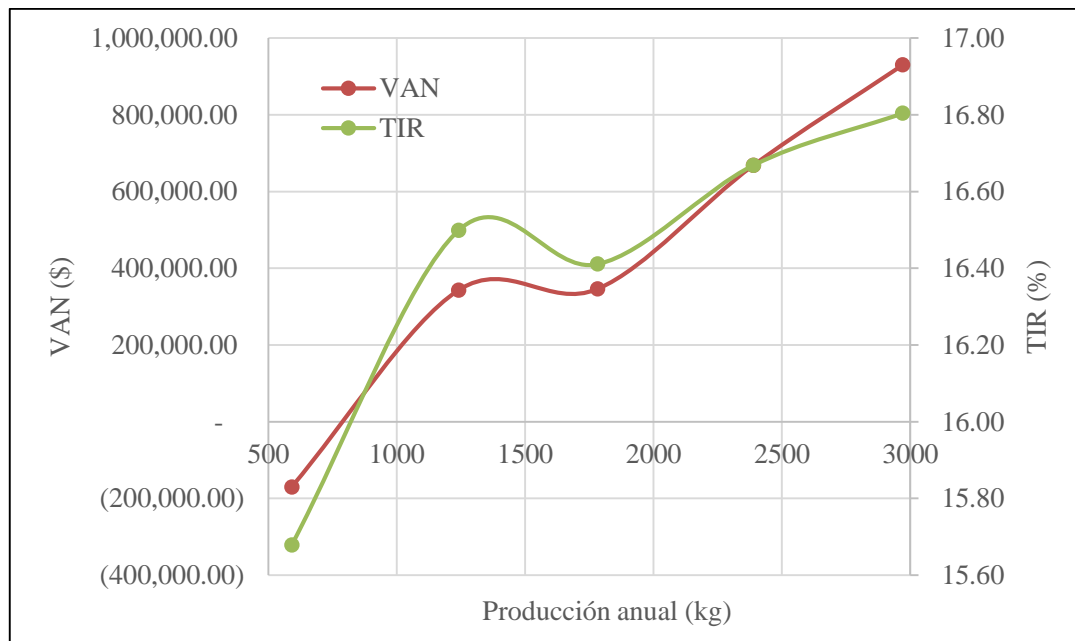


Figura 5.18 Índices de rentabilidad (VAN y TIR) según la producción anual. Fuente: Elaboración propia.

De la gráfica anterior se concluye que la inversión en este proyecto resulta atractiva para capacidades de producción mayores a los 800 kg/año ya que se tiene un VAN positivo y una TIR mayor al CPPC de 16%. Ambos indicadores mostraron una tendencia a incrementar con la producción anual, de lo cual se infiere que para capacidades mayores a las analizadas se alcanzarían mayores índices de rentabilidad.

Como se mencionó anteriormente, para el cálculo de los índices de rentabilidad de asumió un precio de venta igual al doble del costo de producción. A medida que aumenta la producción anual y disminuye el costo de producción es posible incrementar el margen de ganancia ofreciendo un precio mayor al doble del costo de producción, con lo cual el VAN y la TIR del proceso planteado serán mayores. Tomando el caso con 5 FERM y 5 TS, es posible tener un precio de venta igual a 2.5 veces el costo de producción sin superar al precio de la enzima comercial Cellic Ctec2, con lo cual se tendría un VAN de US\$ 11 690 000 y una TIR de 25.65%. Sin embargo, es necesario conocer la demanda que se tiene por el producto para saber hasta qué punto es posible incrementar la producción anual de celulasas sin que supere a la demanda del mercado.

CAPÍTULO VI

RECOMENDACIONES

En esta sección se detallan algunas recomendaciones a tomar en cuenta para trabajos futuros acerca de la producción de celulasas a partir de bagazo de caña con el objetivo de lograr reducir los costos obtenidos en esta investigación.

1. Es importante validar los modelos cinéticos de Ma et al. [38] utilizando bagazo de caña y *T. reesei* local, ya que las propiedades de ambos podrían variar con respecto al estudio de Ma et al. De ser necesario, se deben ajustar los parámetros cinéticos según los resultados experimentales, para así poder realizar las simulaciones con los nuevos parámetros. De esta manera se obtendrían nuevos tiempos de fermentación y de alimentación, mientras que las operaciones sucesivas no presentarían cambios significativos.
2. En la Tabla 5.6 se observa que el consumo energético en los fermentadores representa un costo significativo dentro de los costos por utilidades ya que la agitación de las mezclas de fermentación demanda una elevada potencia según lo calculado en la sección 5.3.7. Para minimizar la potencia requerida en estas operaciones, se recomienda estudiar la relación entre la concentración de sólidos en el fermentador y la potencia de agitación. Por un lado, concentraciones bajas de sólidos resultan en una menor potencia de agitación a costa de un mayor tiempo de reacción para alcanzar la actividad enzimática deseada, mientras que concentraciones elevadas reducen el tiempo de fermentación pero requieren una mayor potencia de agitación. La optimización de esta relación escapa del alcance de esta investigación, pero da paso a estudios futuros para reducir los costos operativos.
3. Se recomienda evaluar el uso de sulfato de amonio sólido en lugar de la solución saturada para el proceso de concentración de las enzimas con el objetivo de disminuir el costo de producción. El uso de la sal en estado sólido reduciría la demanda de esta materia prima en un 20% ya que el volumen total de la mezcla permanecería casi

constante. Sin embargo, al agregar la sal sólida la alimentación debe ser más lenta para evitar condiciones severas que no permitan la precipitación de las proteínas deseadas, por lo cual el tiempo requerido para esta etapa sería mayor que en el caso con la solución saturada y resultaría en una menor cantidad de lotes producidos anualmente. La determinación de las mejores condiciones de alimentación de sulfato de amonio para minimizar la demanda de la sal y el tiempo de operación debe realizarse de manera experimental para poder llevar los resultados a una escala industrial y así reducir el costo de producción de las enzimas.

4. Es necesario evaluar la viabilidad del proceso de producción de bioetanol de segunda generación utilizando las enzimas obtenidas por el proceso diseñado, para así poder avanzar hacia una biorrefinería integrada. De manera similar, se recomienda evaluar diversas aplicaciones para la valorización de los subproductos (principalmente lignina y azúcares reductores).
5. Se recomienda evaluar la producción de las enzimas *on-site*, para así eliminar los costos asociados a la compra del bagazo de caña. En este escenario se podría pasar a considerar el cocktail enzimático producido como un insumo para la producción de bioetanol de segunda generación en la misma planta en lugar de un producto para la venta. De ser este el caso, se debe llevar a cabo un estudio de optimización para determinar la relación que debe haber entre la cantidad de bagazo que se destina a la producción de enzimas y la que se destina a la producción de bioetanol.
6. Por último, se recomienda evaluar el escalamiento del proceso de fermentación secuencial propuesto por Florencio et al. en [26], en vista de que los resultados a escala de laboratorio demostraron que este proceso permite obtener mayores actividades enzimáticas.

CONCLUSIONES

1. La simulación de la cinética de la producción enzimática permitió predecir los resultados de la fermentación para distintas condiciones iniciales de sustrato y modos de operación. Entre los escenarios analizados, se determinó que la mejor estrategia de operación para obtener la actividad enzimática deseada fue iniciar una concentración de bagazo de 52 g/L con alimentaciones a las 70 y 120 horas, operando por 180 horas para alcanzar una actividad de 10 FPU/mL en la mezcla de fermentación.
2. Los balances de materia del proceso permitieron dimensionar y determinar las condiciones de operación en las unidades de separación y concentración aguas abajo de la fermentación para obtener el producto final con 160 FPU/mL. De manera similar, los balances de energía permitieron determinar el consumo energético de los equipos y descartar la necesidad de incluir un sistema de control de temperatura.
3. Se realizó la evaluación económica del proceso propuesto para capacidades de producción desde 591 hasta 2970 kg de celulasas por año según se determinó a partir del scheduling del proceso. Para la mayor capacidad de producción se calculó un costo unitario de US\$ 1621/kg y una TIR de 16.7%, lo cual indica que el proceso es rentable considerando que aún puede ser optimizado.
4. El proceso propuesto para la producción de enzimas celulolíticas a partir de bagazo de caña residual resulta de gran importancia para alcanzar la viabilidad económica de la producción de bioetanol como fuente de energía renovable. En esta tesis se calculó un costo de producción de celulasas menor al precio de venta de las enzimas comerciales, con lo cual se concluye que sería posible integrar el proceso diseñado a una planta de producción de bioetanol para reducir los costos relacionados a la compra de enzimas comerciales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] S. Sajith, P. Priji, S. Sreedevi y S. Benjamin, “An Overview on Fungal Cellulases with an Industrial Perspective,” *J. Nutr. Food Sci.*, vol. 06, no. 01, pp. 1–13, 2016.
- [2] A. M. Lopes, E. X. Ferreira Filho y L. R. S. Moreira, “An update on enzymatic cocktails for lignocellulose breakdown,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 125, no. 3, pp. 632–645, 2018.
- [3] D. Klein-Marcuschamer, P. Oleskowicz-Popiel, B. A. Simmons y H. W. Blanch, “The Challenge of Enzyme Cost in the Production of Lignocellulosic Biofuels,” *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 109, no. 4, pp. 1083-1087, abril 2012.
- [4] A. K. Chandel, S. S. da Silva, W. Carvalho y O. V. Singh, “Sugarcane bagasse and leaves: Foreseeable biomass of biofuel and bio-products,” *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 87, no. 1, pp. 11–20, 2012.
- [5] Caña Brava, “Quiénes Somos”, 2019. [En línea]. Disponible en: <http://www.canabrava.com.pe/nosotros/quienes-somos>. [Accedido: 29-jun-2019]
- [6] J. Zhuang, M. A. Marchant, S. E. Nokes y H. J. Strobel, “Economic Analysis of Cellulase Production Methods for Bio-Ethanol,” *Appl. Eng. Agric.*, vol. 23, no. 5, pp. 679–687, 2013.
- [7] R. D. G. Ferreira, A. R. Azzoni y S. Freitas, “Techno-economic analysis of the industrial production of a low-cost enzyme using E. coli: The case of recombinant β -glucosidase,” *Biotechnol. Biofuels*, vol. 11, no. 1, pp. 1–13, 2018.
- [8] S. A. Arni, “Extraction and isolation methods for lignin separation from sugarcane bagasse: A review,” *Industrial Crops & Products*, vol. 115, pp. 330-339, 2018.
- [9] Dynamic Science, “Chemistry of Cellulose and Ironing”, 2019. [En línea]. Disponible en: <http://www.dynamicscience.com.au/tester/solutions1/chemistry/organic/chemironing.html> [Accedido: 15-ago-2019]

- [10] H.V. Lee, S.K. Zain y S. B. Abd, “Conversion of Lignocellulosic Biomass to Nanocellulose: Structure and Chemical Process,” *The Scientific World Journal*, vol. 2014, pp. 1-20, 2014.
- [11] T. Miyamoto et al., “Comparative analysis of lignin chemical structures of sugarcane bagasse pretreated by alkaline, hydrothermal, and dilute sulfuric acid methods,” *Industrial Crops & Products*, vol. 121, pp. 124-131, 2018.
- [12] Lignoworks, “What is Lignin?”, 2016. [En línea]. Disponible en: <http://www.icfar.ca/lignoworks/content/what-lignin.html>. [Accedido: 15-ago-2019]
- [13] A. Brandt, J. Gräsvik, J. Hallett y T. Welton, “Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids,” *Green Chemistry*, vol. 15, no. 3, pp. 550-583, 2013.
- [14] R.R. Singhanía, “Cellulolytic Enzymes,” en *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*, Londres: Springer, 2009, pp. 371-381.
- [15] F. M. Cunha, A. Badina, C. S. Farinas, E. Ximenes y M. R. Ladisch, “Liquid Hot Water and Steam Explosion Pretreatment of Sugarcane Bagasse for Enzyme Production By a Sequential Solid-State and Submerged Method,” *Congr. Bras. Eng. Química*, pp. 1854–1861, 2015.
- [16] R. Biswas, “Production of Cellulolytic Enzymes,” en *Bioprocessing of Renewable Resources to Commodity Bioproducts*, EE.UU: John Wiley & Sons, Inc., 2014, pp. 105-132.
- [17] T. K. Harris y M. M. Keshwani, *Measurement of Enzyme Activity*, 1st ed., vol. 463, no. 09. Elsevier Inc.
- [18] M. Dashtban, M. Maki, K. T. Leung, C. Mao y W. Qin, “Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison,” *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 30, no. 4, pp. 302–309, 2010.
- [19] M. L. Shuler y F. Kargi, *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*. New Jersey: Prentice-Hall, 2002.

- [20] S. Mukherjee, "Isolation and Purification of Industrial Enzymes: Advances in Enzyme Technology," in *Advances in Enzyme Technology*, Elsevier B.V., 2019, pp. 41–70.
- [21] V. Rana, A. D. Eckard, P. Teller, y B. K. Ahring, "On-site enzymes produced from *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus saccharolyticus* for hydrolysis of wet exploded corn stover and loblolly pine," *Bioresour. Technol.*, vol. 154, pp. 282–289, 2014.
- [22] A. A. N. Saqib, M. Hassan, N. F. Khan y S. Baig, "Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF)," *Process Biochem.*, vol. 45, no. 5, pp. 641–646, 2010.
- [23] R. Singh, R. Kumar, K. Bishnoi y N. R. Bishnoi, "Optimization of synergistic parameters for thermostable cellulase activity of *Aspergillus heteromorphus* using response surface methodology," *Biochem. Eng. J.*, vol. 48, no. 1, pp. 28–35, 2009.
- [24] A. R. Jahdavi, A. V. Girde, S. M. More, S. B. More y S. Khan, "Cellulase Production by Utilizing Agricultural Wastes," *Res. J. Agric. For. Sci.*, vol. 1, no. 7, pp. 6–9, 2013.
- [25] G. Kocher, K. Kalra y G. Banta, "Optimization of cellulase production by submerged fermentation of rice straw by *Trichoderma harzianum* Rut-C 8230," *Internet J. Microbiol.*, vol. 5, no. 2, pp. 4–8, 2012.
- [26] C. Florencio, F. M. Cunha, A. C. Badino y C. S. Farinas, "Validation of a Novel Sequential Cultivation Method for the Production of Enzymatic Cocktails from *Trichoderma* Strains," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 175, no. 3, pp. 1389–1402, 2014.
- [27] L. M. F. Gottschalk, R. A. Oliveira y E. P. da S. Bon, "Cellulases, xylanases, β -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse," *Biochem. Eng. J.*, vol. 51, no. 1–2, pp. 72–78, 2010.
- [28] F. M. Cunha, M. N. Esperança, T. C. Zangirolami, A. C. Badino y C. S. Farinas, "Sequential solid-state and submerged cultivation of *Aspergillus niger* on sugarcane

- bagasse for the production of cellulase,” *Bioresour. Technol.*, vol. 112, pp. 270–274, 2012.
- [29] P. da S. Delabona, C. S. Farinas, M. R. da Silva, S. F. Azzoni y J. G. da C. Pradella, “Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production,” *Bioresour. Technol.*, vol. 107, pp. 517–521, 2012.
- [30] A. Ahamed y P. Vermette, “Enhanced enzyme production from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* LMA grown as fed batch in a stirred tank bioreactor,” *Biochem. Eng. J.*, vol. 42, no. 1, pp. 41–46, 2008.
- [31] A. Ahamed y P. Vermette, “Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions,” *Biochem. Eng. J.*, vol. 40, no. 3, pp. 399–407, 2008.
- [32] A. Ahamed y P. Vermette, “Effect of mechanical agitation on the production of cellulases by *Trichoderma reesei* RUT-C30 in a draft-tube airlift bioreactor,” *Biochem. Eng. J.*, vol. 49, no. 3, pp. 379–387, 2010.
- [33] T. Q. Lan, D. Wei, S. T. Yang y X. Liu, “Enhanced cellulase production by *Trichoderma viride* in a rotating fibrous bed bioreactor,” *Bioresour. Technol.*, vol. 133, pp. 175–182, 2013.
- [34] Megha, S. V Maragathavalli, S. Brindha, S. Karthikeyan y V. Gangwar, “Isolation and Purification of Cellulase,” *Int. J. Sci. Nat.*, vol. 6, no. 3, pp. 474–479, 2015.
- [35] G. Narasimha, A. Sridevi, G. Ramanjaneyulu y B. Rajasekhar Reddy, “Purification and Characterization of β -Glucosidase from *Aspergillus Niger*,” *Int. J. Food Prop.*, vol. 19, no. 3, pp. 652–661, 2016.
- [36] S. Y. Abdul-Hadi, F. A. Al-Saffar y A. H. Al-Bayyar, “Characterization of crude cellulase from *Trichoderma reesei* and purification of cellulase,” *Chinese J. Chem. Eng.*, vol. 10, no. 6, p. 723, 2002.
- [37] M. A. Mariño, S. Freitas y E. A. Miranda, “Ethanol precipitation of glycosyl hydrolases produced by *Trichoderma harzianum* P49P11,” *Brazilian J. Chem. Eng.*, vol. 32, no. 2, pp. 325–333, 2015.

- [38] L. Ma, C. Li, Z. Yang, W. Jia, D. Zhang y S. Chen, “Kinetic studies on batch cultivation of *Trichoderma reesei* and application to enhance cellulase production by fed-batch fermentation,” *J. Biotechnol.*, vol. 166, no. 4, pp. 192–197, 2013.
- [39] L. Gelain, J. G. da Cruz Pradella y A. C. da Costa, “Mathematical modeling of enzyme production using *Trichoderma harzianum* P49P11 and sugarcane bagasse as carbon source,” *Bioresour. Technol.*, vol. 198, pp. 101–107, 2015.
- [40] F. Diez y N. Garrido, “Bagazo de caña de azúcar: ¿energía o etanol carburante? Dos casos de estudio”, La Habana: ICIDCA, 2010.
- [41] G. J. M. Rocha, A. R. Gonçalves, S. C. Nakanishi, V. M. Nascimento y V. F. N. Silva, “Pilot scale steam explosion and diluted sulfuric acid pretreatments: Comparative study aiming the sugarcane bagasse saccharification,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 74, pp. 810–816, 2015.
- [42] Sigma Aldrich, “Fractional Precipitation of Affinity Chromatography Samples”, 2019. [En línea]. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/affinity-chromatography/fractional-precipitation.html>. [Accedido: 1-oct-2019]
- [43] D. Garrett, *Chemical Engineering Economics*. Cornell University, 1989.
- [44] G. Towler y R. Sinnott, *Chemical Engineering Design*. Oxford: Elsevier, 2013.
- [45] Chemical Engineering Essentials for the CPI Professional, “*Plant Cost Index*”, 2018. [En línea]. Disponible en: <https://www.chemengonline.com/site/plant-cost-index/>. [Accedido: 17-oct-2019]
- [46] INTELLIGEN INC, *SuperPro Designer User Guide*. New Jersey.
- [47] M. S. Peters, K. D. Timmerhaus y R. E. West, *Plant Design and Economics for Chemical Engineers*. New York: McGraw Hill, 2003.
- [48] D. Petrides et al., “The Role of Simulation and Scheduling Tools in the Development and Manufacturing of Active Pharmaceutical Ingredients,” en *Chemical Engineering in the Pharmaceutical Industry: Active Pharmaceutical Ingredients 2nd Edition*, New Jersey.: John Wiley & Sons, Inc., 2019, pp. 1037-1065

- [49] ProInversión, “Principales impuestos aplicables a la actividad empresarial”, 2019. [En línea]. Disponible en: <http://www.proinversion.gob.pe/apec/pdf/3%20Regimen%20tributario.pdf>. [Accedido: 03-nov-2019].
- [50] J. Li, S. Li, B. Han, M. Yu, G. Li t Y. Jiang, “A novel cost-effective technology to convert sucrose and homocelluloses in sweet sorghum stalks into ethanol,” *Biotechnol. Biofuels*, vol. 6, no. 1, pp. 1–12, 2013.
- [51] A. Peciulyte, G. E. Anasontzis, K. Karlström, P. T. Larsson y L. Olsson, “Morphology and enzyme production of *Trichoderma reesei* Rut C-30 are affected by the physical and structural characteristics of cellulosic substrates,” *Fungal Genet. Biol.*, vol. 72, pp. 64–72, 2014.
- [52] H. Jagani et al., “An Overview of Fermenter and the Design Considerations to Enhance its Productivity,” *Pharmacologyonline*, no. 1, pp. 261-301, 2010.
- [53] S. Wu et al., “Aspect ratio effect of bioreactor on fermentative hydrogen production with immobilized sludge,” *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 38, no. 14, pp. 6154-6160, 2013.
- [54] Y. A. Cengel y M. A. Boles, *Termodinámica*, 7ma ed. McGraw Hill, 2012.
- [55] K. Miller, "Solid-liquid separation technologies in the conversion of bagasse to liquid fuel", *LSU Master's Theses*, 2010.
- [56] H. Salte, J. King, F. Baganz, M. Hoare y N. Titchener-Hooker, “A Methodology for Centrifuge Selection for the Separation of High Solids Density Cell Broths by Visualisation of Performance Using Windows of Operation,” *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 95, no. 6, pp. 1218-1227, 2006.
- [57] E. Yatmaz, I. Turhan, M. Germeç y E. Karahalil, “Using centrifuge and ultrafiltration as downstream processes for the concentration of microbial β -mannanase fermentation media”, *Series F. Biotechnologies*, vol. 21, pp 133-136, 2017.
- [58] T. E. Ferrari y P. G. Arnison, “Extraction and Partial Characterization of Cellulases from Expanding Pea Epicotyls,” *Plant Physiol.*, vol. 54, no. 4, pp. 487–493, 1974.

- [59] C. Florencio, F. M. Cunha, A. C. Badino, C. S. Farinas, E. Ximenes y M. R. Ladisch, “Secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* cultivated by submerged and sequential fermentation processes: Enzyme production for sugarcane bagasse hydrolysis”, *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 90, 2016.
- [60] F. M. Cunha, T. Kreke, A. C. Badino, C. S. Farinas, E. Ximenes y M. R. Ladisch, “Liquefaction of sugarcane bagasse for enzyme production,” *Bioresour. Technol.*, vol. 172, pp. 249–252, 2014.
- [61] V. Uhl y J. Gray, *Mixing Theory and Practice*. 1966.
- [62] Trade India, “*Paddle Agitator*”, 2019. [En línea]. Disponible en: <https://www.tradeindia.com/manufacturers/paddle-agitator.html>. [Accedido: 22-oct-2019]
- [63] Indiamart, “*Propeller Agitator*”, 2019. [En línea]. Disponible en: <https://www.indiamart.com/proddetail/propeller-agitator-8499820630.html>. [Accedido: 22-oct-2019]
- [64] C. S. Farinas, L. M. Scarpelini, E. A. Miranda y V. Bertucci Neto, “Evaluation of operational parameters on the precipitation of endoglucanase and xylanase produced by solid state fermentation of *Aspergillus niger*,” *Brazilian J. Chem. Eng.*, vol. 28, no. 1, pp. 17–26, 2011.
- [65] Flottweg Separation Technology, “*Flottweg Disc Stack Centrifuges*”, 2009.
- [66] Princeton, “Autoclave Use”, 2019. [En línea]. Disponible en: <https://ehs.princeton.edu/book/export/html/380>. [Accedido: 08-nov-2019]
- [67] M. I. Rajoka, “Influence of various fermentation variables on exo-glucanase production in *Cellulomonas flavigena*,” *Electron. J. Biotechnol.*, vol. 7, no. 3, pp. 256–263, 2004.
- [68] Worthington Biochemical Corporation, “*Cellulase*”, 2019. [En línea]. Disponible en: <http://www.worthington-biochem.com/cel/default.html>. [Accedido: 22-oct-2019]

- [69] National Center for Biotechnology Information, “*Ammonium Sulfate*”, 2019. [En línea]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ammonium-sulfate>. [Accedido: 22-oct-2019]
- [70] Veritrade, 2019. [En línea]. Disponible en: <https://www.veritradecorp.com/>. [Accedido: 03-nov-2019]"
- [71] OK CHEM, “Monopotassium phosphate”, 2019. [En línea]. Disponible en: <https://www.okchem.com/product/monopotassium-phosphate-201905091268461.html>. [Accedido: 03-nov-2019]
- [72] China FoodPharm Group, 2019. [En línea]. Disponible en: <http://www.chinafoodpharm.com/index.asp>. [Accedido: 03-nov-2019]
- [73] Reachever, “Corn Steep Liquor”, 2019. [En línea]. Disponible en: <http://www.reachever.com/en/product/product-46-765.html>. [Accedido: 03-nov-2019]
- [74] “Molbase Chemical E-Commerce Platform”, 2019. [En línea]. Disponible en: <http://www.molbase.com/>. [Accedido: 03-nov-2019]
- [75] F. Vásquez y J. Vásquez, “Proyecto de prefactibilidad de instalación de una planta de producción de etanol anhidro a partir de bagazo de caña,” Tesis, Escuela Profesional de Ingeniería Química, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lima, 2019.
- [76] MERCK, “Cellulase, enzyme blend”, 2019. [En línea]. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/sae0020?lang=en®ion=PE>. [Accedido: 15-abr-2021]

ANEXOS

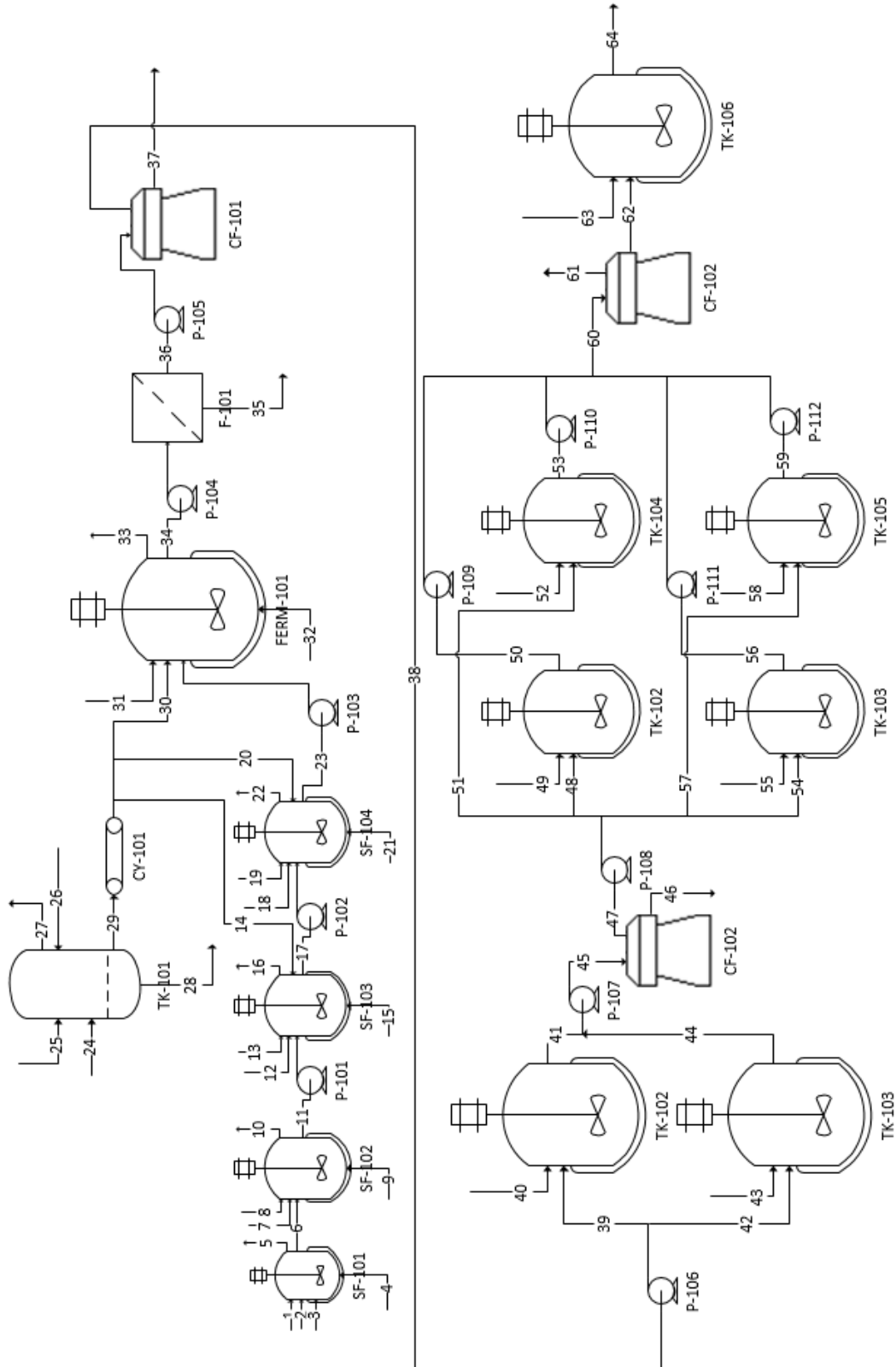
ANEXO 1: Cantidad de sulfato de amonio requerida para alcanzar la saturación deseada. Fuente: G. J. M. Rocha et al.

Pilot scale steam explosion and diluted sulfuric acid pretreatments: Comparative study aiming the sugarcane bagasse saccharification [42]

| Starting percent saturation | Final percent saturation to be obtained | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 | 50 | 55 | 60 | 65 | 70 | 75 | 80 | 85 | 90 | 95 | 100 |
| | Amount of ammonium sulphate to add (grams) per liter of solution at +20 °C | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | 113 | 144 | 176 | 208 | 242 | 277 | 314 | 351 | 390 | 430 | 472 | 516 | 561 | 608 | 657 | 708 | 761 |
| 5 | 85 | 115 | 146 | 179 | 212 | 246 | 282 | 319 | 358 | 397 | 439 | 481 | 526 | 572 | 621 | 671 | 723 |
| 10 | 57 | 86 | 117 | 149 | 182 | 216 | 251 | 287 | 325 | 364 | 405 | 447 | 491 | 537 | 584 | 634 | 685 |
| 15 | 28 | 58 | 88 | 119 | 151 | 185 | 219 | 255 | 293 | 331 | 371 | 413 | 456 | 501 | 548 | 596 | 647 |
| 20 | 0 | 29 | 59 | 89 | 121 | 154 | 188 | 223 | 260 | 298 | 337 | 378 | 421 | 465 | 511 | 559 | 609 |
| 25 | | 0 | 29 | 60 | 91 | 123 | 157 | 191 | 228 | 265 | 304 | 344 | 386 | 429 | 475 | 522 | 571 |
| 30 | | | 0 | 30 | 61 | 92 | 125 | 160 | 195 | 232 | 270 | 309 | 351 | 393 | 438 | 485 | 533 |
| 35 | | | | 0 | 30 | 62 | 94 | 128 | 163 | 199 | 236 | 275 | 316 | 358 | 402 | 447 | 495 |
| 40 | | | | | 0 | 31 | 63 | 96 | 130 | 166 | 202 | 241 | 281 | 322 | 365 | 410 | 457 |
| 45 | | | | | | 0 | 31 | 64 | 98 | 132 | 169 | 206 | 245 | 286 | 329 | 373 | 419 |
| 50 | | | | | | | 0 | 32 | 65 | 99 | 135 | 172 | 210 | 250 | 292 | 335 | 381 |
| 55 | | | | | | | | 0 | 33 | 66 | 101 | 138 | 175 | 215 | 256 | 298 | 343 |
| 60 | | | | | | | | | 0 | 33 | 67 | 103 | 140 | 179 | 219 | 261 | 305 |
| 65 | | | | | | | | | | 0 | 34 | 69 | 105 | 143 | 183 | 224 | 267 |
| 70 | | | | | | | | | | | 0 | 34 | 70 | 107 | 146 | 186 | 228 |
| 75 | | | | | | | | | | | | 0 | 35 | 72 | 110 | 149 | 190 |
| 80 | | | | | | | | | | | | | 0 | 36 | 73 | 112 | 152 |
| 85 | | | | | | | | | | | | | | 0 | 37 | 75 | 114 |
| 90 | | | | | | | | | | | | | | | 0 | 37 | 76 |
| 95 | | | | | | | | | | | | | | | | 0 | 38 |

ANEXO 2: Diagrama de flujo del proceso propuesto.

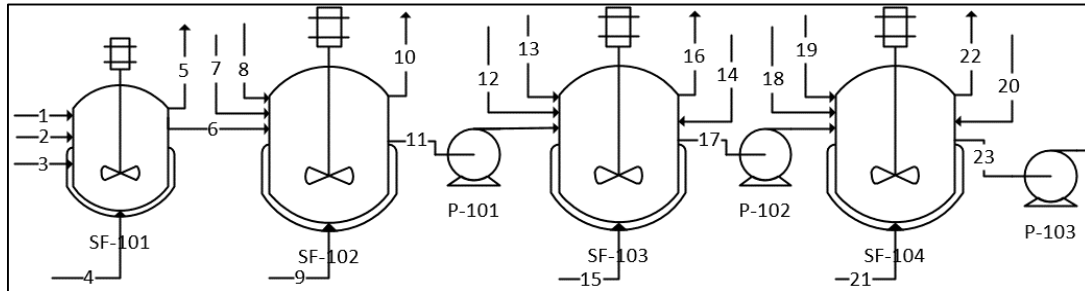
Fuente: Elaboración propia.



ANEXO 3: Balance de materia del proceso propuesto.

Fuente: Elaboración propia.

Sección 1: Tren de siembra

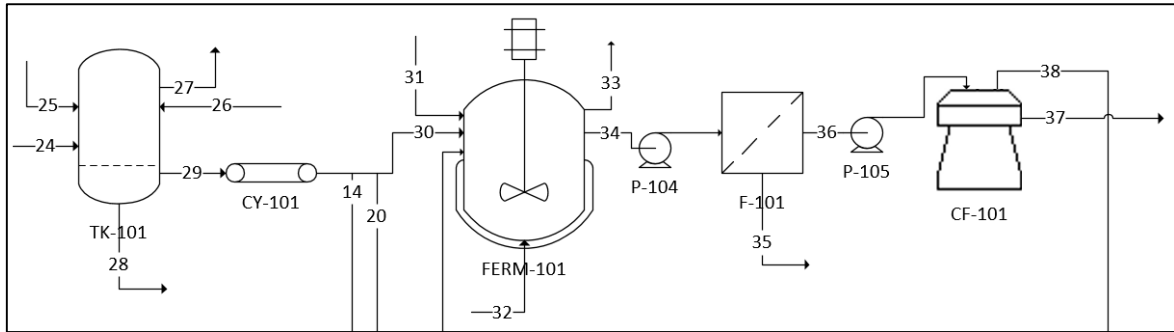


| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|-----------------------|-------|------|------|---|---|------|------|------|---|----|------|
| Células | 0.037 | - | - | - | - | 0.37 | - | - | - | - | 3.72 |
| Bagazo | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Celulosa | - | - | 0.45 | - | - | - | - | 4.46 | - | - | - |
| Hemicelulosa | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Lignina | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Otros | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Agua | - | 7.43 | - | - | - | 7.43 | 67 | - | - | - | 74 |
| Medio | - | 0.14 | - | - | - | - | 1.41 | - | - | - | - |
| Azucares | - | - | - | - | - | e | - | - | - | - | f |
| O₂ | - | - | - | a | c | - | - | - | a | c | - |
| N₂ | - | - | - | b | b | - | - | - | b | b | - |
| CO₂ | - | - | - | - | d | - | - | - | - | d | - |

| | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 |
|-----------------------|-----|----|------|----|----|------|------|-----|-----|----|----|------|
| Células | - | - | - | - | - | 37 | - | - | - | - | - | 372 |
| Bagazo | - | - | 38.6 | - | - | 16 | - | - | 386 | - | - | 178 |
| Celulosa | - | 22 | 22.4 | - | - | - | - | 223 | 224 | - | - | - |
| Hemicelulosa | - | - | 1.7 | - | - | 1.70 | - | - | 17 | - | - | 19 |
| Lignina | - | - | 12.9 | - | - | 13 | - | - | 129 | - | - | 142 |
| Otros | - | - | 1.7 | - | - | 1.66 | - | - | 17 | - | - | 18 |
| Agua | 630 | - | 38.6 | - | - | 743 | 6301 | - | 386 | - | - | 7430 |
| Medio | 14 | - | - | - | - | - | 141 | - | - | - | - | - |
| Azucares | - | - | - | - | - | h | - | - | - | - | - | i |
| O₂ | - | - | - | a | c | - | - | - | - | a | c | - |
| N₂ | - | - | - | b | d | - | - | - | - | b | d | - |
| CO₂ | - | - | - | - | e | - | - | - | - | - | e | - |

Cantidades expresadas en kg. a: cantidad de O₂ necesaria para mantener el 30% de saturación; b: cantidad de N₂ correspondiente a una masa "a" de O₂ en el aire; c: O₂ al final de la fermentación; d: CO₂ producido en la fermentación; e, f, g y h: azúcares (pentosas y hexosas) producidas en la fermentación.

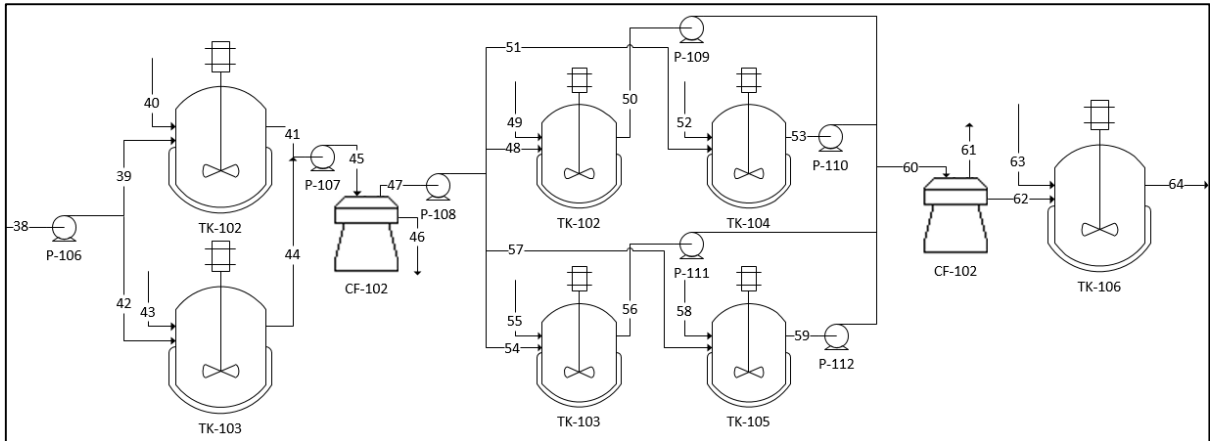
Sección 2: Pretratamiento, fermentación y separación de sólidos



| | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 |
|-----------------------|------|-----|-------|----|------|------|------|-------|----|----|-------|------|-------|-----|-------|
| Células | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1240 | 868 | 372 | 372 | - |
| Bagazo | 4820 | - | - | - | - | 3320 | 3000 | - | - | - | 1483 | 1038 | 445 | 445 | - |
| Celulosa | 2174 | - | - | - | - | 1926 | 1740 | - | - | - | 223 | 156 | 67 | 67 | - |
| Hemicelulosa | 1297 | - | - | - | - | 146 | 132 | - | - | - | 132 | 92 | 40 | 40 | - |
| Lignina | 1070 | - | - | - | - | 1106 | 999 | - | - | - | 999 | 699 | 300 | 300 | - |
| Otros | 280 | - | - | - | - | 143 | 129 | - | - | - | 129 | 90 | 39 | 39 | - |
| Proteínas | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 77 | - | 69 | - | 69 |
| Agua | - | 482 | 16600 | i | j | 3320 | 3000 | 14363 | - | - | 24793 | - | 24793 | - | 24793 |
| Medio | - | - | - | - | - | - | - | 471 | - | - | - | - | - | - | - |
| Azúcares | - | - | - | - | 1500 | - | - | - | - | - | k | - | k | - | k |
| O₂ | - | - | - | - | - | - | - | - | a | c | - | - | - | - | - |
| N₂ | - | - | - | - | - | - | - | - | b | b | - | - | - | - | - |
| CO₂ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | d | - | - | - | - | - |

Cantidades expresadas en kg. a: cantidad de O₂ necesaria para mantener el 30% de saturación; b: cantidad de N₂ correspondiente a una masa “a” de O₂ en el aire; c: O₂ al final de la fermentación; d: CO₂ producido en la fermentación; i: vapor remanente luego de la explosión de vapor, j: agua condensada y de lavado, k: azúcares (pentosas y hexosas) producidas en la fermentación.

Sección 3: Concentración



| | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | 60 | 61 | 62 | 63 | 64 |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|-------|-------|-------|-------|--------|--------|----|----|----|
| Proteínas | 35 | - | 35 | 35 | - | 35 | 69 | 55 | 14 | 4 | - | 4 | 14 | - | 14 | - | 14 |
| Agua | 12397 | 18600 | 30997 | 12397 | 18600 | 30997 | 61993 | - | 61993 | 15498 | 15500 | 30998 | 123993 | 123993 | - | - | - |
| Azúcares | 0.5k | - | 0.5k | 0.5k | - | 0.5k | k | - | k | 0.25k | - | 0.25k | k | k | - | - | - |
| (NH₄)₂SO₄ | - | 10081 | 10081 | - | 10081 | 10081 | 20162 | - | 20162 | 5041 | 8401 | 13442 | 53766 | 53766 | - | - | - |
| Buffer | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 28 | 28 |

Cantidades expresadas en kg. k: azúcares (pentosas y hexosas) producidas en la fermentación. El balance en TK-102 en la segunda etapa de concentración se repite en TK-103, 104 y 105.

ANEXO 4: Flujo de caja para el caso base (1 FERM y 1 TS).

Fuente: Elaboración propia.

| Año | Ingresos | CAPEX | OPEX | Depreciación | EBIT | Impuestos | Flujo de caja |
|-----|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|-------------------|
| 0 | \$ - | \$ 23,503,982.19 | \$ - | \$ - | \$ - | \$ - | \$ -23,503,982.19 |
| 1 | \$ 9,628,740.00 | \$ - | \$ 4,814,370.00 | \$ 3,995,676.97 | \$ 818,693.03 | \$ 212,860.19 | \$ 4,601,509.81 |
| 2 | \$ 9,628,740.00 | \$ - | \$ 4,814,370.00 | \$ 6,393,083.16 | \$ -1,578,713.16 | \$ - | \$ 4,814,370.00 |
| 3 | \$ 9,628,740.00 | \$ - | \$ 4,814,370.00 | \$ 3,835,849.89 | \$ 978,520.11 | \$ 254,415.23 | \$ 4,559,954.77 |
| 4 | \$ 9,628,740.00 | \$ - | \$ 4,814,370.00 | \$ 2,301,509.94 | \$ 2,512,860.06 | \$ 633,343.62 | \$ 4,161,026.38 |
| 5 | \$ 9,628,740.00 | \$ - | \$ 4,814,370.00 | \$ 2,301,509.94 | \$ 2,512,860.06 | \$ 633,343.62 | \$ 4,161,026.38 |
| 6 | \$ 9,628,740.00 | \$ - | \$ 4,814,370.00 | \$ 1,150,754.97 | \$ 3,663,615.03 | \$ 952,539.91 | \$ 3,861,830.09 |
| 7 | \$ 9,628,740.00 | \$ - | \$ 4,814,370.00 | \$ - | \$ 4,814,370.00 | \$ 1,251,736.20 | \$ 3,562,633.80 |
| 8 | \$ 9,628,740.00 | \$ - | \$ 4,814,370.00 | \$ - | \$ 4,814,370.00 | \$ 1,251,736.20 | \$ 3,562,633.80 |
| 9 | \$ 9,628,740.00 | \$ - | \$ 4,814,370.00 | \$ - | \$ 4,814,370.00 | \$ 1,251,736.20 | \$ 3,562,633.80 |
| 10 | \$ 9,628,740.00 | \$ - | \$ 4,814,370.00 | \$ - | \$ 4,814,370.00 | \$ 1,251,736.20 | \$ 3,562,633.80 |
| 11 | \$ 9,628,740.00 | \$ - | \$ 4,814,370.00 | \$ - | \$ 4,814,370.00 | \$ 1,251,736.20 | \$ 3,562,633.80 |
| 12 | \$ 9,628,740.00 | \$ - | \$ 4,814,370.00 | \$ - | \$ 4,814,370.00 | \$ 1,251,736.20 | \$ 3,562,633.80 |
| 13 | \$ 9,628,740.00 | \$ - | \$ 4,814,370.00 | \$ - | \$ 4,814,370.00 | \$ 1,251,736.20 | \$ 3,562,633.80 |
| 14 | \$ 9,628,740.00 | \$ - | \$ 4,814,370.00 | \$ - | \$ 4,814,370.00 | \$ 1,251,736.20 | \$ 3,562,633.80 |
| 15 | \$ 9,628,740.00 | \$ - | \$ 4,814,370.00 | \$ - | \$ 4,814,370.00 | \$ 1,251,736.20 | \$ 3,562,633.80 |
| 16 | \$ 9,628,740.00 | \$ - | \$ 4,814,370.00 | \$ - | \$ 4,814,370.00 | \$ 1,251,736.20 | \$ 3,562,633.80 |
| 17 | \$ 9,628,740.00 | \$ - | \$ 4,814,370.00 | \$ - | \$ 4,814,370.00 | \$ 1,251,736.20 | \$ 3,562,633.80 |
| 18 | \$ 9,628,740.00 | \$ - | \$ 4,814,370.00 | \$ - | \$ 4,814,370.00 | \$ 1,251,736.20 | \$ 3,562,633.80 |
| 19 | \$ 9,628,740.00 | \$ - | \$ 4,814,370.00 | \$ - | \$ 4,814,370.00 | \$ 1,251,736.20 | \$ 3,562,633.80 |
| 20 | \$ 9,628,740.00 | \$ - | \$ 4,814,370.00 | \$ - | \$ 4,814,370.00 | \$ 1,251,736.20 | \$ 3,562,633.80 |