

**UNIVERSIDAD DE INGENIERÍA Y TECNOLOGÍA**  
**CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA**



**DISEÑO DE UN PROCESO DE PRODUCCIÓN  
DE UN *COCKTAIL* ENZIMÁTICO DE ALTA  
ACTIVIDAD XILANOLÍTICA UTILIZANDO  
BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR COMO  
INDUCTOR Y FUENTE DE CARBONO**

**TESIS**

Para optar por el título profesional de Ingeniero Químico

**AUTOR**

Sergio Enrique Tapia Lishner (ORCID: 0000-0001-7575-2563)

**ASESORA**

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

Lima – Perú

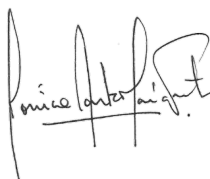
2024

## **DECLARACIÓN JURADA**

Yo, Mónica Cecilia Santa María Fuster identificada con DNI No 18226712 en mi condición de autoridad responsable de validar la autenticidad de los trabajos de investigación y tesis de la UNIVERSIDAD DE INGENIERIA Y TECNOLOGIA, DECLARO BAJO JURAMENTO:

Que la tesis denominada “DISEÑO DE UN PROCESO DE PRODUCCIÓN DE UN COCKTAIL ENZIMÁTICO DE ALTA ACTIVIDAD XILANOLÍTICA UTILIZANDO BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR COMO INDUCTOR Y FUENTE DE CARBONO” ha sido elaborada por el señor Sergio Enrique Tapia Lishner, con la asesoría de Úrsula Fabiola Rodríguez Zúñiga, identificada con DNI N° 29722081, y que se presenta para obtener el título profesional de Ingeniero químico, ha sido sometida a los mecanismos de control y sanciones anti plagio previstos en la normativa interna de la universidad, encontrándose un porcentaje de similitud de 0%.

En fe de lo cual firmo la presente.



Dra. Mónica Santa María Fuster  
Directora de Investigación

En Barranco, el 29 de mayo 2024

*Dedicatorias:*

Al Dr. Andrés Lishner Toulher, mi primer maestro en el mundo científico y uno de los mejores amigos que la vida me regaló.

Al Ing. Seiichi Ishida Taone, cuyas historias de excelencia profesional, disciplina y honestidad influyeron en mí al momento de optar por esta profesión.

*Agradecimientos:*

A mis padres, Sergio y Cecilia, por haber hecho de mi esfuerzo su esfuerzo, de mis triunfos sus triunfos y de mis penas sus penas. Este logro es por y para ustedes.

Al Dr. Enrique Ishida Dancourt y a la Dra. Cecilia Komatsudani Takagaki, por su apoyo incondicional a lo largo de estos años.

A Don Carlos Salazar Cruzado, por haber sentado las bases de este logro allá por el 2013.

# TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	xvii
ABSTRACT	xviii
INTRODUCCIÓN	xix
CAPÍTULO I	21
OBJETIVOS	21
1.1. Objetivo general	21
1.2. Objetivos específicos	21
CAPÍTULO II	23
MARCO TEÓRICO	23
2.1. Composición de la biomasa lignocelulósica	23
2.1.1. Celulosa	23
2.1.2. Hemicelulosa	23
2.1.3. Lignina	25
2.2. Enzimas xilanolíticas	26
2.2.1. Clasificación	26
2.2.2. Actividad enzimática	27
2.3. Microorganismos empleados en la producción de enzimas xilanolíticas	28
2.3.1. Hongos filamentosos	28
2.4. Residuos agrícolas como sustratos para la producción de enzimas	28
2.5. Producción de enzimas xilanolíticas por fermentación sumergida	30
2.6. Modelamiento matemático de la producción enzimática	31

2.7.	Operaciones unitarias para la recuperación de enzimas	32
2.7.1.	Precipitación con sulfato de amonio	33
2.7.2.	Precipitación con etanol	33
CAPÍTULO III		35
ESTADO DEL ARTE		35
3.1.	Producción de enzimas xilanolíticas a partir de residuos agrícolas	35
3.2.	Modelos matemáticos de producción enzimática	37
3.3.	Métodos de recuperación de enzimas xilanolíticas	47
3.3.1.	Precipitación con etanol	48
3.4.	Simulación de procesos de producción de enzimas	50
CAPÍTULO IV		54
METODOLOGÍA		54
4.1.	Establecimiento de la base de diseño	54
4.2.	Asunciones principales del diseño	55
4.3.	Simulación de la cinética de producción enzimática	55
4.4.	Diseño de la sección de pretratamiento de materia prima	56
4.4.1.	Dimensionamiento del tanque de almacenamiento de sólidos de bagazo	56
4.4.2.	Dimensionamiento del tanque de hidrólisis alcalina	57
4.4.3.	Estimación de la potencia de agitación en el tanque de hidrólisis alcalina	57
4.4.4.	Estimación de la masa de aceite térmico para el proceso de hidrólisis alcalina	59
4.5.	Diseño de la sección de fermentación sumergida	60
4.5.1.	Consideraciones para el fermentador principal	60
4.5.2.	Consideraciones para el diseño del tren de siembra	60
4.5.3.	Dimensionamiento de los fermentadores de siembra y principal	61

4.5.4.	Estimación de la generación de calor durante la fermentación principal	61
4.5.5.	Estimación de la potencia de agitación en los fermentadores	62
4.5.6.	Cálculo del tiempo de enfriamiento posterior a la fermentación	64
4.5.7.	Estimación del consumo de vapor con fines de desinfección	64
4.6.	Diseño de la sección de recuperación de enzimas	65
4.6.1.	Dimensionamiento de los tanques de precipitación con etanol	65
4.6.2.	Estimación de la potencia de agitación requerida para cada tanque	67
4.6.3.	Determinación del tiempo de agitación requerido para cada tanque	67
4.6.4.	Determinación de la temperatura de suministro del etanol anhidro	68
4.6.5.	Escalamiento de las centrifugas del proceso	69
4.6.6.	Dimensionamiento del tanque de resuspensión	70
4.6.7.	Estimación del tiempo de resuspensión de proteínas	70
4.6.8.	Estimación de la potencia de agitación en el tanque de resuspensión	71
4.7.	Cálculo del <i>E factor</i> del proceso	71
4.8.	Evaluación económica del proceso	72
4.8.1.	Estimación del CapEx base del proyecto	72
4.8.2.	Estimación del OpEx base del proyecto	73
4.8.3.	Anualización de la inversión de capital fijo	75
4.8.4.	Estimación del costo de producción por litro de <i>cocktail</i>	76
4.9.	Secuenciamiento de tareas del proceso	76
4.9.1.	Desarrollo de los esquemas de secuenciamiento de tareas	76
4.9.2.	Recálculo del CapEx, OpEx y costo de producción por litro de <i>cocktail</i>	76
4.10.	Análisis de rentabilidad del proyecto	77
4.10.1.	Cálculo del precio mínimo de venta	77

4.10.2.	Cálculo de los índices de rentabilidad del proyecto	77
4.10.3.	Análisis de sensibilidad del proyecto	78
4.11.	Análisis de seguridad del proceso	78
CAPÍTULO V		79
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		79
5.1.	Diagramas de flujo y descripción del proceso	79
5.1.1.	Sección de pretratamiento de materia prima	79
5.1.2.	Sección de fermentación sumergida	81
5.1.3.	Sección de recuperación de enzimas	83
5.2.	Diseño de la sección de pretratamiento de materia prima	84
5.2.1.	Justificación del pretratamiento sobre el bagazo de caña de azúcar	84
5.2.2.	Primer lavado por centrifugación	85
5.2.3.	Pretratamiento por deslignificación alcalina	87
5.2.4.	Segundo lavado por centrifugación	90
5.3.	Simulación de la cinética de producción enzimática	91
5.3.1.	Datos cinéticos obtenidos para un caso de operación por lotes	91
5.3.2.	Datos cinéticos obtenidos para casos de operación por lotes alimentados	92
5.3.3.	Selección del modo de operación del fermentador principal	95
5.4.	Diseño de la sección de fermentación	97
5.4.1.	Fermentación principal	97
5.4.2.	Siembra de células	100
5.4.3.	Generalidades de los procesos de fermentación de la sección	102
5.5.	Diseño de la sección de recuperación de enzimas	104
5.5.1.	Cosecha del caldo de fermentación por centrifugación	104



5.5.2.	Precipitación de enzimas con etanol	105
5.5.3.	Recuperación de enzimas por centrifugación	108
5.5.4.	Resuspensión de enzimas	109
5.6.	Balance de materia del proceso	111
5.7.	Sumario del consumo de utilidades en el proceso	114
5.8.	Sumario de la generación de residuos en el proceso	116
5.9.	<i>E factor</i> del proceso	116
5.10.	Evaluación económica del proyecto	117
5.10.1.	Estimación del CapEx	117
5.10.2.	Estimación del OpEx	119
5.11.	Secuenciamiento de tareas del proceso	124
5.12.	Estimación del costo por unidad de volumen de <i>cocktail</i> enzimático	127
5.13.	Reajuste del secuenciamiento de tareas del proceso	127
5.13.1.	Secuenciamiento de tareas con operaciones superpuestas	128
5.13.2.	Secuenciamiento de tareas considerando el uso de equipos adicionales	129
5.13.3.	Impacto del secuenciamiento de tareas en los costos del proceso	131
5.14.	Análisis de rentabilidad del proyecto	134
5.14.1.	Cálculo del precio mínimo de venta	134
5.14.2.	Cálculo de los índices de rentabilidad del proyecto	134
5.14.3.	Análisis de sensibilidad del proyecto	135
5.15.	Análisis de seguridad del proceso	136
	CONCLUSIONES	140
	RECOMENDACIONES	143
	AGRADECIMIENTOS	145

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

146

ANEXOS

154

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 2. 1. Composición porcentual en base seca de celulosa, hemicelulosa y lignina de distintos residuos agrícolas [13]	29
Tabla 3. 1. Actividades máximas reportadas por distintos autores utilizando distintos residuos agrícolas como sustratos para la fermentación	36
Tabla 3. 2. Porcentajes de recuperación de actividades enzimáticas reportados en la literatura utilizando distintos métodos de recuperación directa	49
Tabla 4. 1. Factores típicos utilizados para el cálculo del CapEx en un proceso biológico [17]	73
Tabla 4. 2. Porcentajes de deducción típicos utilizados para el cálculo de los costos fijos del OpEx en un proceso biológico [17]	74
Tabla 5. 1. Composiciones de los sólidos de bagazo de caña de azúcar en distintas etapas del proceso de pretratamiento	85
Tabla 5. 2. Parámetros de operación determinados para la primera operación de lavado por centrifugación	86
Tabla 5. 3. Parámetros de diseño determinados para el tanque de hidrólisis alcalina	88
Tabla 5. 4. Parámetros de operación determinados para el proceso de hidrólisis alcalina	89
Tabla 5. 5. Parámetros de operación determinados para la segunda operación de lavado por centrifugación	90
Tabla 5.6. Parámetros de operación obtenidos para los esquemas de alimentación descritos en la Figura 5.5	94
Tabla 5. 7. Parámetros de operación obtenidos para el esquema de alimentación descrito en la Figura 5.6	96
Tabla 5. 8. Parámetros de diseño determinados para el fermentador principal	97

Tabla 5. 9. Parámetros de operación determinados para el proceso de fermentación principal	99
Tabla 5. 10. Parámetros de diseño determinados para los fermentadores tren de siembra	101
Tabla 5. 11. Parámetros de operación determinados para el proceso de siembra de células	102
Tabla 5. 12. Parámetros de operación determinados para la operación de cosecha del caldo de fermentación	104
Tabla 5. 13. Parámetros de diseño determinados para los tanques de precipitación de enzimas con etanol	106
Tabla 5. 14. Parámetros de operación determinados para la operación de precipitación de enzimas con etanol	107
Tabla 5. 15. Parámetros de escalamiento determinados para las centrífugas empleadas en la operación de precipitación de enzimas con etanol	108
Tabla 5. 16. Parámetros de escalamiento determinados para el tanque de resuspensión de enzimas	110
Tabla 5. 17. Parámetros de escalamiento determinados para la operación de resuspensión de enzimas	110
Tabla 5. 18. Asunciones principales por etapa para efectuar los balances de materia del proceso bajo estudio	112
Tabla 5. 19. Resumen del balance de proteínas y actividades enzimáticas de xilanasas en las etapas clave del proceso bajo estudio	113
Tabla 5. 20. Resumen de las actividades enzimáticas presentes en el <i>cocktail</i> producido al término del proceso	113
Tabla 5. 21. Sumario del consumo de utilidades en el proceso bajo estudio	115
Tabla 5. 22. Sumario de la generación de residuos en el proceso bajo estudio	116
Tabla 5. 23. <i>E factors</i> calculados para el proceso bajo estudio	117

Tabla 5. 24. Precio de compra de los principales equipos del proceso	118
Tabla 5. 25. Estimación de los costos de capital asociados al proceso bajo estudio	119
Tabla 5. 26. Estimación de costos fijos para el proceso bajo estudio	120
Tabla 5. 27. Estimación de costos variables asociados al consumo de materias primas por el proceso bajo estudio	121
Tabla 5. 28. Estimación de costos variables asociados al consumo de utilidades para el proceso bajo estudio	122
Tabla 5. 29. Estimación de costos variables asociados al tratamiento de residuos para el proceso bajo estudio	122
Tabla 5. 30. Estimación de los costos operativos asociados al proceso bajo estudio asumiendo una producción anual de 44 lotes	123
Tabla 5. 31. Operaciones unitarias consideradas para los casos de secuenciamiento de tareas del proceso bajo estudio y resultados obtenidos para el caso base del proceso	125
Tabla 5. 32. Ítems determinados para la estimación del costo por unidad de masa de enzimas asociado al proceso bajo estudio	127
Tabla 5. 33. Escenarios de secuenciamiento de tareas e indicadores económicos asociados	132
Tabla 5. 34. Estimación de los costos operativos asociados al proceso bajo estudio asumiendo una producción anual de 271 lotes	132
Tabla 5. 35. Ítems determinados para la estimación del costo reajustado por unidad de masa de enzimas asociado al caso optimizado del proceso bajo estudio	134
Tabla 5. 36. Lista de peligros hallados en el proceso bajo estudio	136

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 2. 1. Estructura polimérica de la celulosa [10]	23
Figura 2. 2. Estructura polimérica del xilano [10]	24
Figura 2. 3. Estructura polimérica de los galacto – glucomananos [10]	24
Figura 2. 4. Estructura polimérica de los arabinoglucuronoxilanos [10]	24
Figura 2. 5. Estructura polimérica de la lignina [10]	25
Figura 2. 6. Esquema general de un biorreactor de tanque agitado equipado con un serpentín interno de refrigeración para llevar a cabo una fermentación sumergida [15]	30
Figura 3. 1. Curvas obtenidas a partir de los modelos matemáticos planteados para las concentraciones de biomasa, sustrato, oxígeno disuelto y enzimas [24]	40
Figura 3. 2. Datos experimentales obtenidos al llevar a cabo una configuración <i>fed - batch</i> para la secreción de enzimas xilanolíticas [25]	42
Figura 3. 3. Comparación de datos de biomasa producida a partir de un arreglo <i>batch</i> y <i>fed - batch</i> [25]	43
Figura 3. 4. Comparación de datos experimentales de actividades enzimáticas producidas a partir de un arreglo <i>batch</i> y <i>fed - batch</i> [25]	43
Figura 4. 1. Correlación de Rushton <i>et al.</i> para el cálculo del número de potencia en función del número de Reynolds en fluidos newtonianos [35]	58
Figura 4. 2. Correlación de Calderbank y Moo – Young para el cálculo del número de potencia en función del número de Reynolds en fluidos pseudoplásticos [35]	63
Figura 4. 3. Datos de volumen residual en función de la fracción molar de etanol para el sistema agua – etanol a 298.15 K y 1 atm [44]	66
Figura 4. 4. Datos de entalpía de entalpía molar de hidratación en función de la fracción molar de etanol para el sistema agua – etanol a 298.15 K y 1 atm [47]	68

Figura 5. 1. PFD de la sección de pretratamiento del bagazo de caña del proceso bajo estudio	79
Figura 5. 2. PFD de la sección de fermentación del proceso bajo estudio	81
Figura 5. 3. PFD de la sección de recuperación de enzimas del proceso bajo estudio	83
Figura 5. 4. Curvas de actividad enzimática de xilanasas (Xy) y concentración de celulosa (S) para distintas concentraciones de pulpa de celulosa en base seca al inicio de la fermentación	91
Figura 5. 5. Curvas de actividad enzimática de xilanasas (Xy), concentración de biomasa celular (X) y sustrato (S) para un esquema de alimentación por lotes (A), por lotes alimentados durante el pico de actividad enzimática (B) y por lotes alimentados durante el pico de concentración de biomasa (C)	94
Figura 5. 6. Perfil completo de actividades enzimáticas de beta - glucosidasas ( $\beta$ ), celulasas (FPA), xilanasas (Xy), concentración de biomasa celular (X) y concentración de sustrato (S) para el esquema de operación por lotes alimentados seleccionado	96
Figura 5. 7. Esquema típico del fermentador a escala industrial considerado para el proceso de secreción de enzimas [15]	98
Figura 5. 8. Curvas de biomasa celular (X) y concentración de celulosa (S) obtenidas para la operación de siembra de células	101
Figura 5. 9. Repartición porcentual de los costos operativos del proceso bajo estudio asumiendo una producción anual de 44 lotes	123
Figura 5. 10. Secuenciamiento de tareas del caso base del proceso	126
Figura 5. 11. Secuenciamiento de tareas considerando un esquema superpuesto de operaciones	129
Figura 5. 12. Secuenciamiento de tareas considerando un esquema superpuesto de operaciones y el empleo de un fermentador principal adicional	130
Figura 5. 13. Secuenciamiento de tareas considerando un esquema superpuesto de operaciones y el empleo de dos fermentadores principales adicionales	131

Figura 5. 14. Repartición porcentual de los costos operativos del proceso bajo estudio asumiendo una producción anual de 271 lotes	133
Figura 5.15. Sensibilidad del valor actual neto y del precio mínimo de venta ante fluctuaciones de cuatro variables económicas	135
Figura 5. 16. Análisis de seguridad (HAZID) del proceso bajo estudio	137



## ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1: Parámetros del modelo cinético propuesto por Coman	155
Anexo 2: Parámetros del modelo cinético propuesto por Gong <i>et al.</i>	156
Anexo 3: Parámetros del modelo cinético propuesto por Gelain <i>et al.</i>	157
Anexo 4: PFD del proceso de producción por lotes de enzimas xilanolíticas propuesto por Valtavirta	158
Anexo 5: PFD del proceso de producción de múltiples enzimas hidrolíticas acoplado a la producción de ácido cítrico propuesto por Papadaki <i>et al.</i>	159
Anexo 6: Código de MATLAB empleado para la resolución del modelo matemático de producción enzimática	160
Anexo 7: Balance de materia del proceso bajo estudio	161
Anexo 8: Reajuste de los costos del proceso en función de las distintas capacidades de producción determinadas	168
Anexo 9: Análisis de flujo de caja del proyecto	169
Anexo 10: Análisis de seguridad del proceso mediante la metodología HAZID	171

## RESUMEN

Las enzimas xilanolíticas son biocatalizadores industriales con una demanda creciente en la industria del etanol de segunda generación. Por este motivo, en años recientes se han desarrollado importantes avances a escala de laboratorio para lograr una producción más barata y eficiente de estas enzimas; sin embargo, poco se ha investigado acerca del desempeño económico de estos avances una vez llevado a cabo el escalamiento a nivel industrial. Para hacer frente a este problema, la siguiente tesis plantea el diseño de un proceso para la producción de un *cocktail* enzimático de alta actividad xilanolítica utilizando bagazo de caña de azúcar como fuente de carbono teniendo en cuenta la cinética de secreción enzimática del hongo *Trichoderma harzianum* P49P11 bajo una estrategia de fermentación sumergida por lotes alimentados, el escalamiento de las operaciones unitarias requeridas para la recuperación de enzimas por precipitación con etanol, la implementación de un esquema óptimo de secuenciamiento de tareas y la estimación de los índices de rentabilidad asociados. El proceso se diseñó considerando el procesamiento de 749 kg de bagazo de caña de azúcar por lote, lo que permitió obtener una capacidad de producción de 271 lotes de 2.35 metros cúbicos de *cocktail* enzimático por año. El producto posee una concentración de proteínas de 15.13 g/L, una actividad enzimática de xilanasas de 485.67 U/mL y un costo de producción de 38.21 US\$ por litro. El VAN del proyecto se estimó en US\$ MM 16.16, mientras que la TIR se estimó en 27.71%, lo que permitió confirmar que el proceso diseñado es técnica y económicamente viable.

### **PALABRAS CLAVES:**

Enzimas xilanolíticas; bagazo de caña de azúcar; *Trichoderma harzianum*; fermentación sumergida; precipitación de enzimas con etanol; diseño de procesos

## ABSTRACT

### DESIGN OF A HEMICELLULOLYTIC ENZYMES PRODUCTION PROCESS USING SUGARCANE BAGASSE AS AN INDUCER AND CARBON SOURCE

Xylanolytic enzymes are industrial biocatalysts with an increasing demand in the second – generation ethanol industry. Due to this, major advances in recent years regarding its cheaper and more efficient production from a lab - scale point of view have been developed; however, little has been investigated about the economic performance of these innovations after scale - up has taken place. In order to face this problem, the following research project comprises the design of a process to produce a high – xylanase activity enzymatic *cocktail* using sugarcane bagasse as a carbon source taking into account the kinetics of enzymatic secretion by *Trichoderma harzianum* P49P11 under *fed - batch* mode fermentation conditions, the scale – up of the unit operations required to perform the enzyme recovery by ethanol precipitation, the implementation of an optimal scheduling scheme and the project financial analysis. The process was designed from a design basis of 749 kg of sugarcane bagasse and resulted in a production capacity of 271 batches of 2.35 cubic meters of enzymatic *cocktail* per year. The product has a protein concentration of 15.13 g/L, a xylanase enzymatic activity of 485.67 U/mL and a unit production cost of US\$ 38.21 per liter. This project resulted in a NPV of US\$ 16.16 MM and an IRR of 27.71%, which confirmed that the designed process is technically and economically feasible.

#### KEYWORDS:

Xylanolytic enzymes; sugarcane bagasse; *Trichoderma harzianum* P49P11; submerged fermentation; enzyme precipitation with ethanol; process design

# INTRODUCCIÓN

Las enzimas xilanolíticas, comúnmente conocidas como hemicelulasas, son biocatalizadores industriales con una demanda creciente en el mercado mundial de productos biotecnológicos y de base biológica. Junto con las enzimas celulolíticas, representan más del 15% de la actual cuota de mercado mundial de las enzimas carbohidrasas, con una tasa de crecimiento anual media del 9.2% y un valor neto de aproximadamente 8.5 billones de dólares proyectado para 2024 [1]. La razón de la alta demanda de estas enzimas en el mercado es su capacidad para degradar la biomasa lignocelulósica que resulta especialmente atractiva para una variedad de sectores industriales incluyendo el de papel y pulpa, el de producción de detergentes, el de producción de alimentos agropecuarios, el de biocombustibles y las industrias alimentarias [1] [2]. Entre ellas, la producción de biocombustibles ha experimentado un desarrollo remarcable en los últimos años, motivado por la continua búsqueda de fuentes de energía alternativas y la reducción de la huella de carbono asociada a las actividades industriales [3].

Hasta la fecha se ha puesto gran énfasis en la reducción de costos de producción de las celulasas debido a su papel clave en la sacarificación de la biomasa celulósica para la producción de etanol de segunda generación. Sin embargo, se ha demostrado que para lograr una mayor conversión durante la hidrólisis enzimática resulta clave alimentar hemicelulasas para degradar las cadenas poliméricas de hemicelulosa presentes en la biomasa [4]. Estas cadenas actúan como un inhibidor en el proceso de sacarificación de las moléculas de celulosa, lo que limita el procesamiento económicamente atractivo de este producto.

La producción industrial de enzimas para la degradación de biomasa lignocelulósica se basa en el uso de ciertas especies de hongos filamentosos a condiciones controladas de pH, temperatura y disponibilidad de nutrientes en el medio para inducir la secreción de complejos enzimáticos hidrolíticos [5]. Una vez ocurrida la secreción se llevan a cabo operaciones unitarias físico - mecánicas y físico - químicas para obtener *cocktails*

concentrados con una alta actividad enzimática [6]. En los procesos actuales de producción de xilanasas se sabe que el costo de capital constituye una contribución importante a los costos de producción (45% - 48%), seguida inmediatamente por el aporte de las materias primas (25% - 28%) [7] [8]. Debido a esto, en años recientes se ha investigado el uso de una combinación de fuentes de carbono alternativas y de nuevas cepas fúngicas, así como el uso de metodologías de recuperación en un solo paso tales como la precipitación con etanol [5] [6]. Sin embargo, en lo mejor del conocimiento del autor de esta tesis, ningún estudio previo ha analizado el impacto de estos avances en la economía del proceso. En vista de ello, esta investigación se enfoca en el diseño de un proceso para la producción de un *cocktail* enzimático de alta actividad xilanolítica basado en el uso de bagazo de caña de azúcar como una fuente de carbono alternativa y la precipitación con etanol como estrategia de separación.

En esta tesis se realizó un diseño fundamentado en el escalamiento de investigaciones reportadas a nivel de laboratorio publicadas en los últimos 10 años. Como primer paso, se estableció la capacidad de producción del proceso contemplando el uso de una cierta cantidad de bagazo de caña de azúcar por cada lote producido. Posteriormente, se realizó una simulación de la cinética de producción enzimática para determinar las condiciones de operación más adecuadas en la etapa de fermentación sumergida y se determinó el consumo real de bagazo de caña crudo para el proceso bajo estudio. A continuación, se realizaron los cálculos de balance de materia y energía, así como los cálculos de dimensionamiento de los equipos en las secciones de pretratamiento de materia prima, fermentación y recuperación de enzimas en cada caso. Por último, se realizó una evaluación económica en función del secuenciamiento de tareas del proceso, que dio como resultado un CapEx, un OpEx y un costo unitario de producción para cada configuración del proceso, y se estimó el precio mínimo de venta, el precio real de venta, el VAN y la TIR del proyecto asumiendo un período de recuperación de la inversión de 20 años.

# CAPÍTULO I

## OBJETIVOS

### 1.1. Objetivo general

- Diseñar un proceso de producción de un *cocktail* enzimático de alta actividad xilanolítica de costo reducido utilizando bagazo de caña de azúcar como sustrato e inductor de expresión de enzimas en el metabolismo del hongo *Trichoderma harzianum* P49P11.

### 1.2. Objetivos específicos

- Determinar los parámetros de operación en la etapa de fermentación sumergida a partir del modelo matemático de secreción enzimática del hongo *Trichoderma harzianum* P49P11 propuesto por Gelain *et al.* con la finalidad de optimizar el rendimiento del proceso unitario.
- Diseñar las secciones de pretratamiento de materia prima, fermentación sumergida y recuperación de enzimas del proceso a partir de datos experimentales previamente reportados en la literatura con la finalidad de implementar un proceso técnicamente viable.
- Realizar un secuenciamiento de las tareas requeridas en la producción de un lote de producto a partir de la identificación de la etapa limitante y la evaluación de estrategias de operación alternativas con la finalidad de incrementar la capacidad de producción y disminuir los costos de producción por litro de producto.
- Evaluar la viabilidad económica del proceso a partir del cálculo del CapEx, OpEx, VAN, TIR y un análisis de sensibilidad frente a las variables económicas más

resultantes del proceso con la finalidad de determinar si el proceso es rentable bajo las condiciones asumidas.

- Realizar un análisis de seguridad a partir de la metodología HAZID con la finalidad de identificar los riesgos asociados a la operación del proceso y las estrategias de mitigación de riesgos correspondientes.

# CAPÍTULO II

## MARCO TEÓRICO

### 2.1. Composición de la biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica es una fuente de materia orgánica renovable que está compuesta principalmente por 3 tipos de polímeros estructurales: celulosa, hemicelulosa y lignina. A continuación, se presenta una breve definición de estos 3 polímeros.

#### 2.1.1. Celulosa

La celulosa es una cadena polimérica compuesta por unidades repetidas del disacárido celobiosa. Usualmente, las cadenas de celulosa (de entre 20 y 300 unidades monoméricas) se agrupan para formar fibras. Estas fibras se encuentran cubiertas por hemicelulosa y lignina en la estructura típica de un material lignocelulósico. La Figura 2.1 ilustra la estructura típica de este polisacárido [9].

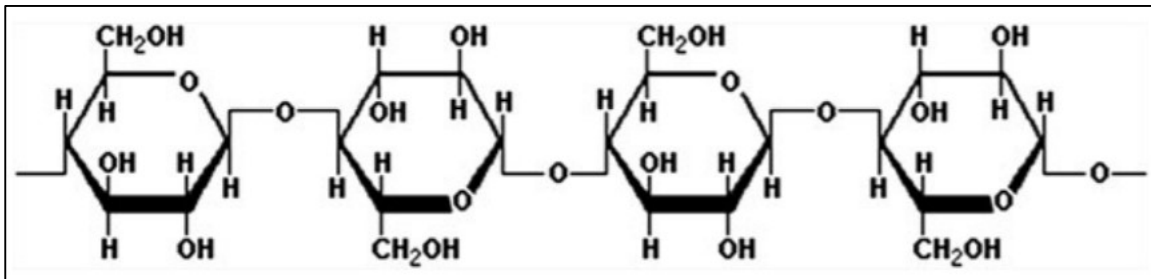


Figura 2. 1. Estructura polimérica de la celulosa [10]

#### 2.1.2. Hemicelulosa

A diferencia de la celulosa, la hemicelulosa no es un polisacárido químicamente homogéneo, sino que puede estar compuesto por pentosas (xilosa, rhamnosa y arabinosa), hexosas (glucosa, manosa y galactosa) y ácidos urónicos (ácidos 4 – O – metilglucurónico,



D – glucurónico y D – galactourónico). La característica principal de la hemicelulosa son los enlaces glucosídicos de tipo beta 1 - 4 y, ocasionalmente, beta 1 – 3 presentes en la cadena principal. Las Figuras 2.2, 2.3 y 2.4 muestran las estructuras típicas de las hemicelulosas más comunes [9].

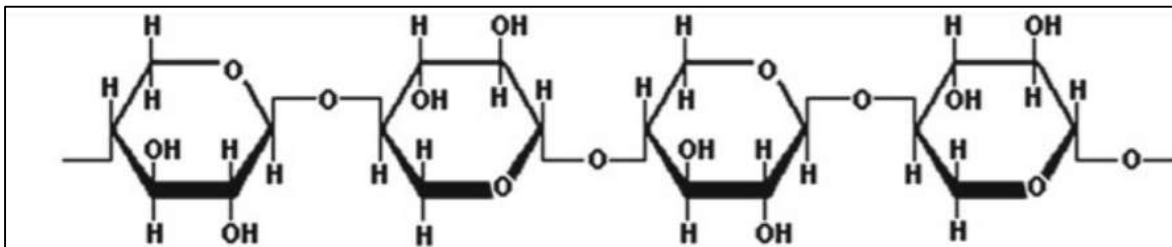


Figura 2. 2. Estructura polimérica del xilano [10]

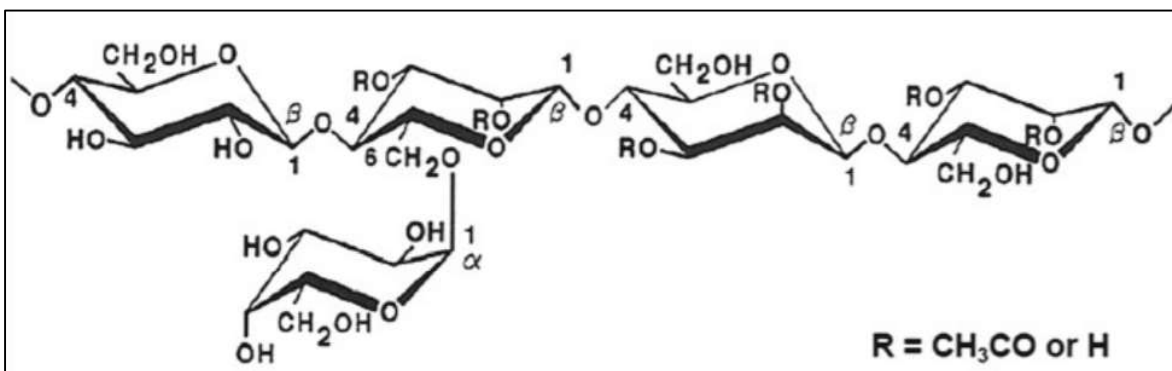


Figura 2. 3. Estructura polimérica de los galacto – glucomananos [10]

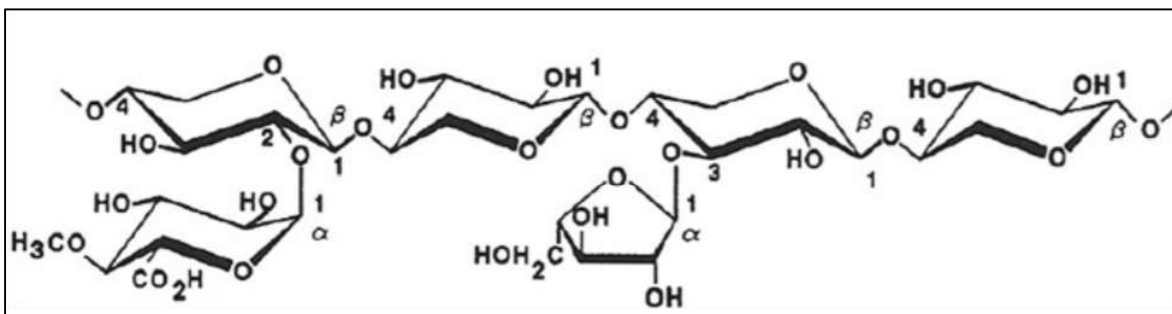


Figura 2. 4. Estructura polimérica de los arabinoglucuronoxilanos [10]

### 2.1.3. Lignina

La lignina, por su parte, es una estructura polimérica compleja y de gran tamaño molecular que contiene polímeros entrecruzados compuestos por monómeros fenólicos (guaiacilalcohol, p – hidroxifenil alcohol y singiril alcohol) unidos por enlaces de tipo alquil – aril, alquil – alquil o aril - aril. Se encuentra presente en la pared celular de las plantas y confiere una resistencia impermeable a los ataques microbianos o al estrés oxidativo [9]. La Figura 2.5 ilustra la estructura típica del este polisacárido [9].

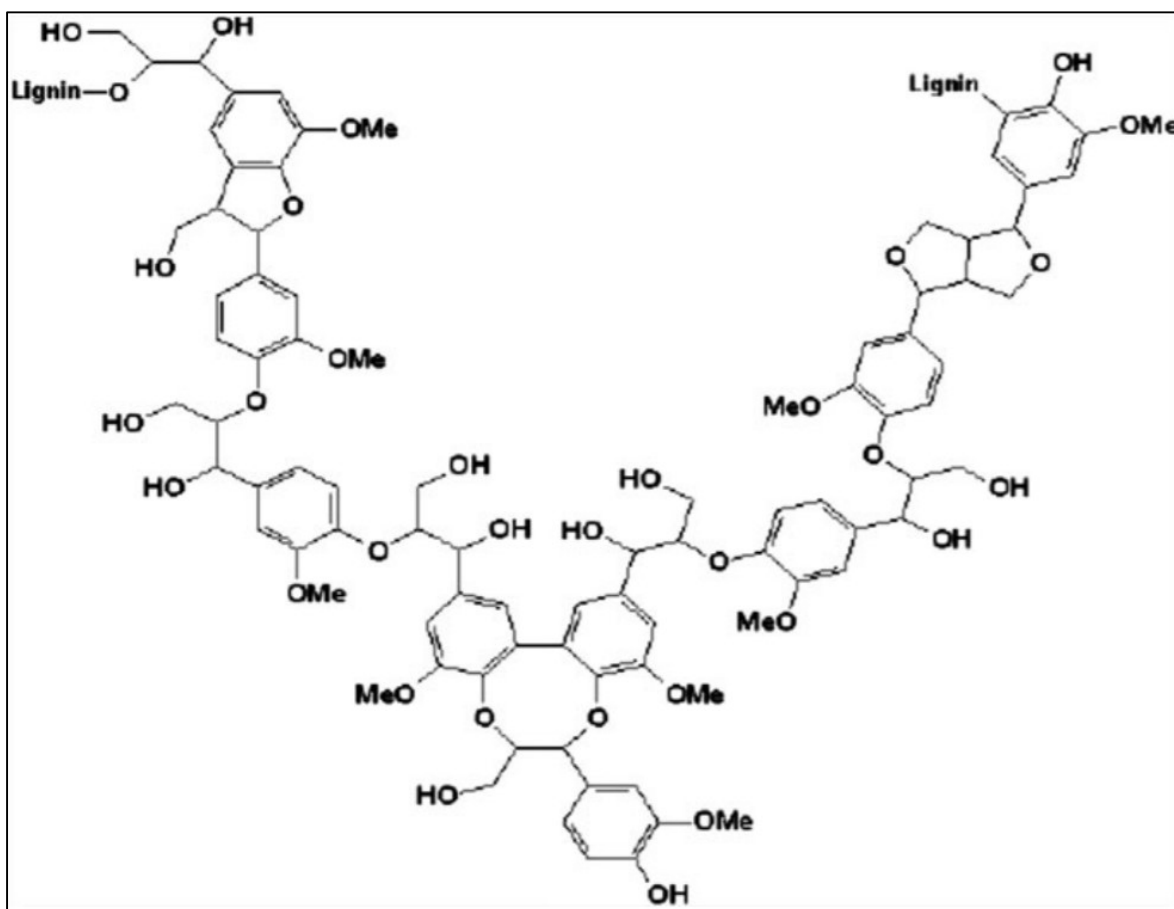


Figura 2. 5. Estructura polimérica de la lignina [10]

## 2.2. Enzimas xilanolíticas

Las enzimas son estructuras polipeptídicas capaces de favorecer la ocurrencia de una reacción química mediante la reducción de su energía de activación. En línea con lo anterior, las enzimas xilanolíticas son enzimas con actividad específica sobre la descomposición del xilano [9]. Por su composición química compleja y su heterogeneidad, se requieren de distintos tipos de reacciones para la descomposición de este polisacárido. Las siguientes hidrolasas se clasifican como enzimas xilanolíticas:

- $\beta$  - 1, 4 - endoxilanasas
- $\beta$  - xilosidasas
- Acetil - xilano - esterasas
- Arabinasas
- $\alpha$  - glucuronidasas
- Esterasas de ácido ferúlico y ácido paracumárico

Estas enzimas actúan de manera sinérgica para efectuar la conversión del xilano en sus azúcares constituyentes. La secreción simultánea ocurre de manera natural en organismos descomponedores, tales como los hongos filamentosos, bacterias y actinomicetos.

### 2.2.1. Clasificación

De manera general, la clasificación de las enzimas se basa en propiedades tales como la masa molecular y el punto isoeléctrico, la estructura cristalina y las propiedades cinéticas o catalíticas. La clasificación actual se basa en una combinación de los dos últimos criterios mencionados, por lo que se busca conocer tanto la estructura primaria como las funciones mecanísticas de las enzimas durante los ensayos de caracterización. Esta información, junto a la secuencia de material genético respectiva, se encuentra descrita para cada familia de

enzimas glucósido hidrolasas (GH) en la base de datos CAZy, del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) [11].

Se ha determinado que las familias GH 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 26, 30, 43, 44, 51 y 62 son las de mayor grado de asociación a las xilanasas. Sin embargo, estas son típicamente clasificadas bajo las familias GH 10 y 11, tomando los criterios de comportamiento hidrofóbico de los dominios catalíticos y de similitud en las secuencias de aminoácidos. Este hecho resulta beneficioso, ya que las familias de enzimas GH 10 y 11 han sido estudiadas extensivamente y se dispone de una gran cantidad de información en comparación a las familias 5, 7, 8 y 43 [11].

### **2.2.2. Actividad enzimática**

La actividad enzimática es una medida de la capacidad que posee una enzima para convertir un sustrato y se cuantifica en unidades enzimáticas ( $U$ ). 1  $U$  es dimensionalmente equivalente a 1  $\mu\text{mol}/\text{min}$ , y se interpreta físicamente como la cantidad de enzima que está en la capacidad de degradar 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato en 1 minuto.

En el caso de las enzimas xilanolíticas, al ser un grupo de enzimas que actúan sobre un polisacárido heterogéneo, se estila utilizar procedimientos estandarizados reportados en la literatura para cuantificar la actividad total, tales como el método de Bailey [12], en el cual se mide la capacidad de degradar una cantidad conocida de solución de sustrato de grado analítico (1 gramo de xilano de abedul al 1% en 4 – O – metilglucuronoxilano disuelto en un buffer pH 5.3 0.05 M de citrato de sodio a una proporción de 1 g de xilano de abedul por 80 mL de solución buffer) utilizando la solución enzimática por un tiempo de 5 minutos. La absorbancia de la solución es cuantificada a 540 nm, y posteriormente comparada con un blanco de sustrato sin la adición de la solución enzimática. La cantidad de sustrato consumida es determinada de manera indirecta mediante una relación matemática entre la absorbancia y la concentración de sustrato en el medio, y la diferencia en la concentración de sustrato es relacionada al tiempo de análisis para obtener la actividad enzimática presente en la solución.

### **2.3. Microorganismos empleados en la producción de enzimas xilanolíticas**

La secreción de enzimas xilanolíticas es una función biológica naturalmente presente en muchas especies de microorganismos. Entre los productores espontáneos se encuentran distintos ejemplares de hongos filamentosos, bacterias marinas y terrestres, algas marinas, protozoarios, caracoles, crustáceos, insectos, plantas terrestres y sus semillas. A nivel industrial se ha reportado el empleo tanto de bacterias como hongos filamentosos [9].

#### **2.3.1. Hongos filamentosos**

Al ser microorganismos descomponedores por naturaleza, los hongos filamentosos han despertado interés como productores por su capacidad de secreción exógena. Esto elimina la necesidad de llevar a cabo operaciones de lisis celular antes de la purificación. Por otro lado, los niveles de actividad secretados por estos microorganismos suelen ser mayores, y usualmente la secreción ocurre en paralelo con otros tipos de enzimas para la descomposición de la biomasa, tales como las celulasas o ligninasas. En la industria destaca el empleo de los géneros *Trichoderma* y *Aspergillus* [9].

### **2.4. Residuos agrícolas como sustratos para la producción de enzimas**

Puesto que la hemicelulosa es un material que está naturalmente presente en la pared celular de las plantas, los residuos agrícolas constituyen una fuente promisoría de recursos para la producción de enzimas xilanolíticas. Adicionalmente, el bajo costo y la alta disponibilidad de estos residuos los convierten en materias primas económicamente atractivas [13]. La Tabla 2.1 muestra la composición típica de celulosa, hemicelulosa y lignina de algunos de los residuos más comunes.

<b>Residuo agrícola</b>	<b>% en base seca de celulosa</b>	<b>% en base seca de hemicelulosa</b>	<b>% en base seca de lignina</b>
Fibra de coco	36 - 43	15 - 25	41 - 45
Bagazo de caña	35 - 45	25 - 35	25 - 35
Cáscaras de nuez	25 - 30	25 - 30	30 - 40
Cáscara de plátano	53	29	15
Coronta de maíz	45	35	15
Paja de centeno	38	31	19
Paja de caña	36	21	16
Salvado de arroz	35	25	17
Tallos de soya	35	25	20
Salvado de maíz	34	39	49
Tallos de maíz	34	24	9
Tallos de girasol	34	20	17
Paja de arroz	32	24	18
Salvado de trigo	30	50	15
Paja de trigo	27	21	23
Paja de cebada	23	21	21
Paja de canola	22	17	20
Cascarilla de arroz	22	23	15
Cáscara de café	18	13	-
Fibra de maíz	15	35	8
Granos de café	9	37	-

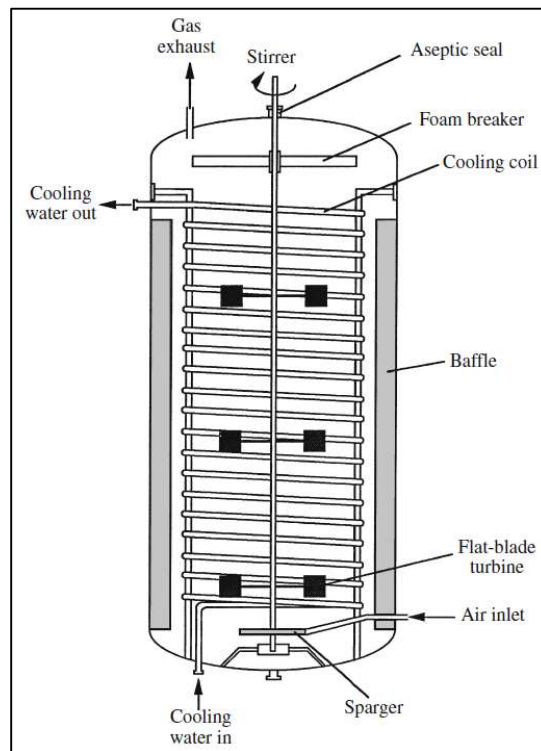
**Tabla 2. 1.** Composición porcentual en base seca de celulosa, hemicelulosa y lignina de distintos residuos agrícolas [13]

En las regiones costeras de Brasil la industria del etanol ha provocado un crecimiento sostenido en la demanda de caña de azúcar, lo que ha incrementado sustancialmente la oferta de bagazo en este país. Según Hofsetz y Silva [14], la oferta en 2015 se calculó en 7 millones de toneladas al año, y se proyecta un crecimiento sostenido hasta el 2030, año en que se espera alcanzar una oferta de 25.9 millones de toneladas al año. Por este motivo, se seleccionó al bagazo de caña de azúcar como materia prima del proceso bajo estudio.

## 2.5. Producción de enzimas xilanolíticas por fermentación sumergida

La fermentación sumergida consiste en la dispersión de tanto el sustrato como el microorganismo secretor en una fase acuosa. El suministro de oxígeno requerido por el microorganismo se da a través de una interfase gas – líquido que se origina al alimentar aire estéril por la sección inferior del equipo. El crecimiento celular y la secreción del producto ocurren siempre en la fase acuosa [15]. Los equipos para esta configuración suelen seguir el esquema mostrado en la Figura 2.6.

Actualmente, casi el 90% de la producción mundial de enzimas xilanolíticas se da a través de este método [16]. Entre los motivos se encuentran la facilidad para el control y la automatización de los tanques agitados o tanques agitados aireados, la simpleza en el escalamiento de estos equipos y la versatilidad para implementar configuraciones alternativas de alimentación de sustrato durante la fermentación.



**Figura 2. 6.** Esquema general de un biorreactor de tanque agitado equipado con un serpentín interno de refrigeración para llevar a cabo una fermentación sumergida [15]

Por lo expuesto en el párrafo anterior se decidió optar por la fermentación sumergida para la secreción de enzimas en el proceso. Esto además permitió evaluar estrategias alternativas en la alimentación del sustrato para incrementar la capacidad productiva del proceso unitario.

## 2.6. Modelamiento matemático de la producción enzimática

El modelamiento matemático de la secreción de enzimas toma en cuenta los factores de disponibilidad de sustrato en el medio, cantidad de producto secretado, cantidad de microorganismos dispersos y el comportamiento reproductivo de estos últimos en función del tiempo. Adicionalmente se pueden considerar parámetros como el consumo de oxígeno en el medio (en caso se esté modelando el comportamiento de un microorganismo aeróbico), o expresiones para la inhibición por exceso de sustrato en el medio, por exceso de producto o por ambos. Aunque en ocasiones estos modelos se pueden representar con ecuaciones algebraicas, es usual recurrir al empleo de ecuaciones diferenciales acopladas cuya resolución muestra la conversión del sustrato en producto en función del tiempo, el crecimiento del cultivo celular y los tiempos en donde la actividad enzimática es máxima [15].

La secreción de un producto a partir de un sustrato por la actividad celular y el crecimiento asociado de las células se puede representar de manera análoga a una reacción química empleando la ecuación (1):



Donde “S” representa las moles de sustrato, “X” las moles de microorganismos inicialmente presentes antes del consumo del sustrato, “P” el producto secretado por parte de estos microorganismos y “n” un factor de proporcionalidad que representa el incremento de la población del microorganismo por acción de la reproducción. Un modelo construido adecuadamente debe contemplar las interacciones entre los elementos descritos



anteriormente, de manera que se cumplan algunos o todos los criterios mostrados en las ecuaciones (2), (3), (4), y (5), según las asunciones declaradas en la etapa de modelamiento.

$$\mu = f(S, X, P) \quad (2)$$

$$\frac{dX}{dt} = f(\mu, S, X) \quad (3)$$

$$\frac{dS}{dt} = f(S) \quad (4)$$

$$\frac{dP}{dt} = f(S, X) \quad (5)$$

Donde  $\mu$  representa una tasa de crecimiento específico que modela los efectos de la inhibición por sustrato, por producto o por ambos términos y  $t$  representa el tiempo.

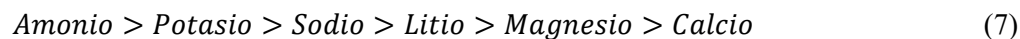
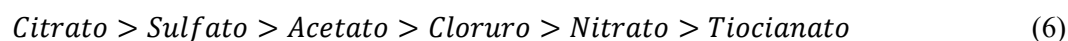
## 2.7. Operaciones unitarias para la recuperación de enzimas

Una vez culminada la secreción de enzimas en el caldo de fermentación, existen distintos tipos de operaciones unitarias para su recuperación y purificación. Esta etapa se inicia con operaciones de recuperación tales como la precipitación con sulfato de amonio, con etanol o mediante el uso de un sistema acuoso bifásico [16]. La selección de estas operaciones está en función de los porcentajes de recuperación reportados previamente en ensayos experimentales.

Adicionalmente, dependiendo del grado de pureza requerida, puede ser necesario optar por el uso de técnicas de alta resolución como la cromatografía de intercambio iónico o la cromatografía basada en filtración por gel. Estas técnicas generalmente se emplean en la industria farmacéutica o de *biologics*, o cuando la selectividad en la recuperación de las xilanasas frente a otras enzimas secretadas en paralelo resulta fundamental, tal como ocurre en las aplicaciones relacionadas a la industria del papel y pulpas [9].

### 2.7.1. Precipitación con sulfato de amonio

La precipitación con sulfato de amonio es un método utilizado para la recuperación selectiva de proteínas en un medio acuoso. La técnica consiste en la introducción de la sal, ya sea en forma de una solución saturada o en forma cristalina, hasta lograr la precipitación de las proteínas de interés. El principio de este método se conoce como “*salting out*”, y está basado en la precipitación de proteínas por medio de una diferencia en la fuerza iónica de un medio. La conveniencia del uso del sulfato de amonio frente a otras sales se debe a la efectividad relativa de sus cationes y aniones de acuerdo con las clasificaciones de Hofmeister para aniones [15] [17], mostrada en la ecuación (6), y cationes, mostrada en la ecuación (7).



Típicamente, para la precipitación de enzimas xilanolíticas se emplea un rango de concentraciones de sulfato de amonio que oscila entre el 30% y el 90% de saturación [17].

Una vez precipitadas, las enzimas suelen tener una concentración de sulfato de amonio muy elevada que imposibilita su inmediata distribución y comercialización, por lo cual se suele realizar una operación unitaria subsecuente de diálisis. Esta consiste en el paso de una solución resuspendida de las enzimas precipitadas a través de una membrana selectiva que permite la separación de las sales por medio de un gradiente de presiones osmóticas [17].

### 2.7.2. Precipitación con etanol

La precipitación con etanol también es un método empleado a nivel industrial para la recuperación de enzimas. El principio de precipitación consiste en el eventual desplazamiento de las moléculas de agua en la superficie de las proteínas por moléculas de etanol, cuya afinidad es mayor, hasta que se alcanza un punto de predominancia en las interacciones proteína – etanol. Posteriormente ocurre una aglomeración por efecto de las

fuerzas electrostáticas y de tipo dipolo – dipolo que provoca la precipitación de las proteínas [15].

# CAPÍTULO III

## ESTADO DEL ARTE

### 3.1. Producción de enzimas xilanolíticas a partir de residuos agrícolas

Los residuos agrícolas constituyen una fuente abundante y barata de biomasa rica en celulosa y hemicelulosa, lo cual los convierte en excelentes sustratos para producir enzimas por fermentación sumergida. En este contexto, se procede a describir los reportes hallados en la literatura científica de investigaciones recientes realizadas en este campo.

En 2012, Kundu *et al.* [18] reportaron el uso de fibras de yute como sustrato para la producción de xilanasas por fermentación sumergida utilizando *Penicillium janthinellum*. Luego de efectuar una optimización de parámetros por el método RSM (*Response Surface Methodology*, por sus siglas en inglés), se obtuvo una actividad enzimática de 1750 U/mL al efectuar la fermentación sumergida en un medio compuesto por 0.9 g/L de peptona, 0.9 g/L de bifosfato de amonio, 0.1 g/L de cloruro de potasio y 0.1 g/L de sulfato de magnesio heptahidratado, a condiciones de pH en el medio de 7, 29.69°C y una concentración de fibras de yute del 2.11% en masa - volumen.

En 2016, Delabona *et al.* [19] reportaron el uso combinado de glicerol y materiales celulósicos como sustratos para la producción de xilanasas por fermentación sumergida utilizando *Trichoderma harzianum*. Tras probar distintos tipos y concentraciones de fuentes de carbono, así como arreglos de tipo *batch* y *fed - batch*, se determinó una actividad enzimática máxima de 106.4 U/mL al utilizar glicerol como agente de cultivo para conseguir densidades celulares altas y bagazo de caña pretratado por explosión de vapor como agente inductor en un medio compuesto por 0.3 g/L de urea, 2 g/L de bifosfato de potasio, 1.4 g/L de sulfato de amonio, 0.4 g/L de cloruro de calcio, 0.3 g/L de sulfato de magnesio heptahidratado, 1 g/L de peptona, 5 mg/L de sulfato ferroso heptahidratado, 1.6 mg/L de sulfato de manganeso tetrahidratado, 1.4 mg/L de sulfato de zinc y 2 mg/L de cloruro de cobalto hexahidratado, a condiciones de pH en el medio de 5 y 29°C.

En 2020, Gautério *et al.* [20] reportaron el uso de salvado de arroz como sustrato para la producción de xilanasas por fermentación sumergida utilizando *Aureobasidium pullulans*. Tras llevar a cabo una optimización por el método FFD (Fractional Factorial Design, por sus siglas en inglés), se obtuvo una actividad enzimática de 82.2 U/mL al realizar la fermentación sumergida en un medio compuesto por 61.9 g/L de salvado de arroz, 3.6 g/L de sulfato de amonio y 1.5 g/L de extracto de levadura, a condiciones constantes de pH en el medio de 8 y 28°C.

A fin de incluir un resumen de los avances realizados en este campo, se muestra a continuación la Tabla 3.1, que recopila los resultados reportados por Kundu *et al.*, Da Silva Delabona *et al.*, y Gautério *et al.* en conjunto con otras investigaciones realizadas por Biswas *et al.* [21], Knob *et al.* [22] y Fortkamp y Knob [23] utilizando residuos agrícolas como sustrato para la fermentación sumergida.

Microorganismo	Sustrato	Actividad reportada (U/mL)	Referencia	Año
<i>Melanocarpus albomyces</i>	Paja de trigo	550	[21]	2010
<i>Penicillium janthinellum</i>	Fibras de yute	1750	[18]	2012
<i>Penicillium glabrum</i>	Residuos de granos cerveceros	51.43	[22]	2013
<i>Trichoderma viride</i>	Cáscaras de piña	73.09	[23]	2014
<i>Trichoderma harzianum</i>	Bagazo de caña de azúcar	106.4	[19]	2016
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Salvado de arroz	82.2	[20]	2020

**Tabla 3. 1.** Actividades máximas reportadas por distintos autores utilizando distintos residuos agrícolas como sustratos para la fermentación

La comparación de los datos reportados demuestra que los residuos agrícolas con mayor poder inductor son las fibras de yute, la paja de trigo y el bagazo de caña para la secreción de enzimas xilanolíticas. En línea con lo expuesto en la Sección 2.4, los resultados

de la Tabla 3.1 refuerzan la selección del bagazo de caña de azúcar como sustrato para la fermentación. Por otro lado, es importante remarcar la alta actividad enzimática obtenida por el hongo *Penicillium janthinellum* al utilizar fibras de yute como sustrato para la fermentación, la cual supera en al menos un orden de magnitud a los demás microorganismos reportados.

### **3.2. Modelos matemáticos de producción enzimática**

Para evaluar el desempeño de la fermentación sumergida es posible realizar simulaciones numéricas para determinar parámetros y modos de operación que minimicen tiempos de operación y/o incrementen la eficiencia del proceso unitario. Para ello, es necesario contar con modelos matemáticos construidos y validados experimentalmente a escala banco, piloto o industrial que hayan sido reportados en la literatura científica. A continuación, se describen algunos modelos de producción de enzimas xilanolíticas.

En 2011, Coman [24] estudió la cinética de producción de enzimas xilanolíticas por parte de *Streptomyces spp. P12* usando salvado de trigo como sustrato bajo un esquema de operación por lotes. El objetivo de la investigación fue la construcción y validación de un modelo matemático para la implementación de un sistema de control en el proceso de producción basado en un enfoque “input – output”. Para esto, se llevaron a cabo las pruebas experimentales monitoreando los parámetros de concentración de biomasa, de sustrato, de producto y de oxígeno disuelto en el medio de cultivo dentro de un biorreactor de tanque agitado de 1 L de capacidad volumétrica a condiciones controladas de temperatura, pH, flujo de aire y velocidad de agitación. En vez de emplear un enfoque mecanístico, los modelos matemáticos fueron elaborados de manera correlacional utilizando los criterios de variables de entrada, salida e internas, y se utilizó directamente la data experimental recopilada para la simulación dinámica empleando el software MATLAB v. 7.9.0.529.

En el modelo empleado se declara no haber tomado criterios de inhibición por sustrato o por producto. La ecuación (8) describe el modelo empleado para el crecimiento de la biomasa:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X + DX_r \quad (8)$$

Donde  $X$  representa la concentración de biomasa,  $\mu$  representa la tasa de crecimiento específica de microorganismos,  $D$  representa un parámetro denominado tasa de dilución,  $X_r$  representa la concentración de biomasa añadida en el inóculo y  $t$  representa el tiempo.

El consumo de sustrato fue modelado por la ecuación (9):

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{\mu}{Y}X + DS_{in} \quad (9)$$

Donde  $S$  representa la concentración de sustrato en el medio,  $Y$  representa el parámetro adimensional de rendimiento y  $S_{in}$  representa la concentración de sustrato en el inóculo.

La evolución de la concentración de oxígeno disuelto fue modelada por la ecuación (10):

$$\frac{dDO}{dt} = -\frac{k_o\mu}{Y}X + \alpha W(DO_{max} - DO) \quad (10)$$

Donde  $DO$  representa la concentración de oxígeno disuelto en el medio,  $k_o$  representa una constante adimensional propia del modelo,  $\alpha$  representa la tasa de transferencia de oxígeno y  $W$  representa el flujo de aire alimentado al fermentador.

La producción de enzimas fue modelada por la ecuación (11):

$$\frac{dP}{dt} = q_P X \quad (11)$$

Donde  $q_P$  representa la tasa de formación de producto.

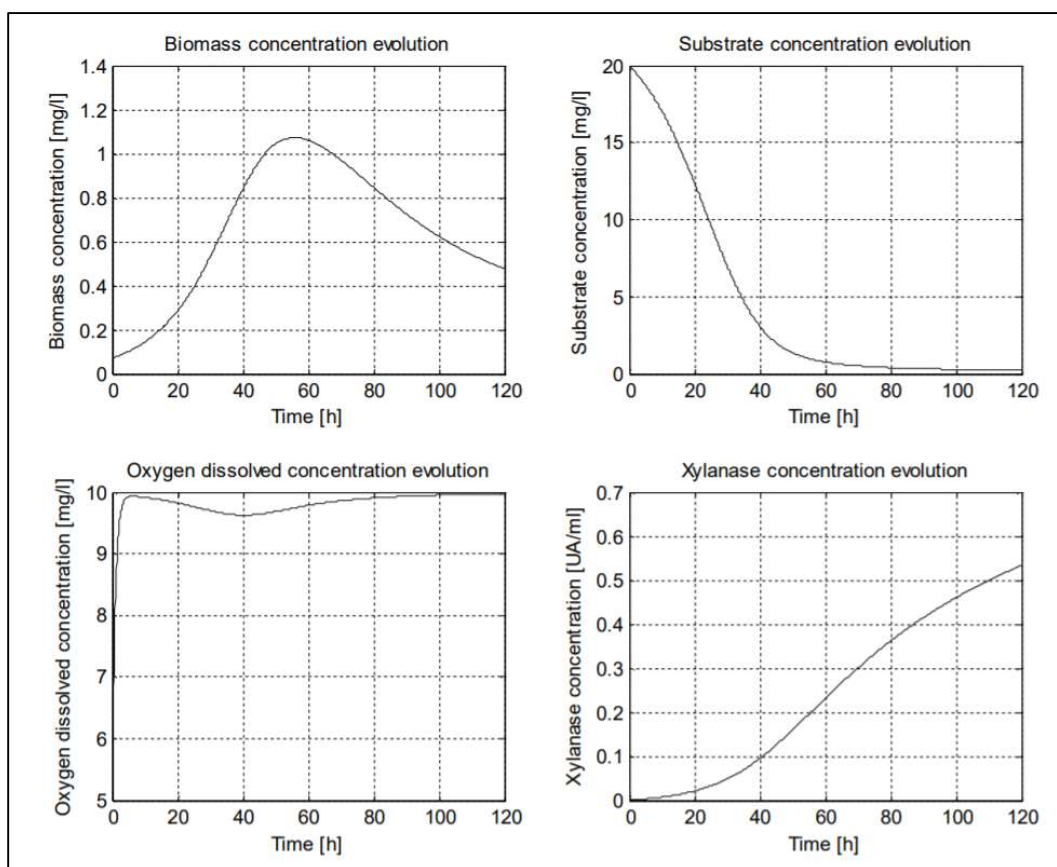
Por último, la tasa de crecimiento específica de los microorganismos fue modelada por la ecuación (12):

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{S}{k_S + S} \cdot \frac{DO}{k_{DO} + DO} \quad (12)$$

Donde  $\mu_{max}$  representa la tasa máxima de crecimiento,  $k_S$  representa una constante de saturación de sustrato y  $k_{DO}$  representa una constante de saturación de oxígeno. Es importante aclarar que la ecuación (12) contempla un modo de operación por lotes.

Los valores numéricos y las unidades de medición de los parámetros descritos en las ecuaciones (8), (9), (10), (11) y (12) se encuentran incluidos en el Anexo 1. La simulación numérica de las cuatro ecuaciones diferenciales acopladas permitió estudiar el comportamiento de los lotes de cultivo de los microorganismos por un tiempo de 120 horas, tal como se muestra en la Figura 3.1 El autor señala como conclusión que el empleo de modelos matemáticos basados en criterios de variables de entrada, intermedias y de salida, aunque limitados en su alcance, permiten obtener resultados adecuados para fines de control y automatización.





**Figura 3. 1.** Curvas obtenidas a partir de los modelos matemáticos planteados para las concentraciones de biomasa, sustrato, oxígeno disuelto y enzimas [24]

En 2015, Gong *et al.* [25] estudiaron la producción de enzimas xilanolíticas por parte de *Trichoderma reesei* utilizando lactosa pura como sustrato. La investigación conducida por los autores tuvo como objetivo establecer un modelo dinámico para la secreción de enzimas xilanolíticas por fermentación sumergida a escala piloto para luego estudiar la conveniencia del modo *fed - batch* por encima del modo *batch* para la secreción de enzimas xilanolíticas con una capacidad de producción aumentada. Para ello, se realizaron experimentos en un fermentador aireado de 30 L de capacidad volumétrica a condiciones preestablecidas de composición en el medio de cultivo. Las ecuaciones propuestas para el modelamiento matemático, cuyas expresiones se muestran a continuación, fueron validadas utilizando el software Origin 8.5 para realizar un ajuste no lineal con los datos experimentales recopilados y determinar los parámetros de operación del modelo.

Para modelar el crecimiento de la biomasa, los autores utilizaron la ecuación (13), que sigue la forma de la ecuación logística:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_m X \left(1 - \frac{X}{X_{max}}\right) \quad (13)$$

Donde  $X$  representa la concentración de biomasa,  $\mu_{max}$  representa la tasa máxima de crecimiento específica de microorganismos,  $X_{max}$  representa la concentración máxima de biomasa y  $t$  representa el tiempo.

Para modelar la producción de enzimas se empleó la ecuación (14), que sigue el modelo de Luedeking - Piret:

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad (14)$$

Donde  $\alpha$  representa un parámetro de secreción de producto asociada al crecimiento celular y  $\beta$  representa un parámetro de secreción de producto no asociada al crecimiento celular.

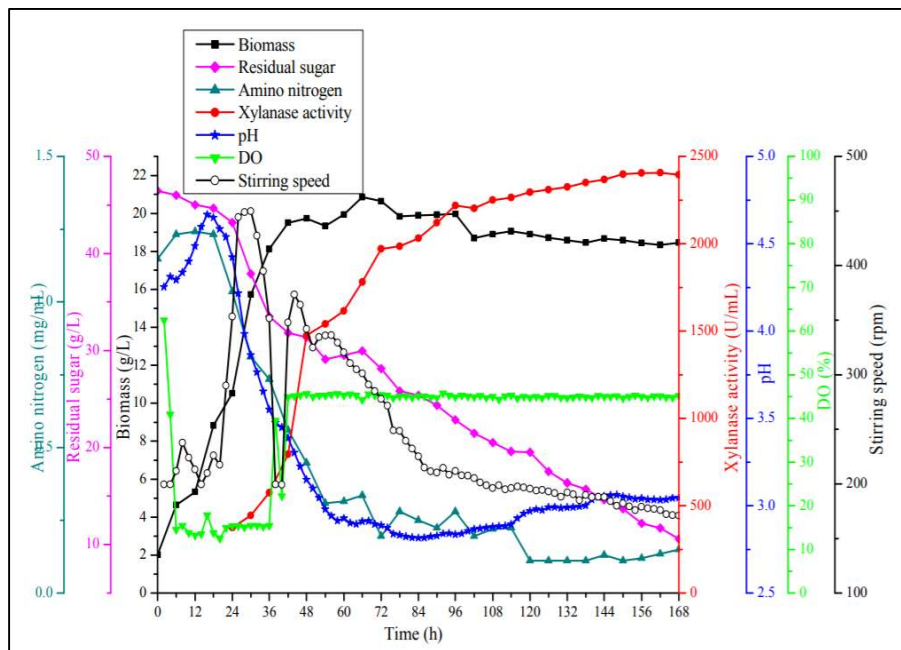
Para modelar el consumo de sustrato, se empleó la ecuación (15):

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \frac{dX}{dt} + \frac{1}{Y_{P/S}} \frac{dP}{dt} + mX \quad (15)$$

Donde  $S$  representa la concentración de sustrato en el medio,  $Y_{X/S}$  representa el rendimiento asociado a la concentración celular,  $Y_{P/S}$  representa el rendimiento asociado a la concentración de producto y  $m$  representa un coeficiente de mantenimiento.

Los valores numéricos y las unidades de medición de los parámetros descritos en las ecuaciones (13), (14) y (15) se encuentran incluidos en el Anexo 2. Para estas ecuaciones, se obtuvieron coeficientes de determinación de 0.94038, 0.85017 y 0.95668. En particular, los autores determinaron que la precisión de los modelos es baja tanto en el inicio como en el

final de la fermentación, pero para el resto de los valores de concentración de biomasa, producto y sustrato en el dominio del tiempo, el error cae a menos del 10% para cada punto estimado. Luego de llevar a cabo la integración numérica de los modelos matemáticos validados, procedieron a analizar el comportamiento de la fermentación y a diseñar una estrategia para probar el arreglo *fed - batch*. En particular, los autores determinaron que el momento óptimo para iniciar la realimentación del reactor con más sustrato fue cuando las células se encontraban en un estado de “semi - inanición”, que se produce a las 42 horas de haber iniciado la fermentación. La solución alimentada al fermentador estuvo compuesta por lactosa (255.85 g/L), sulfato de amonio (17.01 g/L), bifosfato de potasio (15.48 g/L) y sulfato de magnesio heptahidratado (4.54 g/L). Por otro lado, no se incluye información detallada acerca del volumen inicial de medio empleado para la fermentación inicial antes de alcanzar las 42 horas, ni acerca de la variación del volumen en función del tiempo al llevar a cabo la fermentación en modo *fed - batch*. La alimentación se realizó en 5 intervalos de 6 horas con tasas distintas de alimentación, hasta llegar a las 72 horas de haber iniciado la fermentación. Las Figuras 3.2, 3.3 y 3.4 muestran los resultados obtenidos:



**Figura 3. 2.** Datos experimentales obtenidos al llevar a cabo una configuración *fed - batch* para la secreción de enzimas xilanólíticas [25]

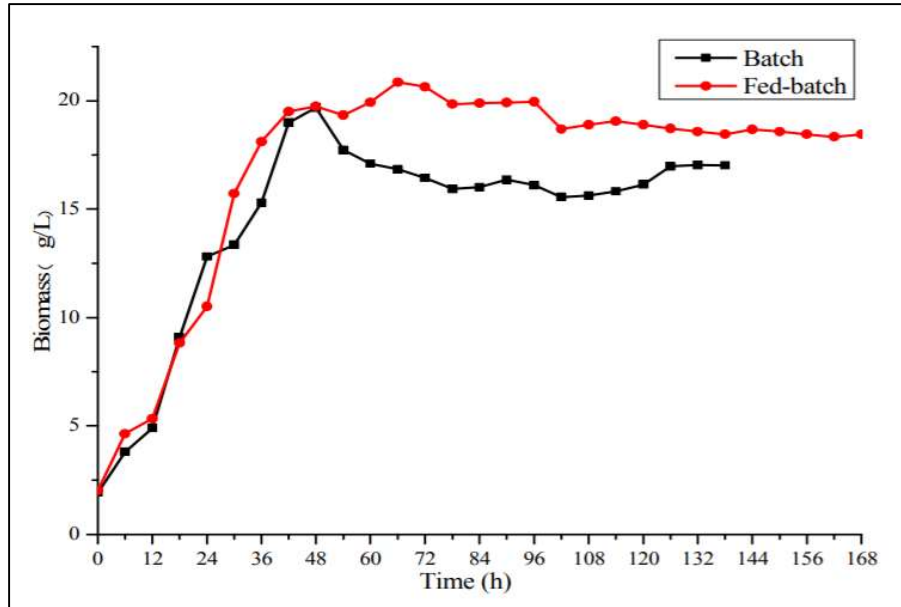


Figura 3. 3. Comparación de datos de biomasa producida a partir de un arreglo *batch* y *fed - batch* [25]

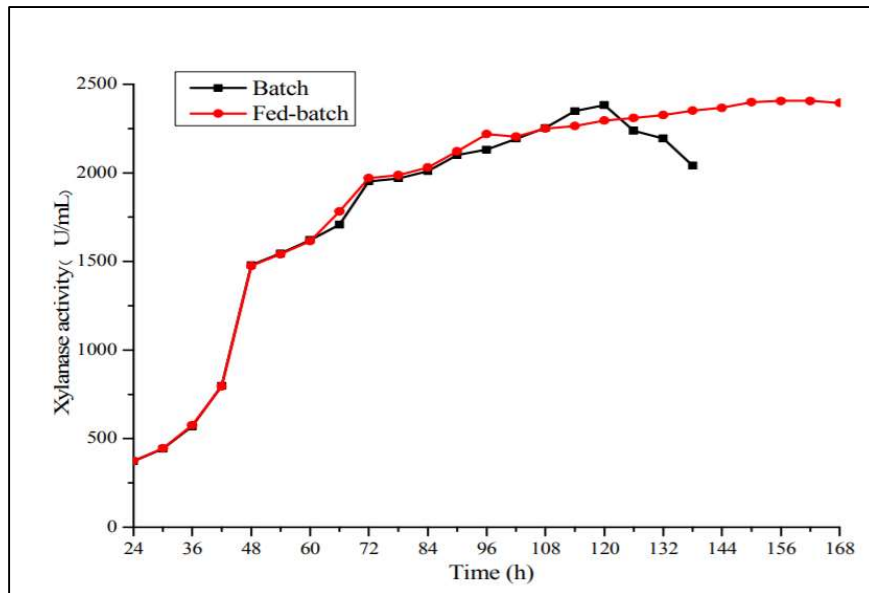


Figura 3. 4. Comparación de datos experimentales de actividades enzimáticas producidas a partir de un arreglo *batch* y *fed - batch* [25]

Los autores concluyen que los resultados obtenidos demuestran que el modo *fed - batch* constituye una opción viable para mejorar la producción de enzimas xilanolíticas por fermentación sumergida sin hacer modificaciones significativas a los equipos del proceso, pues permitió incrementar la actividad enzimática en el caldo de fermentación de un valor de alrededor de 2000 U/mL hasta un valor de 2406.175 U/mL.

Por último, en 2015, Gelain *et al.* [5] estudiaron la producción simultánea de enzimas de tipo FPasas, beta - glucosidasas y xilanasas secretadas por *Trichoderma harzianum* P49P11 utilizando bagazo de caña pretratado como sustrato para la fermentación. La investigación tuvo como objetivo la elaboración de un modelo matemático representativo de la cinética de secreción enzimática por parte de estos microorganismos. Para ello, se llevaron a cabo ensayos experimentales en un biorreactor de tanque agitado de 3 L de capacidad volumétrica, a condiciones controladas de velocidad de agitación, concentración de oxígeno disuelto, pH, temperatura y flujo de aire. Posteriormente, se plantearon los modelos matemáticos para describir la cinética de la fermentación y se utilizó el software MATLAB R2013b para llevar a cabo la simulación numérica, el ajuste de los datos a los modelos utilizando un algoritmo de puntos interiores y la subsecuente estimación de las constantes numéricas del modelo.

Antes de iniciar con la formulación de las ecuaciones diferenciales para el modelamiento matemático de la fermentación, los autores proponen el uso de la ecuación de Bergter y Knorre para incluir la baja producción de enzimas al inicio de la fermentación, la cual se muestra en la ecuación (16):

$$f(t) = (1 - e^{-\frac{t}{T_L}}) \quad (16)$$

Donde  $t$  representa el tiempo y  $T_L$  representa una constante de tiempo para la fase inicial de la fermentación.

La tasa de crecimiento de los microorganismos fue considerada como dependiente de la tasa de crecimiento específica y proporcional a la concentración celular, tal como se

muestra en la ecuación (17). Asimismo, para describir la tasa de crecimiento específica, se empleó una variante de la ecuación de Monod (ecuación 18) con la finalidad de incluir el efecto de la represión celular que se experimenta luego de haberse iniciado la fermentación:

$$\left(\frac{dX}{dt}\right)_c = \mu_m \left(\frac{S}{k_S + S}\right) \left(1 - \frac{X}{X_m}\right)^r X \quad (17)$$

$$\mu_X = \mu_m \left(\frac{S}{k_S + S}\right) \left(1 - \frac{X}{X_m}\right)^r \quad (18)$$

Donde  $\mu_X$  representa la tasa específica de crecimiento celular,  $X$  representa la concentración de células en el medio,  $\mu_m$  representa la tasa máxima específica de crecimiento celular estimada para el modelo,  $k_S$  representa la constante de Monod para el crecimiento celular y  $r$  representa un exponente adimensional para modelar la represión celular.

El mismo criterio de modelamiento se aplicó para determinar la tasa de muerte celular. Las ecuaciones (19) y (20) muestran los modelos empleados:

$$\left(\frac{dX}{dt}\right)_d = f(t) \mu_{md} \left(\frac{S}{k_{Sd} + S}\right) X \quad (19)$$

$$\mu_{Xd} = \mu_{md} \left(\frac{S}{k_S + S}\right) \quad (20)$$

Donde  $\mu_{Xd}$  representa la tasa específica de muerte celular,  $\mu_{md}$  representa la tasa máxima específica de muerte celular estimada para el modelo y  $k_{Sd}$  representa la constante de Monod para la tasa de muerte celular.

Al conocer las tasas de crecimiento y muerte celular, se puede calcular la tasa neta de crecimiento celular. La ecuación (21) muestra el modelo empleado:

$$\frac{dX}{dt} = \left(\frac{dX}{dt}\right)_c - \left(\frac{dX}{dt}\right)_d = X(\mu_X - \mu_{Xd}) \quad (21)$$

Donde  $\mu_x$  representa la tasa específica de crecimiento celular y  $\mu_{xd}$  representa la tasa específica de muerte celular.

Para modelar la producción de enzimas xilanolíticas, se consideraron dos términos de represión y uno de inducción, y se consideró que la producción enzimática no está asociada a la tasa de crecimiento celular. La ecuación (22) muestra el modelo empleado:

$$\frac{dXy}{dt} = f(t) m_{xy} X \left(1 - \frac{Xy}{Xy_m}\right)^p \left(-k_{xyS} \frac{dS}{dt}\right) \left(\frac{1}{1 + \frac{S}{k_{iXy}}}\right) - Xy \cdot k_{xyd} \quad (22)$$

Donde  $Xy$  representa la actividad enzimática de enzimas xilanolíticas en el medio,  $f(t)$  representa la ecuación de Bergter y Knorre,  $m_{xy}$  representa la tasa de producción específica de enzimas xilanolíticas en el medio,  $Xy_m$  representa la máxima actividad de enzimas xilanolíticas,  $k_{xyS}$  representa una constante de proporcionalidad para la producción de enzimas xilanolíticas y  $k_{iXy}$  representa una constante de inhibición para la producción de enzimas xilanolíticas.

Por último, el consumo de sustrato en el medio fue modelado empleando la ecuación (23), que representa una dependencia lineal de la concentración de sustrato existente:

$$\frac{dS}{dt} = f(t) q_s S \quad (23)$$

Donde  $S$  representa la concentración de sustrato en el medio de fermentación y  $q_s$  representa la tasa específica de degradación del sustrato.

Los valores numéricos y las unidades de medición de los parámetros descritos en las ecuaciones (16), (17), (18), (19), (20), (21), (22), y (23) se encuentran incluidos en el Anexo 3. Una vez planteados los modelos matemáticos, estos fueron validados mediante el cálculo de la desviación estándar residual, parámetro que indica la precisión del modelo, así como del coeficiente de correlación porcentual. En todos los casos se obtuvo una desviación

estándar residual de menos del 10%, lo cual se considera aceptable para un proceso biológicos. Los autores concluyen que el modelo puede ser adaptado para la simulación numérica de una configuración de tipo *fed - batch*, ya que este contempla tanto la inhibición por sustrato como la inhibición por producto dentro del modelamiento matemático.

Los resultados obtenidos por Gong *et al.* sugieren que el arreglo *fed - batch* constituye una opción viable para incrementar la actividad enzimática y, por consiguiente, la productividad de la fermentación sumergida. Por otro lado, Gelain *et al.* reportan que las ecuaciones y los parámetros resultantes del modelamiento matemático y posterior validación por datos experimentales admiten efectuar variaciones para simular un arreglo *fed - batch*. Basado en ello, se puede inferir que el modelo matemático elaborado por Gelain *et al.* bajo una configuración *fed - batch* resultaría en una mejora de la productividad en el proceso de fermentación.

### **3.3. Métodos de recuperación de enzimas xilanolíticas**

Luego de haber efectuado la secreción de enzimas, es necesario realizar un proceso de purificación aguas abajo. Por su naturaleza biológica, las enzimas xilanolíticas pueden ser separadas por métodos generales para la recuperación de proteínas tales como la precipitación con sales de amonio, con etanol o por medio de una extracción bifásica acuosa. Si bien luego de estas operaciones unitarias se pueden requerir operaciones adicionales tales como la ultrafiltración, la diálisis o la cromatografía de intercambio iónico en función de la pureza del producto final, el estudio de los métodos de purificación directa resulta de suma importancia porque permite mantener los costos de separación en un nivel bajo. A continuación, se muestra una revisión de los avances recientes reportados en la literatura científica para el uso de la precipitación con etanol, metodología seleccionada para este estudio.



### 3.3.1. Precipitación con etanol

En 2010, Farinas *et al.* [26] publicaron un estudio centrado en la influencia de los parámetros operacionales sobre la precipitación de endoglucanasas y xilanasas producidas por *Aspergillus niger* utilizando salvado de trigo como sustrato para realizar una fermentación en estado sólido. El trabajo realizado por los investigadores buscó determinar la influencia de la concentración de sulfato de amonio y etanol como agentes precipitantes, así como el tiempo de contacto y la temperatura, sobre el porcentaje de recuperación final de la actividad enzimática. Para ello, utilizaron un diseño experimental estadístico basado en un modelo factorial seguido de un análisis RSM. Los resultados revelaron un porcentaje de recuperación total de xilanasas del 25% utilizando etanol a una concentración de 80% en volumen, a 20 °C de temperatura, y utilizando 6 horas de tiempo de contacto.

Mariño *et al.* [6] publicaron en 2015 un estudio realizado acerca de la purificación de glicosil hidrolasas producidas por *Trichoderma harzianum* por fermentación sumergida utilizando etanol como agente de precipitación. La investigación se centró en el estudio de las variables de temperatura, pH y composición del etanol en solución acuosa y el impacto de estas condiciones en la recuperación enzimática final obtenida. Luego de realizar distintos ensayos experimentales, se determinó que la máxima recuperación de xilanasas se obtuvo utilizando una concentración de etanol al 90% en volumen y un pH en el medio de 5. A estas condiciones, se reportó una recuperación enzimática del 98%, y además se determinó que la eficiencia de recuperación está muy débilmente influenciada por la temperatura. Basados en estos resultados, los autores concluyen que la recuperación por precipitación con etanol constituye un excelente método para la recuperación de enzimas xilanolíticas en un caldo de fermentación.

En la misma línea de investigación, Costa *et al.* [27] publicaron en 2018 un estudio sobre la recuperación de xilanasas producidas por *Aspergillus niger* tanto por fermentación sumergida como por fermentación en estado sólido. Los investigadores utilizaron una metodología de diseño factorial completo seguido por un análisis RSM para estudiar la influencia de la variación concentración del etanol y el pH del medio por separado y en

simultáneo. Tras la conclusión del análisis de los datos obtenidos, se reportó un efecto significativo del pH en la recuperación enzimática de las xilanasas obtenidas por ambos tipos de fermentación, y se reportó además una máxima recuperación a condiciones de pH en el medio de 5.5. Por otro lado, se reportó que la concentración del etanol (78% - 92% en volumen) no tuvo un efecto significativo en la recuperación enzimática resultante de las xilanasas producidas por fermentación en estado sólido, mientras que para las xilanasas producidas por fermentación sumergida, el efecto fue más pronunciado. Además, se reporta que un tiempo de 15 minutos fue suficiente para lograr la precipitación de las xilanasas utilizando etanol al 85% en volumen, obteniendo recuperaciones enzimáticas de 65% y de 79% para los casos de fermentación en estado sólido y fermentación sumergida. Los factores de purificación asociados a estos casos fueron de 0.74 y 1.03, respectivamente.

La Tabla 3.2 resume los resultados reportados por cada una de las investigaciones descritas líneas arriba.

Método de recuperación directa	Microorganismo secretor	Actividad enzimática recuperada (%)	Referencia
Precipitación con etanol	<i>Aspergillus niger</i>	25.00	[26]
	<i>Trichoderma harzianum</i>	98.00	[6]
	<i>Aspergillus niger</i>	79.00	[27]

**Tabla 3. 2.** Porcentajes de recuperación de actividades enzimáticas reportados en la literatura utilizando distintos métodos de recuperación directa

Al analizar y comparar los resultados, es posible verificar que la metodología de recuperación por precipitación con etanol reportada por Mariño *et al.* [6] constituye una excelente alternativa para la recuperación de la actividad enzimática en una sola etapa. Además, los parámetros reportados son transferibles a los resultados obtenidos por Gelain *et*

al. [5], pues ambas investigaciones se basan en el uso de *Trichoderma harzianum* como microorganismo secretor de enzimas por fermentación sumergida, y utilizan como sustrato e inductor al bagazo de caña de azúcar sometido a una misma metodología de pretratamiento.

### **3.4. Simulación de procesos de producción de enzimas**

La simulación de procesos es una herramienta muy útil a la hora de realizar evaluaciones de nuevos procesos de interés comercial ya que permite obtener información acerca de la viabilidad técnica y económica de una propuesta de diseño sin recurrir a la realización de ensayos experimentales a gran escala. Para el caso de los procesos biológicos, cuya operación es usualmente realizada por lotes, existen softwares comerciales tales como Aspen Batch Plus o SuperPro Designer, los cuales permiten realizar el diseño del proceso, el secuenciamiento de tareas de los equipos que operan de manera discontinua y la evaluación económica del proceso resultante. A continuación, se reportan investigaciones recientes sobre el estudio de la producción de enzimas xilanolíticas utilizando simulación de procesos.

En 2016, Valtavirta [28] presentó una tesis basada en el uso de un simulador comercial de procesos por lotes para efectuar el diseño conceptual de un proceso de producción industrial de enzimas xilanolíticas. El autor empleó los softwares SuperPro Designer 9.5 y SchedulePro 7.0 para simular y realizar el secuenciamiento de tareas de la producción de enzimas por parte de *Trichoderma reesei* empleando resultados reportados en la literatura y bajo ciertas asunciones. El diagrama de flujo de proceso simulado se encuentra en el Anexo 4, en donde se muestra de manera gráfica la secuencia de operaciones unitarias empleadas para el diseño propuesto. El proceso se inicia con el cultivo de *Trichoderma reesei* asumiendo una concentración de células de 1 g/L en fermentadores de siembra de 1 y 10 metros cúbicos de volumen operativo, los cuales son alimentados con glucosa pura como sustrato, hasta lograr el crecimiento de los hongos filamentosos. Posteriormente, el inóculo es ingresado a un fermentador principal, con un volumen operativo de 100 metros cúbicos, para llevar a cabo la secreción de enzimas. El fermentador es alimentado en modo *fed - batch* con una solución de lactosa pura previamente esterilizada como sustrato. Se utiliza amoníaco

como fuente de nitrógeno para alimentar tanto al fermentador principal como al tren de fermentadores de siembra, y la fermentación se lleva a cabo a un pH de 7 para el fermentador principal, y a un pH de 4 para los fermentadores de siembra, con una tasa de suministro de aire de 0.5 vvm para el fermentador principal, y de 1 y 0.7 vvm para los fermentadores de 1 y 10 metros cúbicos de capacidad, respectivamente. Al término de la fermentación, que se produce luego de 144 horas, el caldo rico en enzimas es transferido a un tanque pulmón de 100 metros cúbicos de capacidad. Luego de esto, se inicia el procesamiento aguas abajo con un proceso de filtrado por presión, que tiene como objetivo efectuar la separación de la biomasa. El permeado es alimentado a un tanque de concentración, cuya operación también es por lotes. Al término de la operación de concentración, el producto está listo para ser formulado en un tanque de mezcla, en donde se agregan excipientes con el propósito de preservar el *cocktail* enzimático. Finalmente, se produce el envasado en contenedores de 1 metro cúbico de capacidad. El proceso fue simulado considerando el uso de equipos de esterilización y filtración del aire alimentado a los fermentadores, así como el uso de tanques de preparación del medio de cultivo del tren de fermentadores de siembra, y de la alimentación para el fermentador principal. El tiempo total de producción estimado para un lote de *cocktail* enzimático, considerando un tiempo de siembra de 28 horas para los fermentadores semilla de 1 y 10 metros cúbicos de capacidad, fue de 297 horas para producir 28301.11 kg de *cocktail* enzimático rico en xilanasas. Como corolario final, el autor concluye que el reporte económico calculado por el simulador no fue consistente con los precios de compra de los equipos tras efectuar un análisis comparativo simple, por lo que decidió omitir la publicación de estos resultados y hacer esta aseveración en su lugar.

Por otro lado, en 2020, bajo un enfoque de producción multienzimática en simultáneo, Papadaki *et al.* [29] simularon un proceso de producción industrial de distintas enzimas hidrolíticas acoplada a la operación de una biorrefinería dedicada a la producción de ácido cítrico, de manera que fuera posible utilizar las células recuperadas de *Aspergillus niger* provenientes de la fermentación cítrica principal para realizar una operación adicional de fermentación en estado sólido sobre una mezcla de sustratos con el objetivo de inducir la secreción de estas enzimas. Para ello, en primer lugar, se realizó un total de 20 pruebas

experimentales a nivel de laboratorio sobre mezclas compuestas por salvado de trigo, hollejos de uva roja sin tratar y remanentes sólidos de hollejos de uva blanca para evaluar la máxima producción de endoglucanasa, PGasa, amilasa, xilanasas y ácido proteasa en simultáneo por parte de *Aspergillus niger*, para luego aplicar un análisis de regresión multifactorial híbrido de orden cúbico con el fin de determinar una composición óptima de sustrato con el objetivo de maximizar la producción de estas enzimas. La composición óptima en peso determinada tras este análisis fue de 70% de salvado de trigo, 15% de remanentes sólidos de hollejos de uva blanca y 15% de hollejos de uva negra.

Posteriormente, se procedió a simular el proceso de producción de las enzimas descritas utilizando SuperPro Designer 9.0. El diagrama de flujo de proceso diseñado se adjunta en el Anexo 5. Este muestra los equipos necesarios para montar un proceso de producción de enzimas hidrolíticas de manera acoplada a la producción de ácido cítrico utilizando la mezcla óptima de sustrato determinada previamente. La primera parte del proceso consiste en la preparación de la mezcla óptima de sustrato sólido en el tanque de mezclado V - 104 a partir de distintas alimentaciones de salvado de trigo, hollejos de uva roja y sólidos de hollejo de uva blanca. Luego de haber logrado la composición óptima requerida, se pasa la mezcla a través de una unidad de esterilización ST - 102 para garantizar condiciones asépticas antes de iniciar la fermentación. El proceso de fermentación en estado sólido se da en un biorreactor de bandejas SFR - 101, donde se alimenta el lodo rico en células de *Aspergillus niger* provenientes de la fermentación cítrica, la mezcla optimizada de sustrato y un flujo de aire en cantidades requeridas. Concluida la fermentación, el proceso de separación se inicia al mezclar los sólidos ricos en el *cocktail* enzimático con una solución buffer de citrato de sodio en el tanque de mezcla V - 105 para efectuar una extracción sólido - líquido. Posteriormente, se pasa el lodo resultante por un hidrociclón CY - 101 para separar el extracto crudo de enzimas de las partículas de sustrato sólido remanente y de la biomasa celular generada. Luego, se adiciona n - propanol y glutaraldehído a la suspensión para favorecer la formación de aglomeraciones de enzimas y el entrecruzamiento de estas, respectivamente, y se realiza una operación de mezclado en el tanque V - 106, tras lo cual se centrifuga la suspensión resultante en la unidad V - 107. Finalmente, se realiza una operación

de lavado con agua desionizada por triplicado en la unidad WSH - 101, y se realiza un último procedimiento de ultrafiltrado en el filtro UF - 101 para recuperar los agregados enzimáticos entrecruzados. Las actividades máximas alcanzadas de CMCasa, PGasa y xilanasas durante la etapa de fermentación fueron de 668 U/g, 3151 U/g y 1099 U/g (g hace referencia a gramos de biomasa seca producida). La recuperación final de CMCasa, PGasa y xilanasas registrada utilizando este procedimiento fue del 75%, mientras que la recuperación de amilasa y ácido proteasa fue del 40%.

Tras efectuar un análisis técnico - económico basado en una capacidad de procesamiento de 300 toneladas por año de hollejos de uva blancas, 45 toneladas por año de hollejos de uvas rojas y 210 toneladas por año de salvado de trigo para el proceso acoplado de producción de ácido cítrico y las enzimas descritas en simultáneo, se obtuvieron ganancias anuales netas de 42 730 €/año y 7 468 220 €/año por la comercialización de ácido cítrico y las enzimas hidrolíticas producidas, respectivamente, asumiendo un precio de mercado 0.85 €/kg para el ácido cítrico, y un precio promedio de 50 €/1000 IU para cada enzima producida. Los valores de ganancias obtenidos se traducen en un margen de ganancia bruta del 24.85%, una tasa de retorno en inversiones del 17.12% y un tiempo estimado de retorno de la inversión de 5.84 años, lo cual indica que la producción acoplada de enzimas hidrolíticas y ácido cítrico es factible y rentable, y que, además, es la producción de estas enzimas el factor que más contribuye a la rentabilidad del proyecto analizado.

La revisión bibliográfica efectuada permite concluir que los avances actuales en la producción de enzimas xilanolíticas están orientados a la reducción en los costos de producción. Es posible clasificar los estudios encontrados en metodologías experimentales que exploran el uso de materiales lignocelulósicos con poder inductor y nuevos microorganismos con mayor productividad de enzimas, y en estrategias de procesamiento como el empleo de alimentaciones discontinuas de sustrato y el uso de operaciones unitarias para la concentración de proteínas en un solo paso.

# CAPÍTULO IV

## METODOLOGÍA

### 4.1. Establecimiento de la base de diseño

El proceso bajo estudio parte de la premisa de una operación acoplada a una planta típica de producción de etanol de primera (1G) y segunda generación (2G) ubicada en la costa de Brasil, país con un mercado referente a nivel mundial en materia de producción de etanol. Según Longati *et al.* [3], una planta de estas características posee una capacidad de procesamiento de 833 toneladas de caña de azúcar por hora. Por otro lado, de acuerdo con Ferreira *et al.* [8] es posible considerar que cada tonelada de caña de azúcar contiene un 26% en peso de bagazo procesable para fines de cogeneración o de producción de etanol 2G, lo que da una producción total de 216.58 toneladas de bagazo de caña de azúcar por hora. Para garantizar que la producción interna de energía eléctrica logre cubrir la demanda energética operativa de la planta, Longati *et al.* [3] sostienen que el 62% de la producción de bagazo debe ser alimentado al proceso de producción de etanol de segunda generación, y el 38% restante debe ser empleado para fines de cogeneración en conjunto con paja de caña de azúcar, un recurso barato y de fácil acceso en el entorno en que operan las plantas de procesamiento de caña de azúcar en Brasil.

A fin de salvaguardar el balance energético establecido en el caso descrito por Longati *et al.* [3], se asumió una capacidad de procesamiento por lote igual al 0.91% del total de bagazo de caña de azúcar producido durante una hora que se destina al proceso de cogeneración, lo que da un requerimiento de 0.749 toneladas de bagazo crudo (o 0.622 toneladas de bagazo pretratado por explosión de vapor que son procesadas al interior de las instalaciones de la sección de producción de etanol 2G) por cada lote de enzimas procesado.

#### 4.2. Asunciones principales del diseño

Se declaran a continuación las asunciones bajo las cuales el diseño es válido:

- Se asume una actividad enzimática específica de 29197.78 U/g de enzimas en base a los resultados de actividad y concentración de proteínas reportados por Gelain *et al.* [5] y Mariño *et al.* [6].
- La actividad enzimática objetivo de xilanasas en el producto final es de 485.67 U/mL, de acuerdo con la información reportada por Paye *et al.* [30].
- Las actividades enzimáticas recuperadas de FPasas y beta - glucosidasas obtenidas durante la fermentación sumergida son reportadas en el *cocktail* enzimático final obtenido, pero son consideradas como accesorias para el alcance de este estudio.
- El proceso opera de forma acoplada a la planta principal de producción de etanol 1G + 2G, y la operación unitaria de pretratamiento por explosión de vapor toma lugar en las instalaciones de procesamiento del etanol 2G antes de desviar el bagazo de caña de azúcar a la producción de enzimas.
- El costo de oportunidad del uso de bagazo de caña de azúcar como materia prima para el proceso bajo estudio es igual a 0 dada la abundancia de este residuo en una biorrefinería.
- El costo de oportunidad del uso del terreno para el montaje de las instalaciones del proceso bajo estudio se asume igual a 0 dadas las grandes extensiones de tierra disponibles en una biorrefinería [3].

#### 4.3. Simulación de la cinética de producción enzimática

Tal como se establece en la Sección 3.2, se optó por el uso del modelo matemático desarrollado por Gelain *et al.* [5] para evaluar la cinética de producción enzimática de



*Trichoderma harzianum* P49P11 y el diseño de la sección de fermentación. La validez del modelo es exclusiva para una temperatura de operación de 29 °C, un pH de 5, un porcentaje de oxígeno disuelto en el medio de 30% en masa - volumen, un medio de cultivo suplementado por 1 g/L de peptona, 1 mL/L de Tween 80 y 50 mL/L de solución salina concentrada de Mandels y el uso de pulpa de celulosa producida por la metodología inicialmente desarrollada por Rocha *et al.* [31] como fuente de carbono para el metabolismo celular, de acuerdo con lo establecido por los autores.

La simulación del modelo matemático elaborado por Gelain *et al.* [5] se realizó utilizando el software MATLAB R2020a. Un ejemplo del código utilizado para la resolución del modelo matemático y la generación de la data numérica se puede encontrar en el Anexo 6. Las ecuaciones cinéticas de consumo de sustrato, crecimiento celular y secreción de la actividad enzimática de xilanasas fueron simuladas asumiendo una concentración inicial de células de 1 g/L, actividades enzimáticas iniciales iguales a 0 U/L y un tiempo de fermentación no menor a 100 horas en todos los casos. En primer lugar, se procedió a validar la información establecida por los autores para un escenario de operación por lotes, lo que además permitió seleccionar un valor objetivo de máxima actividad enzimática a alcanzar. Posteriormente, se evaluaron dos esquemas de operación por lotes alimentados para reducir el efecto de inhibición por sustrato en la fermentación y disminuir el requerimiento de pulpa de celulosa en el proceso. Finalmente, se comparó el desempeño de los tres escenarios evaluados, y se optó por seleccionar el más adecuado para el diseño del proceso.

#### **4.4. Diseño de la sección de pretratamiento de materia prima**

##### **4.4.1. Dimensionamiento del tanque de almacenamiento de sólidos de bagazo**

Los parámetros de diseño inherentes a los ciclos de lavado previos y posteriores al proceso de hidrólisis alcalina fueron determinados utilizando la metodología desarrollada por Rocha *et al.* [32], en donde se establecen las cantidades de agua de lavado por ciclo en base a una proporción de 10 veces la masa de bagazo de caña de azúcar que ingresa al proceso.

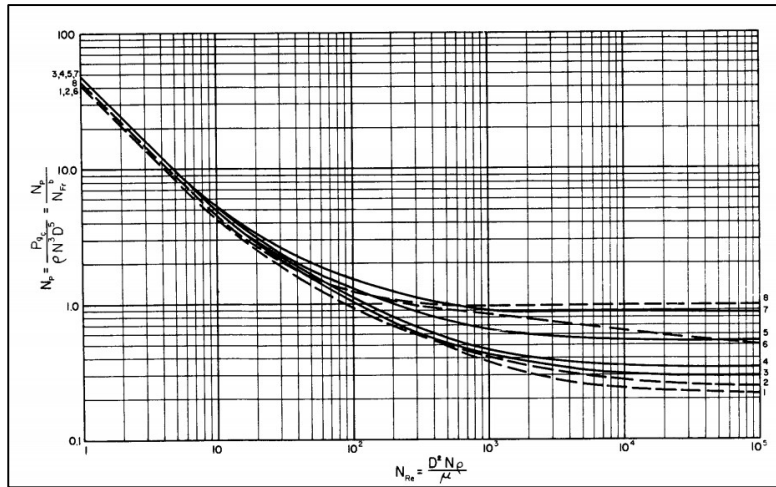
El tanque de residencia en donde se almacenan temporalmente los sólidos de bagazo de caña de azúcar antes de ser lavados por centrifugación fue dimensionado asumiendo una geometría cilíndrica con una relación de altura – diámetro de 3:1, y que el equipo opera a un 75% de su capacidad volumétrica por motivos de seguridad, tal como establecen Towler y Sinnott [33].

#### **4.4.2. Dimensionamiento del tanque de hidrólisis alcalina**

Las dimensiones del tanque de hidrólisis alcalina se determinaron en base a la relación experimental de 1:10 determinada por Rocha *et al.* [31] entre la masa total de bagazo de caña de azúcar pretratado por explosión de vapor y el volumen de solución de hidróxido de sodio al 1% en masa – volumen a 100 °C. Para efectuar el escalamiento, se asume al equipo como un tanque cilíndrico de proporciones estándar con una relación de altura – diámetro de 3:1 que opera a un 75% de su capacidad volumétrica por motivos de seguridad, tal como establecen Towler y Sinnott [33].

#### **4.4.3. Estimación de la potencia de agitación en el tanque de hidrólisis alcalina**

De acuerdo con Cardoso *et al.* [34], el licor de lignina proveniente del tratamiento alcalino de fuentes de biomasa vegetal se comporta como un fluido newtoniano a temperaturas mayores a 40 °C. En base a esta premisa, los cálculos de potencia de agitación se realizaron empleando la correlación de Rushton *et al.* [35] mostrada en la Figura 4.1 (denotada por el número 4), que relaciona el número de Reynolds con el número de potencia para fluidos newtonianos en tanques agitados equipados con 3 deflectores.



**Figura 4. 1.** Correlación de Rushton *et al.* para el cálculo del número de potencia en función del número de Reynolds en fluidos newtonianos [35]

El cálculo del número de Reynolds se realizó utilizando los datos de viscosidad determinados por Lei *et al.* [36] y asumiendo una relación de 3:1 entre el diámetro del fermentador y el diámetro del impulsor, como sugiere Uhl [35] para tanques de proporciones estándar. Asimismo, la densidad del fluido se asumió igual a la de una solución de hidróxido de sodio al 1% en masa – volumen a 100 °C [37], temperatura a la que ocurre el proceso de fermentación sumergida, y se consideró una velocidad de agitación de 700 RPM para asegurar la operación en régimen turbulento. La ecuación (24) describe el procedimiento seguido para el cálculo del número adimensional:

$$N_{Re} = \frac{D^2 N \rho}{\mu} \quad (24)$$

Donde  $D$  representa el diámetro del impulsor,  $N$  representa la velocidad angular del impulsor,  $\rho$  representa la densidad del fluido contenido en el tanque,  $\mu$  representa la viscosidad del fluido contenido en el tanque y  $N_{Re}$  representa el número de Reynolds alcanzado en el interior del tanque.

Luego de conocer el número de Reynolds, se calculó el número de potencia gráficamente utilizando la Figura 4.1, y se despejó el consumo de potencia para cada

fermentador. Finalmente, el consumo de energía se calculó al relacionar la potencia de agitación con los tiempos de operación determinados por Rocha *et al.* [31]. La ecuación (25) describe el procedimiento seguido para el cálculo de la potencia de agitación en función del número de potencia:

$$N_p = \frac{P}{\rho N^3 D^5} \quad (25)$$

Donde  $P$  representa la potencia suministrada al impulsor,  $\rho$  representa la densidad del fluido contenido en el tanque,  $N$  representa la velocidad angular del impulsor,  $D$  representa el diámetro del impulsor y  $N_p$  representa el número de potencia alcanzado en el interior del tanque.

#### 4.4.4. Estimación de la masa de aceite térmico para el proceso de hidrólisis alcalina

La cantidad de aceite térmico para el calentamiento de la solución alcalina de 25 °C a 100 °C fue determinada utilizando la correlación desarrollada por Bowman, Mueller y Nagle para el calentamiento de tanques agitados enchaquetados y/o equipados con serpentines de calentamiento que describen Perry *et al.* [37]. La ecuación (26) muestra la correlación descrita:

$$\theta = \frac{\ln\left(\frac{T - t_1}{T - t_2}\right)}{\left(\frac{WC}{Mc}\right)\left(\frac{e^{\frac{UA}{WC}} - 1}{e^{\frac{UA}{Mc}}}\right)} \quad (26)$$

Donde  $T$  representa la temperatura de ingreso del aceite térmico,  $t_1$  representa la temperatura de la solución alcalina al inicio de la operación de calentamiento,  $t_2$  representa la temperatura de la solución alcalina al término de la operación de calentamiento,  $W$  representa el flujo de ingreso del fluido de calentamiento,  $C$  representa el calor específico del fluido de calentamiento,  $M$  representa la masa de caldo de fermentación contenida en el fermentador,  $c$  representa el calor específico de la solución alcalina,  $U$  representa el

coeficiente global típico de transferencia de calor para el equipo utilizado,  $A$  representa el área de transferencia de calor y  $\theta$  representa el tiempo de duración de la operación. El fluido refrigerante considerado para esta operación fue el aceite térmico Duratherm HF a 200 °C. Por otro lado, el coeficiente global de transferencia de calor típico para operaciones de enfriamiento por lotes fue asumido igual a  $400 \text{ W/m}^2 \cdot ^\circ\text{C}$  tal como sugieren Perry *et al.* [37] para operaciones de este tipo. Los datos de calores específicos de los fluidos fueron extraídos de Perry *et al.* [37] y Duratherm [38].

#### **4.5. Diseño de la sección de fermentación sumergida**

##### **4.5.1. Consideraciones para el fermentador principal**

El diseño del fermentador principal se realizó en base al esquema de alimentación óptimo determinado tras ejecutar el procedimiento descrito en la Sección 4.3 y desarrollado en la Sección 5.3. Para ello, se consideró una concentración total de pulpa de celulosa en base seca de 10 g/L que se suministra de manera discontinua en 2 alimentaciones sucesivas de 5 g/L al inicio de la fermentación y al cabo de 32 horas de iniciada la fermentación, respectivamente. Bajo el esquema de alimentación seleccionado, se contempla un tiempo de operación de 80.8 horas para cada fermentador del proceso.

##### **4.5.2. Consideraciones para el diseño del tren de siembra**

Para el diseño de los fermentadores de siembra, se procedió a simular el modelo matemático desarrollado por Gelain *et al.* [5] en modo *batch* utilizando 5.5 g/L de células y 40 g/L de pulpa de celulosa en base seca como parámetros iniciales de simulación, los cuales permitieron obtener una concentración de 20 g/L de células luego de 17.6 horas. Posteriormente, el número de fermentadores de siembra y sus respectivos volúmenes operativos fueron determinados en base a un análisis de diluciones sucesivas considerando la concentración de células al inicio y fin de cada proceso de fermentación de siembra y la

concentración de células al inicio de la fermentación principal según establecen Seader *et al.* [39].

#### 4.5.3. Dimensionamiento de los fermentadores de siembra y principal

El dimensionamiento de los fermentadores de la sección se llevó a cabo considerando a cada fermentador como un tanque cilíndrico con una relación altura – diámetro de 3:1, y que además estos operan a un 75% de su capacidad volumétrica por motivos de seguridad, tal como establecen Towler y Sinnott [33].

#### 4.5.4. Estimación de la generación de calor durante la fermentación principal

El calor generado por la acción de secreción enzimática a largo del proceso de fermentación principal se estimó realizando un balance de energía en estado transitorio y asumiendo que el fermentador principal se comporta como un sistema aislado. Para la estimación de la generación de energía, se aproximó el comportamiento de la masa total de enzimas secretadas durante la fermentación al de las celulasas, y se emplearon los datos de entalpía de formación de celulasas reportados por Rajoka [40] y de masa molecular promedio de celulasas reportados por Worthington Biochemical Corporation [41] para determinar el cambio de energía en el sistema. La ecuación (27) describe el balance de energía planteado:

$$\Delta E = E_G = \frac{(\Delta H_{enzimas})(m_{enzimas})}{\bar{M}_{enzimas}} \quad (27)$$

Donde  $\Delta E$  representa el cambio o acumulación de energía en el sistema,  $E_G$  representa la energía generada al interior del sistema,  $\Delta H_{enzimas}$  representa la entalpía de formación de enzimas (asumidas como celulasas),  $m_{enzimas}$  representa la masa generada de enzimas durante la fermentación principal y  $\bar{M}_{enzimas}$  representa la masa molecular promedio de estas enzimas (asumidas como celulasas).

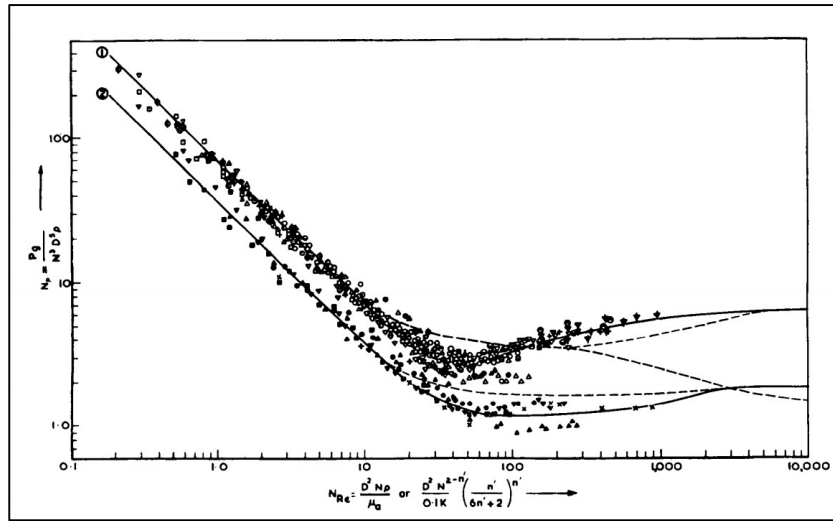
Luego, para conocer el cambio de temperatura asociado, se relacionó el cambio de energía en el sistema con la masa de caldo de fermentación contenida en el fermentador. La ecuación (28) denota la expresión matemática utilizada:

$$\Delta E = m_{caldo} C_{p_{caldo}} \Delta T_{caldo} \quad (28)$$

Donde  $m_{caldo}$  representa la masa de caldo de fermentación contenida en el tanque,  $C_{p_{caldo}}$  representa el calor específico del caldo de fermentación (asumido igual al del agua a 29 °C), y  $\Delta T_{caldo}$  representa el cambio de temperatura en el sistema.

#### **4.5.5. Estimación de la potencia de agitación en los fermentadores**

De acuerdo con Shuler y Kargi [42], los caldos de fermentación producidos por hongos filamentosos tales como las especies correspondientes al género *Trichoderma* se comportan como fluidos pseudoplásticos. En base a esta premisa, los cálculos de potencia de agitación se realizaron empleando la correlación de Calderbank y Moo – Young [35] mostrada en la Figura 4.2 (denotada por el número 1), que relaciona el número de Reynolds con el número de potencia para fluidos no newtonianos de comportamiento pseudoplástico en tanques agitados sin deflectores.



**Figura 4. 2.** Correlación de Calderbank y Moo – Young para el cálculo del número de potencia en función del número de Reynolds en fluidos pseudoplásticos [35]

El cálculo del número de Reynolds se realizó según la ecuación (24) utilizando los datos de viscosidad de caldos de fermentación determinados por Cunha *et al.* [43] y asumiendo una relación de 1:3 entre el diámetro del impulsor y el diámetro del fermentador. Asimismo, la densidad del fluido se asumió como igual a la del agua a 29 °C, temperatura a la que ocurre el proceso de fermentación sumergida, y se consideró una velocidad de agitación de 300 RPM, velocidad empleada originalmente por Gelain *et al.* [5] y validada por Shuler y Kargi [42] para procesos de homogeneización de caldos de fermentación a escala industrial.

Luego de conocer el número de Reynolds, se calculó el número de potencia gráficamente utilizando la Figura 4.2, y se despejó el consumo de potencia para cada fermentador utilizando la ecuación (25). Finalmente, el consumo de energía se calculó al relacionar la potencia de agitación con los tiempos de operación determinados a partir de la simulación de la cinética de fermentación.



#### 4.5.6. Cálculo del tiempo de enfriamiento posterior a la fermentación

Para calcular el tiempo requerido para llevar el contenido del caldo de fermentación de 29 °C a 25 °C se utilizó la correlación de Bowman, Mueller y Nagle [37] para el enfriamiento de tanques agitados enchaquetados. La ecuación (29) denota la expresión matemática utilizada:

$$\theta = \frac{\ln\left(\frac{T_{in} - t}{T_{out} - t}\right)}{\left(\frac{wc}{MC}\right)\left(\frac{e^{\frac{UA}{wc}} - 1}{e^{\frac{UA}{wc}}}\right)} \quad (29)$$

Donde  $T_{in}$  representa la temperatura del caldo de fermentación al inicio de la operación,  $T_{out}$  representa la temperatura del caldo de fermentación al término de la operación,  $t$  representa la temperatura de ingreso del fluido de refrigeración al serpentín,  $w$  representa el flujo de ingreso del fluido refrigerante,  $c$  representa el calor específico del fluido refrigerante,  $M$  representa la masa de caldo de fermentación contenida en el fermentador,  $C$  representa el calor específico del caldo de fermentación,  $U$  representa el coeficiente global típico de transferencia de calor para el equipo utilizado,  $A$  representa el área de transferencia de calor y  $\theta$  representa el tiempo de duración de la operación. El fluido refrigerante considerado para esta operación fue agua de proceso a 5 °C. Por otro lado, el coeficiente de transferencia de calor típico considerado para este proceso fue de 250 W/m<sup>2</sup>.°C tal como sugieren Perry *et al.* [37] para operaciones de este tipo. Los parámetros de área de transferencia de calor y los calores específicos de los fluidos fueron extraídos de Perry *et al.* [37].

#### 4.5.7. Estimación del consumo de vapor con fines de desinfección

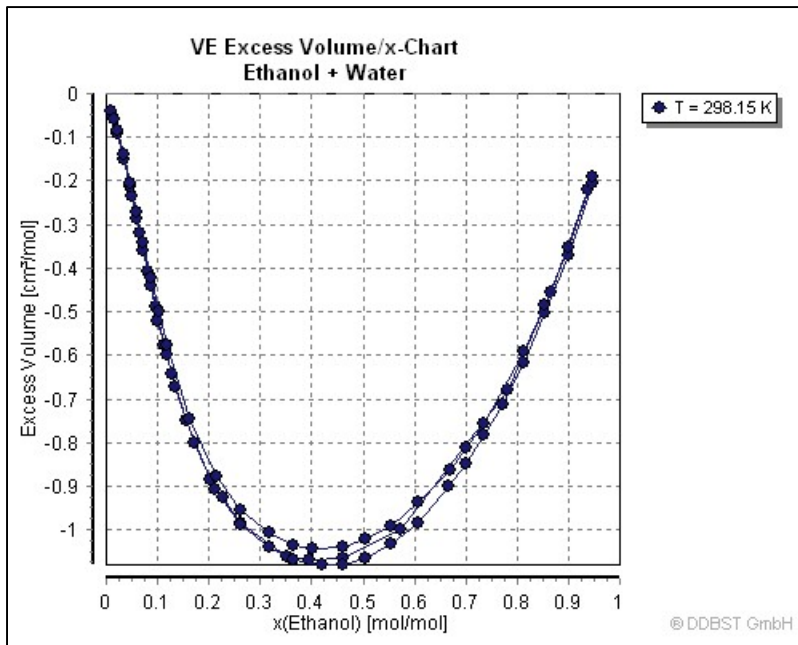
Se consideró el uso de vapor saturado a 130 °C durante 20 minutos como agente de esterilización antes del inicio de la operación de cada tanque de fermentación para prevenir el crecimiento de patógenos no deseados durante los procesos de fermentación, como

establecen Shuler y Kargi [42]. La masa de vapor saturado requerida para la desinfección de cada fermentador de siembra se determinó relacionando el volumen de diseño de cada fermentador con los datos de propiedades de vapor saturado a 130 °C reportados por Perry *et al.* [37].

#### **4.6. Diseño de la sección de recuperación de enzimas**

##### **4.6.1. Dimensionamiento de los tanques de precipitación con etanol**

El diseño propuesto considera el empleo de 4 tanques de precipitación con etanol. Para el dimensionamiento de los tanques, se consideró una alimentación de caldo de fermentación clarificado y etanol anhidro en una proporción de 1:9 en volumen según lo establecido por Mariño *et al.* [6]. Para determinar el volumen operativo de cada tanque luego del mezclado de ambos fluidos, se aproximó el comportamiento de la mezcla al de una solución de agua en etanol y se utilizaron las propiedades en exceso reportadas por Dortmund Data Bank [44] para estimar el volumen molar real de una solución de etanol al 90% en volumen bajo los procedimientos descritos por Smith *et al.* [45] para el cálculo de las propiedades reales de una solución en función de las propiedades en exceso y de las propiedades de las sustancias puras. La Figura 4.3 muestra los datos de volumen molar en exceso empleados.



**Figura 4. 3.** Datos de volumen residual en función de la fracción molar de etanol para el sistema agua – etanol a 298.15 K y 1 atm [44]

Asimismo, la ecuación (30) denota la expresión matemática utilizada:

$$V'^E = V' - \sum (f)(V'^{id}) \quad (30)$$

Donde  $V'^E$  representa el volumen molar en exceso de la solución a las condiciones termodinámicas dadas,  $V'$  representa el volumen molar de la solución a las condiciones termodinámicas dadas,  $f$  representa la fracción molar de cada componente en solución y  $V'^{id}$  representa el volumen molar de cada componente puro a las condiciones termodinámicas dadas. El volumen molar real de la solución se relacionó luego con el número de moles totales contenidas en el interior del tanque para conocer el volumen real de la solución. Por último, el volumen de diseño y las dimensiones de cada equipo se determinaron asumiendo una relación de 2:1 entre la altura y el diámetro del tanque, una geometría cilíndrica y que cada tanque opera a un 75% de su capacidad por motivos de seguridad, tal como sugieren Towler y Sinnott [33].

#### 4.6.2. Estimación de la potencia de agitación requerida para cada tanque

La potencia de agitación requerida para cada tanque fue estimada utilizando la correlación establecida entre el número de potencia y el número de Reynolds para fluidos newtonianos descrita por Uhl [35] que se muestra en la Figura 4.1 (denotada por el número 4). Para el cálculo del número de Reynolds, se utilizó una velocidad de 150 RPM y una relación de 1:3 entre el diámetro del impulsor y el diámetro del tanque sugerida por Towler y Sinnott [33], mientras que las propiedades de transporte de la solución fueron extraídas de los resultados experimentales publicados por Khattab *et al.* [46] aproximando el comportamiento de la mezcla al de una solución binaria agua – etanol. El número de potencia estimado gráficamente fue luego despejado para calcular la potencia de agitación requerida en cada tanque.

#### 4.6.3. Determinación del tiempo de agitación requerido para cada tanque

El tiempo de agitación requerido para alcanzar la homogeneidad del contenido de cada tanque se determinó utilizando la correlación de Van de Vusse [35]. La ecuación (31) muestra la expresión matemática empleada.

$$t = \left( \frac{V}{N D^2 p} \right) \left[ \frac{9}{\left( \frac{\rho D^2 N^2}{g Z \Delta \rho} \right)^{0.25}} \right] \quad (31)$$

Donde  $V$  representa el volumen de solución hidroalcohólica agitado,  $N$  representa la velocidad angular del impulsor,  $D$  representa el diámetro del impulsor,  $p$  representa la longitud del *pitch* del impulsor (asumida como igual al diámetro del impulsor),  $\rho$  representa la densidad de la solución hidroalcohólica contenida en el tanque,  $g$  representa la aceleración de la gravedad,  $\Delta\rho$  representa la diferencia entre las densidades de las sustancias puras a mezclar (en este caso, etanol anhidro y caldo de fermentación clarificado),  $Z$  representa la altura de líquido en el tanque y  $t$  representa el tiempo de mezclado requerido para alcanzar la homogeneidad en el interior del tanque.

#### 4.6.4. Determinación de la temperatura de suministro del etanol anhidro

La cantidad de energía térmica producida por la hidratación del etanol se determinó a partir de los datos de entalpía molar de hidratación provistos por Boyne y Williamson [47], que se muestran en la Figura 4.4.

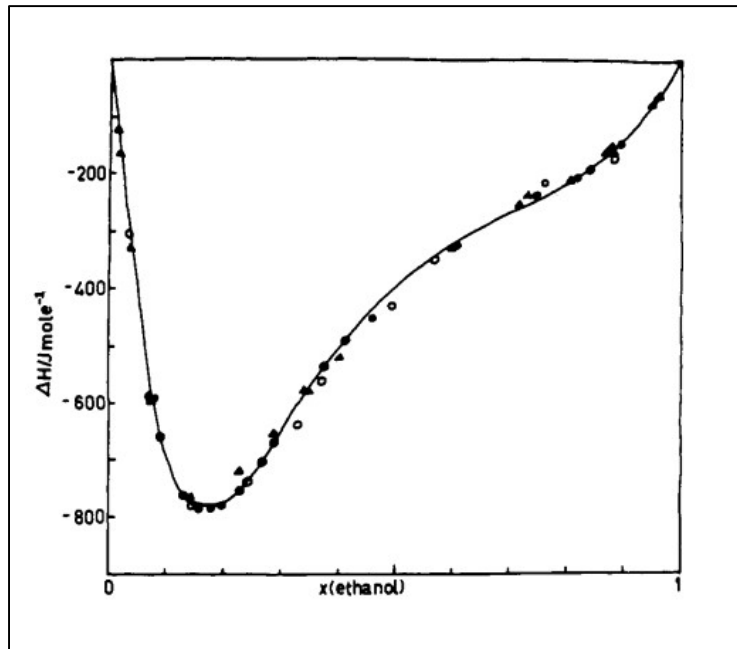


Figura 4. 4. Datos de entalpía de entalpía molar de hidratación en función de la fracción molar de etanol para el sistema agua – etanol a 298.15 K y 1 atm [47]

El valor de entalpía molar de hidratación se correlacionó luego con la cantidad de moles de etanol presentes en cada tanque. La ecuación (32) muestra la expresión matemática empleada.

$$\Delta E = E_G = (\Delta H_{Etanol})(n_{Etanol}) \quad (32)$$

Donde  $\Delta E$  representa el cambio o acumulación de energía al interior de cada tanque,  $E_G$  representa la energía generada al interior del tanque,  $\Delta H_{Etanol}$  representa la entalpía de

mezcla en función de la fracción molar de etanol presente en el sistema y  $n_{Etanol}$  representa el número de moles de etanol contenidas en cada tanque.

Finalmente, el cambio estimado de energía térmica en el sistema se utilizó para ajustar la temperatura de suministro del etanol a un valor inferior a 25 °C asumiendo cambios despreciables en el calor específico del etanol anhidro por acción del cambio de temperatura. La ecuación (33) muestra la expresión matemática empleada.

$$E_G = n_{Etanol} C'_{Etanol} (25\text{ °C} - T_{inEtanol}) \quad (33)$$

Donde  $E_G$  representa la energía generada al interior del sistema,  $n_{Etanol}$  representa el número de moles totales contenidas en cada tanque,  $C'_{Etanol}$  representa el calor específico molar del etanol anhidro y  $T_{inEtanol}$  representa la temperatura de suministro del etanol anhidro a cada tanque.

#### 4.6.5. Escalamiento de las centrifugas del proceso

Se consideró el empleo de 4 centrifugas para el proceso bajo estudio en base al número de centrifugas requeridas para el procesamiento del contenido de los tanques de precipitación con etanol. Estas mismas centrifugas se reutilizan en las dos operaciones de lavado por centrifugación de los sólidos de bagazo de caña, en la operación de cosecha del caldo de fermentación y en la operación de recuperación de enzimas. La determinación de las características de las cuatro centrifugas empleadas en el proceso se realizó empleando la expresión desarrollada por Yang *et al.* [48] para el escalamiento directo de centrifugas de banco a centrifugas de discos industriales. La ecuación (34) muestra la expresión empleada:

$$GT = \frac{8 \pi^3 n^2 \varepsilon N}{3 g \dot{V} \cos\theta} (R^3 - r^3) \quad (34)$$

Donde  $n$  representa la velocidad angular del tambor de la centrifuga,  $\varepsilon$  representa la distancia entre un disco y otro al interior de la centrifuga,  $N$  representa el número de discos

al interior de la centrífuga,  $g$  representa la aceleración de la gravedad,  $\dot{V}$  representa el caudal volumétrico de alimentación a la centrífuga,  $\theta$  representa el ángulo de inclinación de los discos de la centrífuga,  $R$  representa el radio externo del tambor de la centrífuga,  $r$  representa el radio interno del tambor de la centrífuga y  $GT$  representa el parámetro que se obtiene al multiplicar el número de fuerzas  $G$  por el tiempo de centrifugación registrados en el equipo de centrifugación a escala de laboratorio. Los parámetros adicionales requeridos para la determinación del caudal operativo del equipo fueron tomados de la metodología desarrollada por Mariño *et al.* [32], de la revisión de parámetros de operación típicos de centrífugas de discos realizada por Leung *et al.* [49] y de la ficha técnica de la centrífuga PX – 100 de Alfa Laval [50].

Los tiempos de centrifugación y el consumo de energía en las operaciones unitarias de centrifugación del proceso fueron determinados en base al caudal operativo de cada centrífuga y a los datos de potencia de centrifugación brindados por Alfa Laval para la centrífuga PX – 100 [50].

#### **4.6.6. Dimensionamiento del tanque de resuspensión**

El volumen operativo del tanque de resuspensión de enzimas se determinó en función de la masa de proteínas recuperada al término de la precipitación con etanol. Las dimensiones del tanque de resuspensión de enzimas se determinaron luego asumiendo una geometría cilíndrica con una proporción altura – diámetro de 1.15:1 y una operación al 75% de su capacidad volumétrica, tal como establecen Oniscu *et al.* [51] y Towler y Sinnott [33].

#### **4.6.7. Estimación del tiempo de resuspensión de proteínas**

El tiempo de resuspensión de proteínas se calculó empleando la correlación desarrollada por Oniscu *et al.* [51] para determinar tiempos de resuspensión de enzimas y/o micelas de hongos sin agregación en tanques agitados equipados con 3 deflectores y 2 impulsores. Esta correlación está dada por la ecuación (35):

$$t = (7.25) \left( \frac{10^2 C_x^{1.42} L^{0.18}}{N^{0.84}} \right) \quad (35)$$

Donde  $t$  representa el tiempo de resuspensión,  $C_x$  representa la concentración de biomasa celular y/o proteínas en el medio,  $L$  representa la distancia entre ambos impulsores y  $N$  representa la velocidad angular del impulsor. Los autores reportan una relación adimensional típica entre el diámetro de cada impulsor y la distancia que separa a ambos impulsores de 0.28 para tanques de resuspensión y/o biorreactores, por lo que se optó por utilizar este dato para determinar la separación entre los impulsores empleados.

#### 4.6.8. Estimación de la potencia de agitación en el tanque de resuspensión

La estimación de la potencia de agitación en el tanque de resuspensión se realizó utilizando los datos típicos de potencia volumétrica de agitación reportados por Towler y Sinnott [33]. Los autores sugieren el empleo de un valor típico de  $0.1 \text{ kW}/\text{m}^3$  para operaciones de mezclado simples sin transferencia de calor, por lo que se optó por este valor para estimar la potencia de agitación consumida durante la operación en cuestión.

#### 4.7. Cálculo del *E factor* del proceso

El cálculo del *E factor* del proceso se realizó para un escenario de operación por lotes (Sección 5.3.1) y un escenario de operación por lotes alimentados (Sección 5.3.3). La masa de efluentes acuosos, emisiones gaseosas, biomasa celular residual, etanol realimentado a las instalaciones principales de la biorrefinería y aceite térmico requerido al año por cada lote de producto fueron relacionadas con la masa de *cocktail* enzimático que se obtiene por cada lote de bagazo de caña de azúcar procesado de acuerdo con Manahan [52].



## **4.8. Evaluación económica del proceso**

### **4.8.1. Estimación del CapEx base del proyecto**

El CapEx del proceso se determinó de acuerdo con los criterios establecidos por Harrison *et al.* [17]. El precio de compra de los equipos (PC) se determinó utilizando las correlaciones de costos brindadas por Towler y Sinnott [33]. Los precios se ajustaron a la inflación del año 0 utilizando el índice CEPCI 2020 [53]. Asimismo, en base a lo sugerido por Ferreira *et al.* [8], se omitió el empleo de un factor de localización para este tipo de procesos. En el caso de los fermentadores, los precios de compra fueron cotizados directamente con Biotehniskais Centrs [54].

Posteriormente, se utilizaron los porcentajes mostrados en la Tabla 4.1 para determinar la inversión de capital fijo (FCI) y se asumió que el monto estimado representa un 85% del CapEx del proceso, de manera que el 15% restante corresponde al capital de trabajo (WC) según sugieren Harrison *et al.* [17].

<b>Concepto</b>	<b>Base de cálculo</b>
Precio de compra	PC
Equipos no listados	0.25 x PC
Instalación	0.5 x PC
Tuberías	0.4 x PC
Instrumentación	0.35 x PC
Aislamiento	0.03 x PC
Electricidad	0.15 x PC
Construcción	0.45 x PC
Mejora del terreno	0.15 x PC
Instalaciones auxiliares	0.5 x PC
<b>Costos directos de planta</b>	<b>TPDC</b>
Ingeniería	0.25 x TPDC
Construcción	0.35 x TPDC
<b>Costos indirectos de planta</b>	<b>TPIC</b>
<b>Costos totales de planta</b>	<b>TPDC + TPIC</b>
Honorarios del contratista	0.05 x (TPDC + TPIC)
Contingencias	0.1 x (TPDC + TPIC)
<b>Otros costos</b>	<b>OC</b>
<b>Inversión de capital fijo (FCI)</b>	<b>OC + TPDC + TPIC</b>
<b>Capital de trabajo (WC)</b>	$\frac{0.15}{0.85} \times (\text{OC} + \text{TPDC} + \text{TPIC})$

**Tabla 4. 1.** Factores típicos utilizados para el cálculo del CapEx en un proceso biológico [17]

#### 4.8.2. Estimación del OpEx base del proyecto

La estimación del OpEx se repartió en 4 secciones: costos fijos, materias primas, utilidades y costo de tratamiento de residuos.

Los costos fijos se determinaron de acuerdo con los criterios establecidos por Harrison *et al.* [17]. Asimismo, el monto correspondiente a los costos de mano de obra base se determinaron de acuerdo con los factores para el cálculo del número de operarios por turno

en función del número de equipos involucrados en el proceso dados por Peters y Timmerhaus [55]. La Tabla 4.2 muestra los porcentajes empleados.

Concepto	Base de cálculo	Porcentaje utilizado
Mantenimiento	Precio de compra (PC)	0.1 x PC
Aseguramiento	Inversión de capital fijo (FCI)	0.01 x FCI
Impuestos locales a la propiedad	Inversión de capital fijo (FCI)	0.02 x FCI
Mano de obra base (BL)	11 trabajadores por turno 3 turnos por día 330 días laborados al año 8 US\$ / hora laborada	Consideraciones sugeridas por Peters y Timmerhaus [55]
Supervisión (SM)	Mano de obra base (BL)	0.25 x BL
Beneficios (DSO)	Mano de obra base + Supervisión (BL + SM)	0.6 x (BL + SM)
Mano de obra total (TL)	Mano de obra base + Supervisión + Beneficios (BL + SM + DSO)	(BL + SM + DSO)
Gastos corporativos	Mano de obra total (TL)	0.65 x TL

**Tabla 4. 2.** Porcentajes de deducción típicos utilizados para el cálculo de los costos fijos del OpEx en un proceso biológico [17]

Los costos variables asociados a las materias primas se determinaron en base al balance de materia del proceso y a los precios unitarios vigentes en el mercado para el año 2020. Asimismo, el precio unitario del bagazo de caña de azúcar fue asumido como 0 US\$/kg debido a la abundancia de este recurso en el entorno de una planta de producción de etanol 1G + 2G en Brasil y a la consideración de un costo de oportunidad igual a cero para el bagazo de caña de azúcar.

Los costos variables asociados a las utilidades (agua de enfriamiento, aceite térmico, vapor con fines de desinfección y electricidad) y tratamiento de efluentes se determinaron en base al balance de materia del proceso y a los precios de utilidades y costos típicos de tratamiento de aguas residuales sugeridos por Peters y Timmerhaus [55] y Towler y Sinnott

[33], respectivamente. En el caso del gas natural, se asumió una eficiencia energética del 95% y un valor de 42 MJ/kg [56] para el cálculo del consumo durante la hidrólisis alcalina. Asimismo, se consideró un costo de procesamiento de 0.15 US\$/kg [57] para la restitución del etanol anhidro desviado de las instalaciones de la planta principal. Por último, se asume que la biomasa residual obtenida al término de la cosecha del caldo de fermentación es eliminada por incineración por un costo de 1.36 US\$/kg [58].

El suministro de utilidades fue asumido como un servicio provisto por las instalaciones de servicios correspondientes a la planta principal de producción de etanol 1G + 2G, por lo que no fue necesario considerar la construcción de equipos adicionales como calderas, turbinas o instalaciones de intercambio iónico para la remoción de sales de calcio y magnesio del agua de proceso. Asimismo, se asumió que la incineración de biomasa y el tratamiento del etanol empleado en la precipitación de enzimas son tareas que toman lugar en las instalaciones la planta principal del proceso de producción de etanol 1G + 2G.

#### **4.8.3. Anualización de la inversión de capital fijo**

Se empleó la definición de tasa de costo de capital anualizado brindada por Towler y Sinnott [33] para anualizar la inversión de capital fijo (FCI) del proceso, en la cual se utiliza la tasa de interés de capital asumida para el financiamiento de los costos de capital del proyecto y el número de años tomados en cuenta en la evaluación económica para estimar un monto anual correspondiente a la carga de capital del proyecto. La ecuación (36) muestra la expresión matemática empleada.

$$ACCR = \frac{[i(1+i)^n]}{[(1+i)^n - 1]} \quad (36)$$

Donde  $i$  representa la tasa de capital asumida para el proyecto,  $n$  representa número de años tomados en cuenta para la evaluación económica del proyecto y  $ACCR$  representa la tasa de costo de capital anualizado, el cual se multiplica por la inversión de capital fijo para obtener la carga de capital anual del proceso. La tasa de interés de capital típica que sugieren

los autores para un proyecto cuya vida útil es de 20 años es de 15%, por lo que se optó por este valor para estimar la carga de capital anual del proceso.

#### 4.8.4. Estimación del costo de producción por litro de *cocktail*

El costo total de producción anual, conformado por la suma del OpEx y el costo de capital anualizado del proceso, fue relacionado con el volumen anual de *cocktail* para obtener el costo de producción por litro de *cocktail* al término del proceso de acuerdo con la ecuación (37).

$$\text{Costo unitario } \left(\frac{\$}{L}\right) = \frac{\left[\text{Costo total de producción anual } \left(\frac{\$}{\text{año}}\right)\right]}{\left[\text{Volumen de cocktail por lote } \left(\frac{L}{\text{lote}}\right)\right] \left[\text{Lotes producidos al año } \left(\frac{\text{lotes}}{\text{año}}\right)\right]} \quad (37)$$

### 4.9. Secuenciamiento de tareas del proceso

#### 4.9.1. Desarrollo de los esquemas de secuenciamiento de tareas

Los esquemas de secuenciamiento de tareas del proceso se realizaron en base a los procedimientos establecidos por Smith *et al.* [59].

Los diagramas de Gantt que representan a cada esquema fueron construidos en MATLAB utilizando el código libre “matlab-simple-gantt” desarrollado por Tiemen Schuijbroek [60], el cual se encuentra disponible como un código de uso libre en GitHub.

#### 4.9.2. Recálculo del CapEx, OpEx y costo de producción por litro de *cocktail*

Los distintos escenarios obtenidos al término de la Sección 4.8.1 se correlacionaron con valores actualizados del CapEx, OpEx y del costo de producción por litro de *cocktail*. Las actualizaciones se basaron en el número de equipos requeridos para el proceso, el número

de operarios requeridos por turno, la cantidad de materias primas, utilidades y residuos generados por lote producido.

#### **4.10. Análisis de rentabilidad del proyecto**

##### **4.10.1. Cálculo del precio mínimo de venta**

El precio mínimo de venta se calculó considerando un período de vida útil de 20 años desde que se efectúa la inversión de capital para iniciar la construcción de las instalaciones del proceso, una convención sugerida por Towler y Sinnott [33] para la evaluación de proyectos relacionados a tecnologías de procesamiento incipientes. Se asumió una inversión de capital igual al 40% y 60% del FCI en el primer y segundo años de vida del proyecto. La depreciación de los bienes de capital se calculó empleando el método MACRS en un período de recuperación de 5 años. Adicionalmente, se consideró que el proyecto empieza a operar durante el año 3 al 50% de su capacidad, y que a partir del término de este año el proceso opera al 100% de su capacidad hasta el término del año 20. La tasa de interés de capital se consideró igual a 15% de acuerdo con Towler y Sinnott [33], mientras que la tasa de impuestos en Brasil se consideró igual a 34% de acuerdo con Longati *et al.* [3].

Bajo estas condiciones, el precio mínimo de venta fue calculado como el precio de venta que generó una tasa de interés de retorno igual a la tasa de interés de capital asumida para este proyecto (15%).

##### **4.10.2. Cálculo de los índices de rentabilidad del proyecto**

El cálculo de los índices de rentabilidad (VAN y TIR) del proyecto se realizó bajo las mismas condiciones asumiendo una ganancia de 20% por encima del precio mínimo de venta determinado en la Sección 4.9.1.

#### **4.10.3. Análisis de sensibilidad del proyecto**

Para el análisis de sensibilidad del proyecto se seleccionaron las cuatro variables con mayor influencia en el costo de producción por litro de *cocktail*: el precio de compra de los equipos, el precio del etanol, el precio del *cocktail* de inhibidores de proteasas y el salario por hora de los operarios. Para las variables involucradas se contempló un rango de variación de -25% a 100% y se evaluó el impacto en el VAN del proyecto asumiendo un precio de venta de 51.17 US\$ por litro de *cocktail* (valor correspondiente a una ganancia del 20% sobre el precio mínimo de venta) y en el precio mínimo de venta.

#### **4.11. Análisis de seguridad del proceso**

El análisis de seguridad del proceso se llevó a cabo en base a la metodología HAZID descrita por Germanischer Lloyd [61]. Asimismo, la clasificación cuantitativa de los riesgos se llevó a cabo en base a la matriz de análisis de riesgos desarrollada por el Departamento de Defensa de los Estados Unidos descrita por Ristic [62].

# CAPÍTULO V

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Diagramas de flujo y descripción del proceso

A continuación, se muestran los diagramas de flujo de proceso (PFD, por sus siglas en inglés) de cada una de las secciones del proceso por lotes bajo estudio, así como una breve descripción de cada una de estas. La base de diseño y las premisas bajo las cuales el proceso es válido se muestran en las secciones 4.1 y 4.2 del presente documento.

#### 5.1.1. Sección de pretratamiento de materia prima

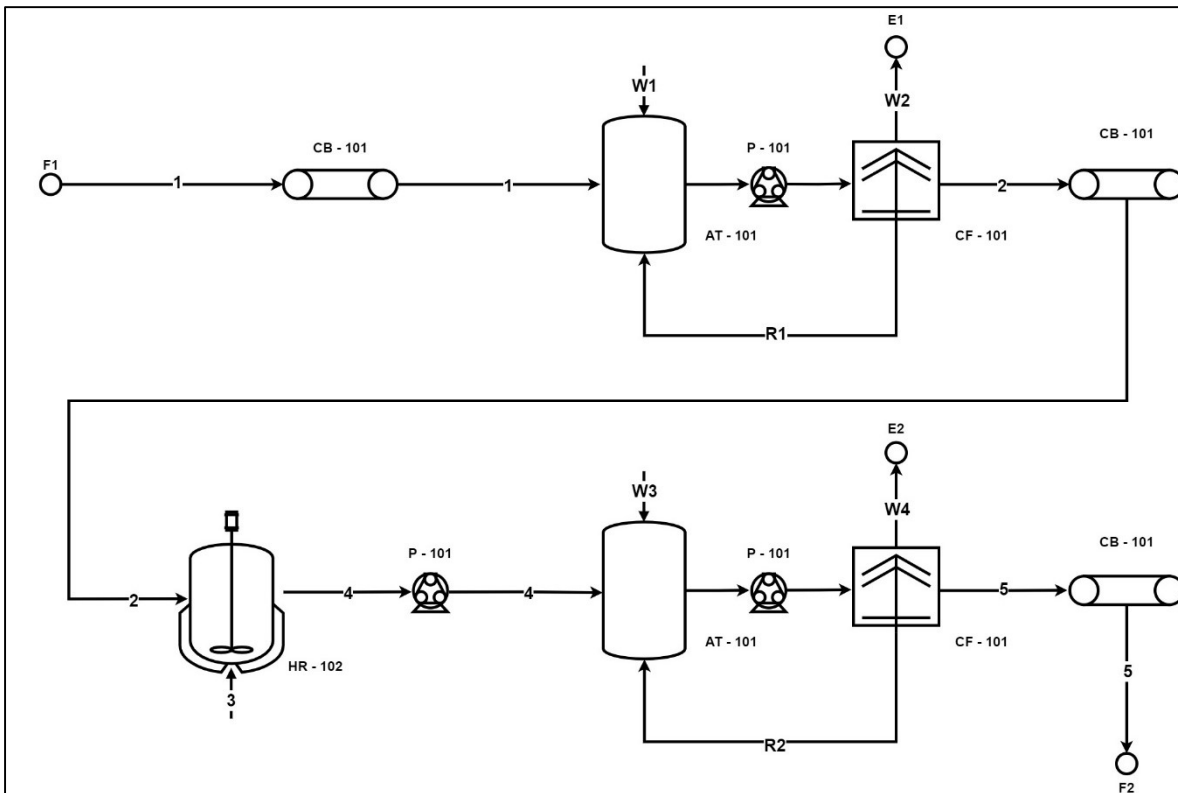


Figura 5. 1. PFD de la sección de pretratamiento del bagazo de caña del proceso bajo estudio



La secuencia de procedimientos descrita a continuación se encuentra esquematizada en la Figura 5.1. El proceso de pretratamiento en cuestión se inicia con el lavado del bagazo de caña de azúcar pretratado por explosión de vapor que se desvía de las instalaciones de la planta principal destinadas a la producción de etanol 2G (punto F1) mediante la faja transportadora CB – 101 (corriente 1). Este bagazo pretratado se lava 3 veces con lotes predefinidos de agua de proceso por medio de ciclos de lavado por centrifugación que toman lugar en el tanque de almacenamiento temporal AT – 101, en la bomba de manejo de sólidos P - 101 y en la centrífuga de lavado de sólidos CF – 101. Un ciclo de lavado consta del proceso de llenado del tanque AT – 101 con un lote de agua de proceso (corriente W1) para remojar los sólidos de bagazo pretratado (que contienen remanentes de mono y disacáridos derivados de hemicelulosa generados tras la ocurrencia de la explosión de vapor) y el proceso de centrifugación subsecuente que toma lugar en la centrífuga CF – 101, mediante el cual se logra la remoción de los sacáridos no deseados, ahora diluidos en una solución acuosa (corriente W2), que se envía a una planta de tratamiento de aguas residuales (punto E1). Los sólidos de bagazo pretratado que se recuperan al final de un ciclo de lavado son recirculados al tanque AT – 101 (corriente R1) para continuar con el siguiente ciclo, y el proceso se repite hasta concluir los 3 ciclos de lavado. Una vez concluido el tercer ciclo de lavado, los sólidos de bagazo pretratado a la salida de la centrífuga CF – 101 (corriente 2) son enviados al reactor de hidrólisis alcalina HR – 102 mediante la faja transportadora CB – 101. En este punto, se alimenta una solución de hidróxido de sodio al 1% en masa – volumen a 100 °C en una proporción de 1:10 en masa – volumen (corriente 3) para someter a los sólidos de bagazo pretratado a un segundo pretratamiento de hidrólisis alcalina durante una hora con el fin de remover la lignina presente. Posteriormente, se procede a lavar los sólidos de bagazo resultantes (corriente 4), con 6 lotes predefinidos de agua de proceso, en un proceso idéntico al primer lavado por centrifugación que también toma lugar en el tanque AT – 101, en la bomba de manejo de sólidos P - 101 y en la centrífuga CF – 101 (siendo el punto E2 la misma planta de tratamiento de aguas residuales y las corrientes W3, W4 y R2 análogas a las corrientes W1, W2 y R1). La masa de pulpa de celulosa que se obtiene a la salida de esta sección (corriente 5) es utilizada para alimentar a los trenes de siembra SF – 101, SF – 102,

SF – 103 y SF – 104, así como al fermentador principal TF – 101, nuevamente por medio de la faja transportadora CB – 101 (punto F2).

### 5.1.2. Sección de fermentación sumergida

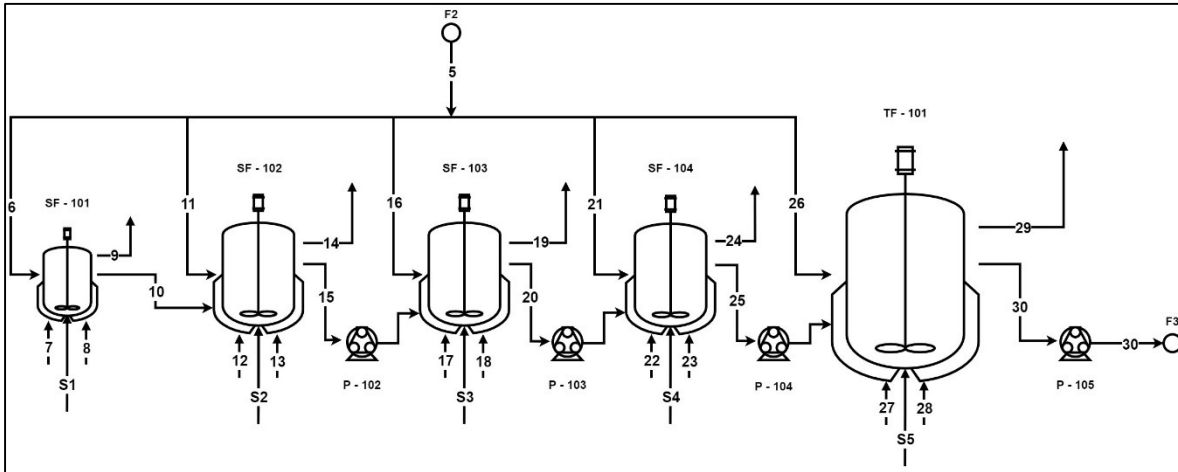


Figura 5. 2. PFD de la sección de fermentación del proceso bajo estudio

La Figura 5.2 esquematiza la secuencia de procedimientos descrita a continuación. Los sólidos de pulpa de celulosa provenientes de la sección de pretratamiento (punto F2) son fraccionados y distribuidos con el requerimiento de los tanques SF – 101, SF – 102, SF – 103, SF – 104 y TF – 101 (corrientes 6, 11, 16, 21 y 26) para iniciar los procesos de siembra de células y secreción de enzimas por fermentación sumergida, ambos gracias a la acción fermentativa de *Trichoderma harzianum* P49P11.

El proceso de siembra de células que ocurre en los tanques SF – 101, SF – 102, SF – 103 y SF – 104 toma lugar en serie con la finalidad de incrementar la cantidad de células en el medio acuoso, de manera que se logre la secreción de las enzimas de interés sin la ocurrencia de inhibición por sustrato. Los fermentadores de siembra en cuestión son alimentados con un medio de cultivo que contiene nutrientes y sales inorgánicas necesarias para el crecimiento del cultivo celular (corrientes 7, 12, 17 y 22). Puesto que el metabolismo

de las células es de naturaleza aeróbica, es necesario proveer un flujo continuo de aire pretratado (corrientes 8, 13, 18 y 23), así como una vía de escape del dióxido de carbono generado durante la fermentación a cada uno de los tanques (corrientes 9, 14, 19 y 24). El caldo de fermentación rico en células de *Trichoderma harzianum* P49P11 obtenido a la salida del tanque SF – 101 (corriente 10) es alimentado al tanque SF – 102 por medio de un trasvase simple para iniciar un nuevo proceso de crecimiento del cultivo celular, y la lógica en la secuencia de fermentaciones de siembra se repite (corrientes 15, 20 y 25) empleando las bombas de diafragma P – 102, P – 103 y P – 104 hasta alcanzar una concentración de 1 g/L de células antes de iniciar el proceso de secreción de enzimas que ocurre en el tanque TF – 101. Una vez culminado el proceso de siembra de células, cada tanque es sometido a un proceso de limpieza y desinfección, para lo cual se emplea vapor saturado a 130 °C como agente de eliminación de patógenos (corrientes S1, S2, S3 y S4).

Para el caso de la secreción de enzimas que toma lugar en el tanque TF – 101, se alimentan los sólidos de pulpa de celulosa (corriente 26, el caldo de fermentación rico en células proveniente del fermentador de siembra SF – 104 (corriente 25), el medio de cultivo para inducir la secreción de las enzimas de interés (corriente 27), y se suministra un flujo de aire pretratado durante todo el proceso unitario (corriente 28). Los gases generados durante la fermentación son eliminados de manera continua mediante una vía de escape hasta el término de la fermentación (corriente 29), que se produce luego de alrededor de 80.8 horas. El caldo de fermentación rico en enzimas obtenido a la salida del tanque TF – 101 (corriente 30) es luego enviado a la sección de recuperación de enzimas (punto F3) por medio de la bomba de diafragma P – 106 para ser cosechado y tratado, mientras que el fermentador se somete a un proceso de limpieza y desinfección en el cual se suministra vapor saturado a 130 °C para eliminar los patógenos remanentes (S5).

### 5.1.3. Sección de recuperación de enzimas

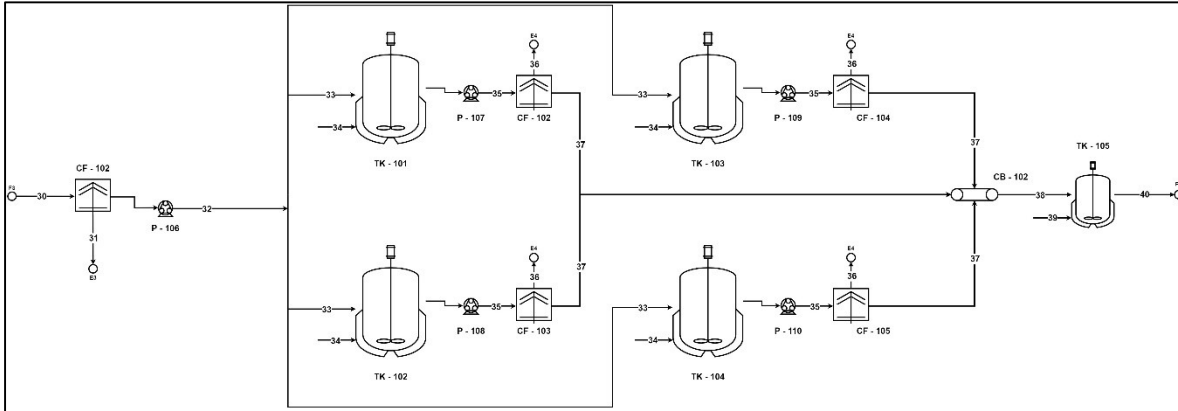


Figura 5. 3. PFD de la sección de recuperación de enzimas del proceso bajo estudio

La Figura 5.3 esquematiza la secuencia de procedimientos descrita. Para iniciar el procesamiento del caldo de fermentación rico en enzimas (corriente 30) proveniente de la sección de fermentación sumergida (punto F3) se realiza una operación de centrifugación en la centrífuga CF - 102 con el fin de eliminar los sólidos remanentes de pulpa de celulosa en suspensión y la biomasa celular generada durante el proceso de secreción de enzimas, de manera que se obtiene un desecho biológico sólido (corriente 31) que se envía a un incinerador (punto E3) para evitar la ocurrencia de contaminación, y un líquido clarificado rico en enzimas (corriente 32). Este líquido clarificado es alimentado por medio de la bomba de diafragma P - 106 a los tanques de precipitación TK - 101, TK - 102, TK - 103 y TK - 104 (corriente 33) junto a etanol anhidro proveniente de la planta de producción de etanol 1G + 2G (corriente 34) en una proporción de 1:9 en volumen. En este punto, el contenido de cada tanque es sometido a un proceso de agitación breve para asegurar la homogeneidad del contenido, tras lo cual es dejado en reposo para que se produzca el efecto deseado de aglomeración y precipitación de las proteínas en solución. El contenido de cada tanque (corriente 35) es luego alimentado a un nuevo proceso de centrifugación que toma lugar en las centrífugas CF - 102, CF - 103, CF - 104 y CF - 105 para eliminar el sobrenadante rico en etanol (corriente 36), que es enviado de vuelta a las instalaciones de la planta principal

para ser destilado (punto E4). Por su parte, las enzimas precipitadas (corriente 37), ahora en fase sólida, son recolectadas y alimentadas al tanque de resuspensión TK – 105 (corriente 38) a través de la faja transportadora CB – 102, en donde se produce su estabilización en un medio compuesto por una solución buffer de citrato a pH 4.8 e inhibidores de proteasas (corriente 39). Al término de la operación de resuspensión, el *cocktail* enzimático rico en enzimas xilanolíticas (corriente 40) está listo para ser empleado como agente complementario de la actividad enzimática de celulasas en procesos unitarios de hidrólisis enzimática para la producción de etanol 2G o en la sacarificación directa de fuentes de biomasa.

## **5.2. Diseño de la sección de pretratamiento de materia prima**

### **5.2.1. Justificación del pretratamiento sobre el bagazo de caña de azúcar**

El metabolismo celular del hongo *Trichoderma harzianum* P49P11 es particular entre las especies del género *Trichoderma*, pues es capaz de efectuar la secreción de un complejo multienzimático utilizando la celulosa presente en el bagazo de caña de azúcar como inductor y fuente de carbono [5]. Para ello es necesario efectuar primero un pretratamiento al bagazo de caña de azúcar natural que se desvía de las instalaciones de la planta principal de producción de etanol 1G + 2G con el fin de remover la hemicelulosa y la lignina, componentes que dificultan la accesibilidad biológica de la celulosa para los microorganismos, antes de ser empleado como fuente de carbono para inducir la secreción de enzimas.

Rocha *et al.* [32] reportan que el empleo de una combinación de un primer pretratamiento por explosión de vapor y un segundo pretratamiento por hidrólisis alcalina utilizando una solución de hidróxido de sodio al 1% en masa – volumen permiten obtener una pulpa de celulosa de alta accesibilidad biológica con un bajo contenido de hemicelulosa y lignina. Esta misma pulpa fue utilizada por Gelain *et al.* [5] como agente inductor y fuente de carbono para describir la cinética de secreción de enzimas por fermentación que efectúa el hongo *Trichoderma harzianum* P49P11.

La Tabla 5.1 describe los porcentajes de celulosa, hemicelulosa y lignina en los sólidos de bagazo de caña de azúcar sometidos a los dos pretratamientos descritos en la metodología desarrollada por Rocha *et al.* [32].

<b>Porcentaje en masa de componentes</b>	<b>Bagazo sin pretratamiento</b>	<b>Explosión de vapor</b>	<b>Explosión de vapor + Hidrólisis alcalina</b>
Agua	50%	60.35%	74.57%
Celulosa	21.55%	22.94%	22.03%
Hemicelulosa	12.60%	2.63%	1.02%
Lignina	11.45%	12.96%	1.55%
Otros	4.40%	1.12%	0.84%

**Tabla 5. 1.** Composiciones de los sólidos de bagazo de caña de azúcar en distintas etapas del proceso de pretratamiento

En la Sección 4.1 se declara que 0.749 toneladas de bagazo por lote son pretratados por explosión de vapor dentro de las instalaciones de la planta principal aprovechando el hecho de que este mismo proceso se emplea para pretratar el bagazo de caña en la producción de etanol 2G [3], lo que da un total de 0.622 toneladas de bagazo pretratado por explosión de vapor que ingresan a la sección de pretratamiento del proceso bajo estudio. Luego de ser sometidos al segundo pretratamiento por hidrólisis alcalina, se obtienen 0.502 toneladas de pulpa de celulosa. Esta información se puede verificar en la Sección 5.6, que describe el balance de materia del proceso bajo estudio.

### **5.2.2. Primer lavado por centrifugación**

Luego de realizar el pretratamiento por explosión de vapor en las instalaciones principales de la planta para remover la hemicelulosa presente en el bagazo de caña, es necesario someterlo a un proceso de lavado por centrifugación para remover los remanentes de hemicelulosa y monosacáridos y oligosacáridos derivados de esta. Para ello, Rocha *et al.*

[32] sugieren el uso de 3 lotes de agua de proceso en una proporción de 10:1 respecto a la masa de bagazo crudo ingresado al proceso. El proceso de lavado por centrifugación en cuestión se realiza llenando un tanque pulmón sin agitación con los lotes de agua de proceso para luego alimentar el contenido a una centrífuga. El sólido que se obtiene a la salida de la centrífuga es recirculado al tanque para repetir el proceso hasta concluir los 3 lavados, mientras que el sobrenadante rico en derivados de hemicelulosa es enviado a las instalaciones de tratamiento de aguas residuales de la planta principal.

El procedimiento seguido para el dimensionamiento del tanque pulmón se encuentra descrito en la Sección 4.4.1, mientras que el dimensionamiento de la centrífuga requerida para esta etapa del proceso, que corresponde a una de las centrífugas inicialmente dimensionadas en la Sección 5.5.3, se describe en la Sección 4.6.5. La Tabla 5.2 muestra los parámetros de operación determinados para la operación unitaria en cuestión.

<b>Parámetro de operación</b>	<b>Magnitud estimada</b>	<b>Referencia</b>
Volumen de agua por ciclo de lavado	$7.5 m^3$	[32]
Número de ciclos de lavado	3	[32]
Número de ciclos de llenado	2	[33]
Tiempo de llenado por ciclo	$0.75 h$	[33]
Número de ciclos de centrifugación	3	[32]
Potencia de centrifugación por ciclo	$10.5 kW$	[50]
Tiempo de centrifugación por ciclo	$0.71 h$	[6] [48]
Energía de centrifugación por ciclo	$7.5 kW - h$	[50]
Tiempo total consumido durante la operación	$3.64 h$	-
Energía total consumida durante la operación	$22.5 kW - h$	-

**Tabla 5. 2.** Parámetros de operación determinados para la primera operación de lavado por centrifugación

En cuanto a los tiempos de llenado, estos fueron determinados considerando el uso de tuberías de abastecimiento de 6 pulgadas de diámetro con una velocidad de flujo nominal de  $10 \text{ m}^3/\text{h}$  de agua de proceso, lo que da una velocidad de flujo en el interior de la tubería inferior a  $1 \text{ m/s}$  y concuerda con los valores típicos sugeridos por Towler y Sinnott [33] para instalaciones de bioprociamiento. Por otro lado, los tiempos de centrifugación fueron determinados asumiendo que se reutiliza una de las centrífugas dimensionadas en la Sección 5.5.3 en esta etapa del proceso, cuyo caudal volumétrico de operación es de  $10.52 \text{ m}^3/\text{h}$ .

### **5.2.3. Pretratamiento por deslignificación alcalina**

Esta etapa del proceso implica un pretratamiento con una solución de hidróxido de sodio (1% en masa – volumen) a  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  para remover la mayor cantidad de lignina presente en las fibras de los sólidos de bagazo provenientes de la operación unitaria anterior. Como establecen los autores, la solución de hidróxido de sodio y el bagazo pretratado por explosión de vapor se alimentaron en una proporción en masa - volumen de 1:10 para realizar los cálculos de balance de masa en esta etapa del proceso.

El procedimiento seguido para determinar los parámetros de diseño y operación en esta etapa del proceso se detalla en la Sección 4.4.2. Las Tablas 5.3 y 5.4 muestran los parámetros de diseño determinados para el tanque de hidrólisis y los parámetros de operación determinados para el proceso unitario de deslignificación alcalina, respectivamente.



<b>Parámetro de diseño</b>	<b>Magnitud estimada</b>	<b>Referencia</b>
Capacidad de procesamiento de bagazo explotado	621.76 kg	[31]
Capacidad de producción de pulpa de celulosa	501.76 kg	[31]
Ratio de bagazo – solución de <i>NaOH</i> al 1% m/v	1:10 m/v	[31]
Volumen de diseño del reactor	8.29 m <sup>3</sup>	[33]
Geometría del reactor	Cilíndrica	[33]
Relación altura – diámetro del reactor	1:3	[33]
Altura del tanque	4.56 m	-
Diámetro del tanque	1.52 m	-
Material de construcción	Acero inoxidable A304	[33]
Capacidad volumétrica operativa del reactor	75%	[33]
Tipo de impulsor	Impulsor de hélice	[35]
Número de deflectores	3	[35]
Relación diámetro del tanque - diámetro del impulsor	3:1	[35]
Diámetro del impulsor	0.51 m	[35]

**Tabla 5. 3.** Parámetros de diseño determinados para el tanque de hidrólisis alcalina

<b>Parámetro de operación</b>	<b>Magnitud estimada</b>	<b>Referencia</b>
Velocidad de agitación	700 RPM	-
Potencia de agitación	17.53 kW	[35]
Tiempo de operación	1 h	[31]
Energía destinada a la agitación	17.53 kW – h	[35]
Temperatura de operación durante la reacción de hidrólisis	100 °C	[31]
Área de transferencia de calor de la chaqueta	18.17 m <sup>2</sup>	-
Temperatura de alimentación de la solución alcalina	25 °C	-
Tiempo de precalentamiento de la solución alcalina	4 h	[37]
Flujo de aceite térmico en la chaqueta	0.46 kg/s	[37]
Temperatura del aceite térmico	200 °C	-
Masa total de aceite térmico requerida por año	6414.27 kg	[37]

**Tabla 5. 4.** Parámetros de operación determinados para el proceso de hidrólisis alcalina

El dato calculado de potencia de agitación para este proceso unitario se encuentra en el rango de 1.5 a 2 kW/m<sup>3</sup>, lo que concuerda con los valores típicos reportados por Towler y Sinnott [33] para operaciones de agitación de sólidos en suspensión.

El área de transferencia de calor de la chaqueta fue determinada en base a la geometría del tanque y a la altura del líquido correspondiente al 75% de capacidad volumétrica operativa, lo que permitió estimar un tiempo de calentamiento de la solución alcalina de 4 horas empleando 0.46 kg/s de aceite térmico. En relación a este punto, se decidió optar por el aceite térmico Duratherm HF [38], una variedad no tóxica de aceite térmico con un punto de inflamación de 277 °C y una temperatura máxima de operación de 338 °C. Asimismo, se asume un cambio de aceite al año para la operación del tanque HR – 102.

#### 5.2.4. Segundo lavado por centrifugación

El proceso de lavado por centrifugación en cuestión se realiza centrifugando el contenido del tanque HR – 102 y luego alimentando 6 lotes de agua de proceso en una proporción de 10:1 respecto a la masa de bagazo crudo ingresado al proceso. Para ello, se emplea el tanque dimensionado en la Sección 5.2.1 y la centrífuga dimensionada en la Sección 5.5.3. El sólido que se obtiene a la salida de la centrífuga es recirculado al tanque pulmón para repetir el proceso hasta concluir los 6 lavados, mientras que el sobrenadante rico en derivados de lignina es enviado a la planta de tratamiento de aguas residuales asociada a la planta principal.

Por los puntos señalados en el párrafo anterior, los detalles correspondientes al dimensionamiento de los equipos involucrados en esta etapa del proceso y a los tiempos de llenado y centrifugación del contenido del tanque de lavado son idénticos a los referidos en la Sección 5.2.1. La Tabla 5.5 muestra los parámetros de operación determinados para la operación unitaria en cuestión.

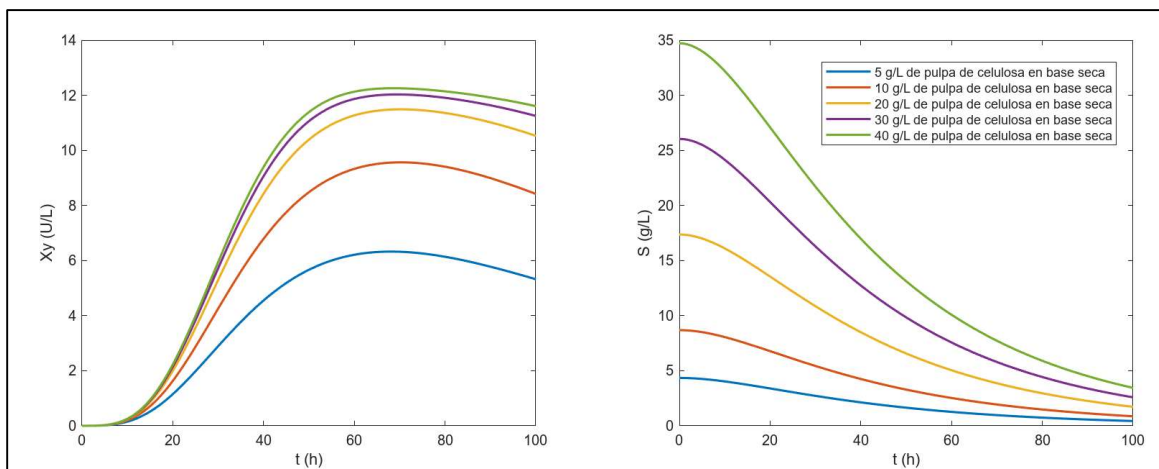
<b>Parámetro de operación</b>	<b>Magnitud estimada</b>	<b>Referencia</b>
Volumen de agua por ciclo de lavado	$7.5 m^3$	[32]
Número de ciclos de lavado	6	[32]
Número de ciclos de llenado	6	[33]
Tiempo de llenado por ciclo	$0.75 h$	[33]
Número de ciclos de centrifugación	7	[32]
Potencia de centrifugación por ciclo	$10.5 kW$	[50]
Tiempo de centrifugación por ciclo	$0.71 h$	[6] [48]
Energía de centrifugación por ciclo	$7.5 kW - h$	[50]
Tiempo total consumido durante la operación	$9.49 h$	-
Energía total consumida durante la operación	$52.4 kW - h$	-

**Tabla 5. 5.** Parámetros de operación determinados para la segunda operación de lavado por centrifugación

### 5.3. Simulación de la cinética de producción enzimática

#### 5.3.1. Datos cinéticos obtenidos para un caso de operación por lotes

El modelo matemático elaborado por Gelain *et al.* [5] contempla la secreción en simultáneo de xilanasas, celulasas y beta - glucosidasas por *Trichoderma harzianum P49P11* al utilizar concentraciones de 5 g/L, 10 g/L, 20 g/L, 30 g/L y 40 g/L de pulpa de celulosa en base seca como sustrato. Para el caso de la secreción de xilanasas, los autores declaran que no se observó un incremento significativo en la actividad enzimática máxima secretada para concentraciones de sustrato mayores a 30 g/L. Para validar esta información, se realizó la simulación del modelo cinético bajo un esquema de operación por lotes por un tiempo de 100 horas considerando una concentración inicial de células de *Trichoderma harzianum P49P11* de 1 g/L en todos los escenarios, y se asumió que el medio de cultivo estaba libre de proteínas al inicio de la fermentación, por lo que se asumió una actividad enzimática inicial de xilanasas de 0 U/L. Los resultados se muestran en la Figura 5.4.



**Figura 5. 4.** Curvas de actividad enzimática de xilanasas ( $Xy$ ) y concentración de celulosa ( $S$ ) para distintas concentraciones de pulpa de celulosa en base seca al inicio de la fermentación

Es importante aclarar que el modelo cinético simulado toma en consideración la concentración de celulosa en el medio como sustrato para la fermentación, la cual constituye

el 22.03% en masa del total de pulpa de celulosa en base húmeda introducido. Al analizar la información contenida en la gráfica, se puede observar que la actividad enzimática máxima alcanzada para el caso de 26.04  $g/L$  de sustrato es de aproximadamente 120000  $U/L$  al cabo de alrededor de 69 horas. Por este motivo, se tomó este valor como actividad enzimática máxima objetivo para evaluar los resultados obtenidos al evaluar los esquemas de operación subsecuentes.

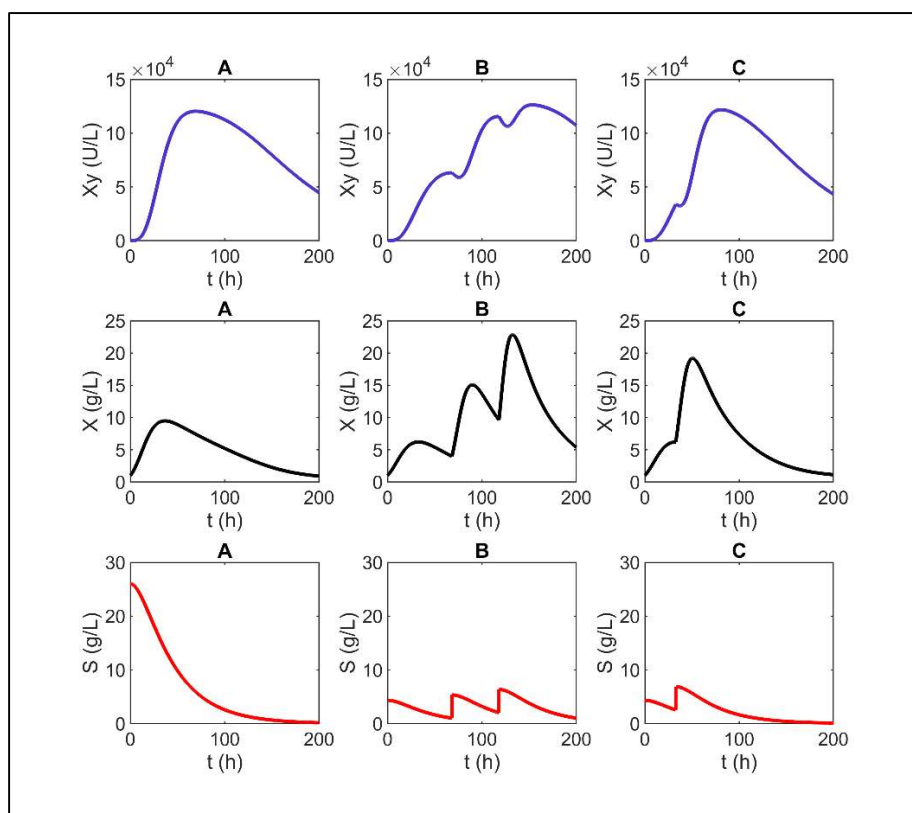
### **5.3.2. Datos cinéticos obtenidos para casos de operación por lotes alimentados**

El principal problema que enfrenta un proceso de fermentación por lotes es el efecto de inhibición por sustrato. Este consiste en la represión del crecimiento y la actividad celular en el cultivo debido a un exceso de sustrato en el medio que provoca una sobresaturación de las rutas metabólicas de conversión del sustrato en producto. A escala industrial, esto se traduce en el desaprovechamiento de una fracción considerable del sustrato alimentado, lo cual perjudica el rendimiento del proceso unitario. Frente a este problema se plantea el uso de un esquema de operación por lotes alimentados, lo cual permite reducir la concentración de sustratos en el medio de cultivo e incrementar el rendimiento del proceso.

Gelain *et al.* [5] calcularon la formación de enzimas por variación de gramo de sustrato para cada uno de los casos mostrados en la Figura 5.4, y determinaron que concentraciones de pulpa de celulosa en base seca superiores a 10  $g/L$  provocaban una disminución en la conversión total de xilanasas. En vista de esto, los autores sugieren mantener una concentración de sustrato máxima por debajo de este valor en el perfil de alimentación de sustrato para obtener resultados óptimos bajo un esquema de operación por lotes alimentados. En base a las recomendaciones dadas por los autores, se evaluó la respuesta del modelo ante adiciones discontinuas de 5  $g/L$  de sustrato con el objetivo de lograr una actividad enzimática máxima de xilanasas de alrededor de 120000  $U/L$ , valor objetivo determinado en la sección anterior.

El primer esquema de operación consideró el empleo de 5 g/L de sustrato al inicio de la fermentación y adiciones sucesivas al detectar el inicio de la inversión de la tendencia creciente en la curva de actividad enzimática de xilanasas. Al utilizar este esquema, se determinó que se requieren de dos adiciones sucesivas luego de haber transcurrido alrededor de 68 y 115 horas del inicio de la fermentación, respectivamente. Por otro lado, el segundo esquema de operación consideró el empleo de 5 g/L de sustrato al inicio de la fermentación y adiciones sucesivas al detectar el inicio de la inversión de la tendencia creciente en la curva de concentración de biomasa celular generada en el cultivo. Al utilizar este esquema, se determinó que se requiere de una adición sucesiva luego de haber transcurrido alrededor de 32 horas del inicio de la fermentación. Al igual que en el punto anterior, se consideró una concentración inicial de células de *Trichoderma harzianum* P49P11 de 1 g/L en cada caso, y se asumió que el medio de cultivo estaba libre de proteínas antes del inicio de la fermentación, por lo que se utilizó una actividad enzimática inicial de xilanasas de 0 U/L.

Las curvas de actividad enzimática (denotada como  $X_y$ ), concentración de biomasa celular (denotada como  $X$ ) y perfil de concentración total de celulosa (denotado como  $S$ ) por un tiempo de fermentación de 200 horas para cada esquema de operación se muestran en la Figura 5.5, en donde el caso A hace referencia al esquema de operación por lotes utilizando 30 g/L de sustrato, el caso B al primer esquema de operación por lotes alimentados descrito, y el caso C al segundo esquema de operación descrito.



**Figura 5. 5.** Curvas de actividad enzimática de xilanasas ( $Xy$ ), concentración de biomasa celular ( $X$ ) y sustrato ( $S$ ) para un esquema de alimentación por lotes (A), por lotes alimentados durante el pico de actividad enzimática (B) y por lotes alimentados durante el pico de concentración de biomasa (C)

Asimismo, la Tabla 5.6 resume los parámetros de operación más resaltantes obtenidos para los casos A, B y C de la Figura 5.5.

Esquema de alimentación	Masa inicial / total de pulpa de celulosa (kg)	Tiempo total de fermentación (h)	Masa de pulpa de celulosa en base húmeda por cada adición (kg)	Instantes de realimentación (h)
A	1180.56 / 1180.56	68.1	-	-
B	196.76 / 590.28	139.8	196.76	68 / 115
C	196.76 / 393.52	80.8	196.76	32

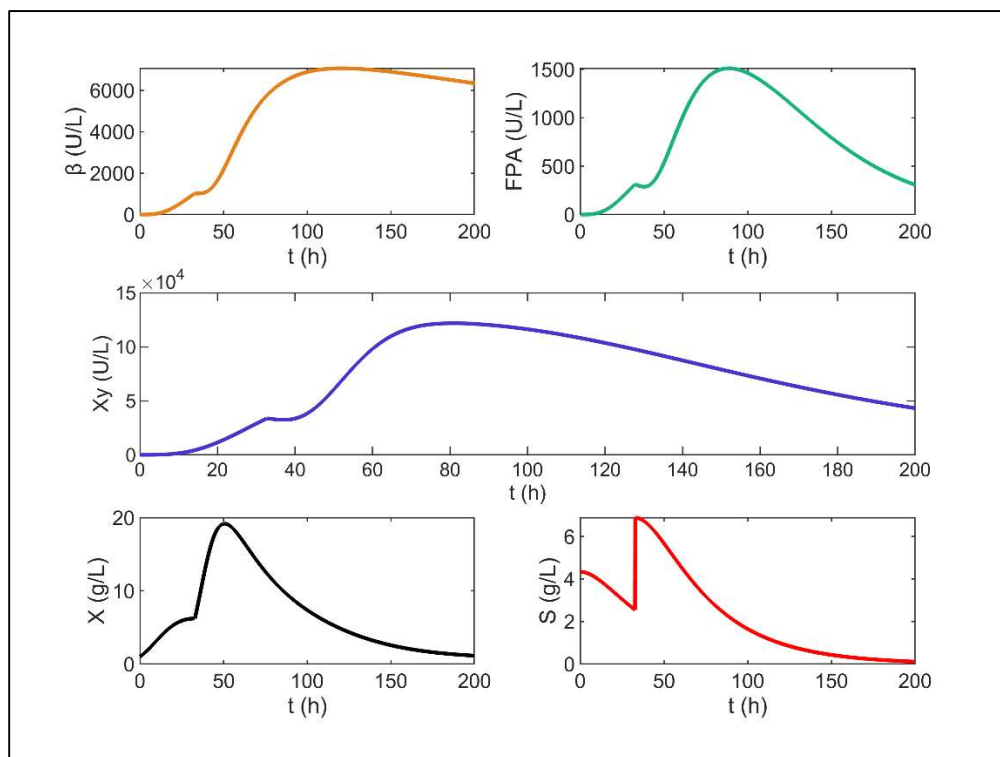
**Tabla 5.6.** Parámetros de operación obtenidos para los esquemas de alimentación descritos en la Figura 5.5

### 5.3.3. Selección del modo de operación del fermentador principal

Los resultados mostrados en la Figura 5.5 y en la Tabla 5.6 indican que el uso de un esquema de operación por lotes alimentados que toma como referencia la curva de generación de biomasa celular en el medio para determinar el instante óptimo de adición de sustrato (caso C) permite reducir en un 66.66% el consumo original de sustrato al utilizar un esquema de operación por lotes convencional sin reducir la actividad enzimática objetivo de 120000 U/L. La elevada productividad enzimática observada para este esquema de operación se debe a la presencia de una mayor concentración de células capaces de degradar el sustrato alimentado al proceso, lo que resulta en una mayor secreción de enzimas en el caldo de fermentación [42]. Por ello se optó por este esquema de operación para el diseño del proceso bajo estudio.

Como punto adicional, se consideró oportuno verificar el perfil completo de secreción de las enzimas que componen el *cocktail* producido por *Trichoderma harzianum P49P11* al considerar una operación por lotes alimentados. La Figura 5.6 muestra las curvas de actividad enzimática de xilanasas, celulasas y beta - glucosidasas a lo largo del proceso de fermentación bajo el esquema de operación seleccionado.





**Figura 5. 6.** Perfil completo de actividades enzimáticas de beta - glucosidasas ( $\beta$ ), celulasas (FPA), xilanasas (Xy), concentración de biomasa celular (X) y concentración de sustrato (S) para el esquema de operación por lotes alimentados seleccionado

Asimismo, la Tabla 5.7 resume los resultados obtenidos para el esquema de operación por lotes alimentados seleccionado para el diseño del proceso bajo estudio.

Masa total de pulpa de celulosa en base húmeda (kg)	Masa de enzimas secretadas (kg)	Actividad enzimática de xilanasas (U/L)	Actividad enzimática de celulasas (U/L)	Actividad enzimática de beta - glucosidasas (U/L)
393.52	41.73	121872.12	1479.48	6141.94

**Tabla 5. 7.** Parámetros de operación obtenidos para el esquema de alimentación descrito en la Figura 5.6

## 5.4. Diseño de la sección de fermentación

### 5.4.1. Fermentación principal

Según la cinética de secreción enzimática correspondiente a la estrategia de alimentación definida en la Sección 5.2, la operación por lotes alimentados del fermentador principal requiere de 80.8 horas para alcanzar la máxima actividad de xilanasas en el caldo de fermentación, con una segunda adición de sustrato a las 32 horas de iniciada la fermentación.

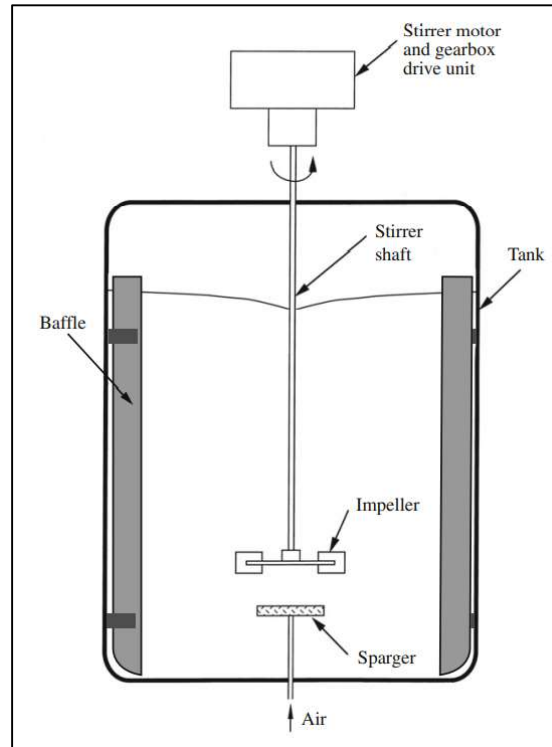
Para el dimensionamiento del fermentador principal, se siguió el procedimiento descrito en las secciones 4.5.1 y 4.5.3. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.8.

Parámetro de diseño	Magnitud estimada	Referencia
Capacidad de procesamiento de pulpa de celulosa en base húmeda	393.52 kg	[5]
Volumen de diseño del fermentador	13.33 m <sup>3</sup>	[33]
Geometría del fermentador	Cilíndrica	-
Relación altura – diámetro del fermentador	1:3	[33]
Altura del tanque	5.35 m	-
Diámetro del tanque	1.78 m	-
Material de construcción	Acero inoxidable A304	[33]
Capacidad volumétrica operativa del fermentador	75%	[35]
Tipo de impulsor	Impulsor de paletas	[35]
Número de deflectores	0	[15]
Relación diámetro del tanque - diámetro del impulsor	3:1	[33]
Diámetro del impulsor	0.59 m	-

**Tabla 5. 8.** Parámetros de diseño determinados para el fermentador principal

Un esquema típico del fermentador considerado para este proceso se puede visualizar en la Figura 5.7. Respecto a este, Doran [15] sugiere considerar el empleo de deflectores para mejorar la eficiencia del mezclado sólo cuando se esté trabajando con sustratos en fase

líquida y/o sólidos solubles en un medio acuoso, por lo que no se consideró el uso de deflectores para el dimensionamiento del equipo y la estimación de la potencia de agitación.



**Figura 5. 7.** Esquema típico del fermentador a escala industrial considerado para el proceso de secreción de enzimas [15]

Por otro lado, se determinaron los parámetros de operación principales tales como el incremento de temperatura producido durante el proceso de fermentación, el consumo de vapor saturado con fines de desinfección y el tiempo requerido para enfriar el caldo de fermentación antes de iniciar el proceso de precipitación de enzimas con etanol. Para ello, se siguieron los procedimientos descritos en las secciones 4.5.4, 4.5.5, 4.5.6 y 4.5.7. Los resultados se muestran en la Tabla 5.9.

Parámetro de operación	Magnitud estimada	Referencia
pH del caldo de fermentación	5	[5]
Velocidad de agitación	300 RPM	[42]
Potencia de agitación	46.01 kW	[35] [43]
Tiempo de operación	80.8 h	-
Energía destinada a la agitación	3717.78 kW – h	-
Incremento de temperatura en el medio durante la fermentación	0.00165 °C	[40] [41]
Temperatura de operación durante la fermentación	29 °C	[5]
Temperatura de trasvase del contenido del fermentador	25 °C	[6]
Área de transferencia de calor del serpentín interno	180 m <sup>2</sup>	[37]
Tiempo de enfriamiento	0.48 h	[37]
Flujo de agua de refrigeración en el serpentín	1 kg/s	-
Temperatura del agua de refrigeración	5 °C	-
Consumo de masa de vapor saturado a 130 °C	8.91 kg	[37]

**Tabla 5. 9.** Parámetros de operación determinados para el proceso de fermentación principal

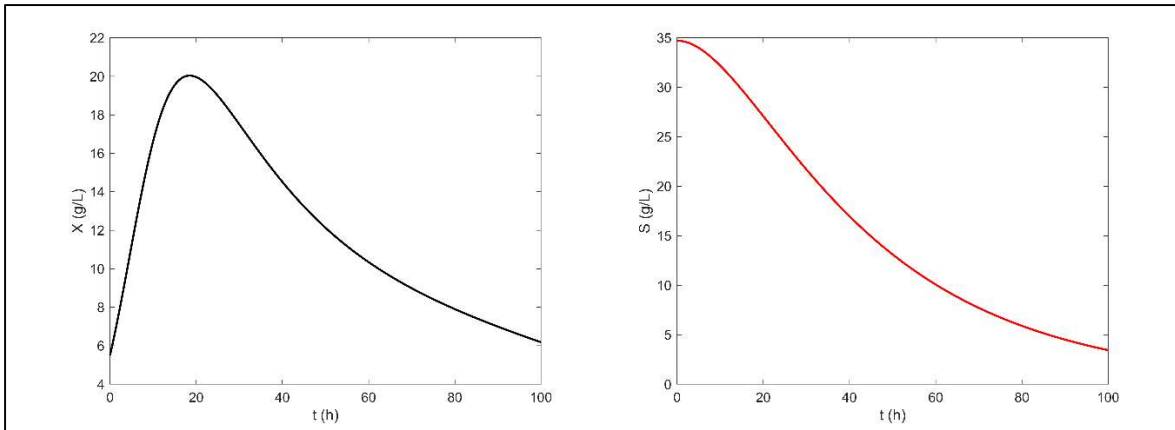
El rango adecuado de velocidad de agitación para garantizar la supervivencia de hongos unicelulares en equipos de fermentación de capacidades de hasta 100 m<sup>3</sup> oscila entre 150 RPM y 700 RPM según Shuler y Kargi [42], por lo que en principio fue posible utilizar el mismo valor empleado por Gelain *et al.* [5] en el estudio piloto para la formulación del modelo matemático empleado en esta investigación. Al observar el valor de potencia de agitación que se obtiene con esta velocidad, es posible verificar que el consumo volumétrico de potencia es mayor a 2 kW/m<sup>3</sup>, lo que concuerda con los valores típicos reportados por Towler y Sinnott [33] para operaciones de agitación de sólidos finos en suspensión.

En cuanto al valor de incremento de temperatura en el medio durante la fermentación por acción del metabolismo celular de los hongos calculado, este sugiere que no es necesario implementar un sistema de control de temperatura para mitigar la generación de calor durante el proceso unitario.

Considerando el tiempo destinado a la fermentación y al enfriamiento posterior del caldo de fermentación de 29 °C a 25 °C, el tiempo de empleo por lote de este equipo es de 81.48 horas.

#### **5.4.2. Siembra de células**

El propósito de los fermentadores de siembra es incrementar la cantidad de células disponibles para procesar el sustrato alimentado a la fermentación principal que ocurre al interior del tanque TF - 101. Para determinar el número de fermentadores requerido y el volumen de diseño de cada fermentador, se empleó el modelo matemático formulado por Gelain *et al.* [5] bajo una operación por lotes considerando una concentración inicial de pulpa de celulosa en base seca de 40 g/L y de 5.5 g/L de células de *Trichoderma harzianum* P49P11. Posteriormente, se realizaron cálculos de dilución asumiendo concentraciones finales de células de 20 g/L en cada fermentador y una concentración inicial de células en el fermentador principal TF - 101 de 1 g/L, lo que permitió determinar que se requieren de 4 fermentadores de siembra para realizar el cultivo de células en el proceso y una masa inicial de células de *Trichoderma harzianum* P49P11 igual a 55 gramos para iniciar el cultivo celular. La Figura 5.8 muestra las curvas cinéticas de la concentración de biomasa fúngica y de la concentración de celulosa en función del tiempo, donde se observa que una concentración máxima de células de 20 g/L de biomasa fúngica al partir de una concentración inicial de 5.5 g/L se alcanza después de 17.6 horas de fermentación.



**Figura 5. 8.** Curvas de biomasa celular ( $X$ ) y concentración de celulosa ( $S$ ) obtenidas para la operación de siembra de células

Al igual que ocurre en la Sección 5.2.1, es importante aclarar que el modelo cinético simulado toma en consideración la concentración de celulosa en el medio como sustrato para la fermentación, la cual constituye el 22.03% en masa del total de pulpa de celulosa en base húmeda introducido a cada fermentador.

Para el dimensionamiento de los fermentadores de siembra se siguió el procedimiento descrito en las secciones 4.5.2 y 4.5.3. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.10.

<b>Equipo</b>	<b>Volumen operativo / Volumen de diseño</b>	<b>Altura / diámetro</b>	<b>Requerimiento de pulpa de celulosa</b>
SF - 101	$0.01 \text{ m}^3 / 0.014 \text{ m}^3$	$0.54 \text{ m} / 0.18 \text{ m}$	$1.65 \text{ kg}$
SF - 102	$0.04 \text{ m}^3 / 0.05 \text{ m}^3$	$0.84 \text{ m} / 0.28 \text{ m}$	$5.94 \text{ kg}$
SF - 103	$0.14 \text{ m}^3 / 0.18 \text{ m}^3$	$1.29 \text{ m} / 0.43 \text{ m}$	$21.66 \text{ kg}$
SF - 104	$0.5 \text{ m}^3 / 0.67 \text{ m}^3$	$1.98 \text{ m} / 0.66 \text{ m}$	$78.75 \text{ kg}$

**Tabla 5. 10.** Parámetros de diseño determinados para los fermentadores tren de siembra

La potencia de agitación, la energía destinada a la agitación y el requerimiento de vapor saturado para la desinfección de cada fermentador de siembra fueron estimados siguiendo los procedimientos descritos en las secciones 4.5.5 y 4.5.7. Los valores calculados se muestran en la Tabla 5.11.

<b>Equipo</b>	<b>Potencia estimada</b>	<b>Consumo de energía</b>	<b>Masa de vapor saturado a 130 °C</b>
SF – 101	0.22 <i>W</i>	0.0039 <i>kW – h</i>	0.009 <i>kg</i>
SF – 102	2.82 <i>W</i>	0.05 <i>kW – h</i>	0.034 <i>kg</i>
SF – 103	30.13 <i>W</i>	0.53 <i>kW – h</i>	0.123 <i>kg</i>
SF – 104	320.79 <i>W</i>	5.65 <i>kW – h</i>	0.446 <i>kg</i>

**Tabla 5. 11.** Parámetros de operación determinados para el proceso de siembra de células

De acuerdo con los resultados de la simulación del modelo cinético, el tiempo destinado al cultivo celular en cada fermentador de siembra es de 17.6 horas, lo que daría un total de 70.4 horas para el proceso de siembra de células por cada lote.

### **5.4.3. Generalidades de los procesos de fermentación de la sección**

El medio de cultivo empleado en los fermentadores de siembra y en el fermentador principal está compuesto por 1 *g/L* de peptona, 1 *mL/L* de Tween 80 y 50 *mL/L* de solución salina concentrada de Mandels. A su vez, dicha solución está compuesta por 20 *g/L* de bifosfato de potasio, 14 *g/L* de sulfato de amonio, 3 *g/L* de urea, 3 *g/L* de sulfato de magnesio heptahidratado, 3 *g/L* de cloruro de calcio, 0.05 *g/L* de sulfato ferroso heptahidratado, 0.014 *g/L* de sulfato de zinc heptahidratado, 0.016 *g/L* de sulfato de manganeso monohidratado y 0.02 *g/L* de cloruro de cobalto. Estas composiciones se ven reflejadas en el balance de materia descrito en la Sección 5.6.

En relación a la preparación del inóculo previo para suministrar al fermentador SF – 101 con células fúngicas que no se consideró como parte del proceso bajo estudio, Gelain *et al.* [5] recomiendan la incubación de las esporas del hongo en agar de dextrosa de papa a 29 °C por 5 días, y luego utilizar un medio de cultivo a 29 °C compuesto por 10 g/L de celulosa microcristalina aislada, 1 g/L de peptona, 1 mL/L de Tween 80 y 50 mL/L de solución salina concentrada de Mandels para inducir el crecimiento celular hasta observar la densidad celular deseada. El uso de celulosa microcristalina como sustrato de fermentación en esta etapa tiene como objetivo lograr la activación de las rutas metabólicas de los microorganismos para poder consumir la celulosa presente en la masa de pulpa de celulosa en base húmeda que se introduce en las etapas posteriores del proceso.

A fin de mantener el estrés celular en niveles óptimos, los mismos autores recomiendan operar el proceso a una concentración de oxígeno disuelto del 30%. A nivel industrial, esto se logra suministrando aire filtrado a los tanques de fermentación bajo una lógica de control preestablecida que utiliza un sensor de oxígeno disuelto como instrumento de medición y un aspersor de aire ubicado en la parte inferior del tanque (ver Figura 5.7) como actuador final. Algunas lógicas de control en cascada consideran también al eje del impulsor como un segundo actuador, pues se sabe que la tasa de transferencia de oxígeno al caldo de fermentación está influenciada por el grado de agitación del fluido.

Por último, es necesario mencionar que todos los equipos de fermentación de la sección deben estar equipados con sistemas de dosificación de agentes antiespumantes y sistemas de control de pH para compensar los cambios de acidez en el medio por acción de los microorganismos. De igual forma, estos deben contar con válvulas de alivio para el escape de los gases generados durante la fermentación, de manera que la presión interna en cada fermentador se encuentre siempre alrededor de 1 atm y no represente un factor de riesgo para la operación segura de los equipos.



## 5.5. Diseño de la sección de recuperación de enzimas

### 5.5.1. Cosecha del caldo de fermentación por centrifugación

Luego de concluida la fermentación sumergida, es necesario realizar una primera separación por métodos físico – mecánicos tales como la centrifugación o filtración para eliminar los sólidos remanentes provenientes del bagazo de caña y de la biomasa generada por la actividad celular de *Trichoderma harzianum* P49P11. Esta etapa es conocida como cosecha, y tiene como finalidad detener el progreso de la fermentación y acondicionar el caldo rico en enzimas para su posterior recuperación. En este caso, Mariño *et al.* [6] reportan el uso de una centrifugación a escala de laboratorio con estos fines, razón por la cual se optó por esta operación unitaria para la cosecha del caldo de fermentación.

La centrífuga empleada en esta sección corresponde a una de las cuatro centrífugas dimensionadas originalmente para la etapa de recuperación de enzimas por centrifugación que se señala en la Sección 5.5.3. El procedimiento seguido para efectuar el escalamiento de este equipo se detalla en la Sección 4.6.5. La Tabla 5.12 muestra los parámetros de operación determinados para la operación de cosecha del caldo de fermentación.

Parámetro de operación	Magnitud estimada	Referencia
Caudal de operación	5.26 m <sup>3</sup> /h	[6] [48]
Tiempo de centrifugación	1.9 h	-
Potencia de centrifugación	5.3 kW	[50]
Energía de centrifugación	10.08 kW – h	-

**Tabla 5. 12.** Parámetros de operación determinados para la operación de cosecha del caldo de fermentación

En relación a la cantidad de biomasa celular obtenida al término de esta operación, Shuler y Kargi [42] establecen que esta debe ser eliminada por incineración para evitar problemas de contaminación cruzada en instalaciones de bioprocesamiento aledañas, por lo

que se consideró que cada lote de biomasa recuperada es incinerado como medida de disposición segura.

### **5.5.2. Precipitación de enzimas con etanol**

La precipitación con etanol es la etapa fundamental de la metodología reportada por Mariño *et al.* [6], y constituye la base de este estudio. En resumen, la precipitación con un solvente orgánico se basa en la desestabilización de las bicapas eléctricas que se forman cuando una proteína interactúa con un medio dipolar como el agua, provocando una aglomeración y posterior sedimentación de las proteínas en solución acuosa. El porcentaje de recuperación de las proteínas inicialmente en solución depende de variables de proceso tales como el pH, la temperatura del medio, la concentración del solvente empleado y el tiempo de procesamiento. Esta última variable resulta fundamental, pues se sabe que un tiempo prolongado de interacción entre un solvente orgánico y una proteína puede resultar en la alteración de su estructura secundaria, terciaria y cuaternaria, causando su desnaturalización y pérdida de actividad catalítica [15]. El efecto de todas estas variables operativas ha sido cubierto en el estudio publicado por los autores.

Las condiciones operativas seleccionadas para el escalamiento de la operación de precipitación con etanol en este estudio contemplan un pH en el caldo de fermentación suministrado de 5, una temperatura de 25 °C, una concentración de etanol en solución de 90% en volumen y un tiempo de procesamiento de 6 horas, condiciones bajo las cuales se obtuvo un porcentaje de recuperación de las proteínas en solución de 85.2% y una recuperación de la actividad enzimática de xilanasas de 93.2%. Se decidió optar por estas condiciones operativas porque permiten la operación del proceso a condiciones estándar (25 °C y 1 atm), lo cual reduce el requerimiento de utilidades y energía, y contribuye a la mejora del desempeño económico del proceso.

El procedimiento seguido para el dimensionamiento de los tanques de precipitación con etanol y la determinación de sus parámetros operativos se muestran en las secciones

4.6.1, 4.6.2, 4.6.3 y 4.6.4. Las Tablas 5.13 y 5.14 muestran los parámetros determinados en cada caso.

<b>Parámetro de diseño</b>	<b>Magnitud estimada</b>	<b>Referencia</b>
Capacidad de procesamiento de caldo de fermentación	2.5 m <sup>3</sup>	[6]
Volumen de alimentación de etanol anhidro	22.5 m <sup>3</sup>	[6]
Volumen de diseño del tanque	32.80 m <sup>3</sup>	[33] [44]
Geometría del tanque	Cilíndrica	-
Relación altura – diámetro del tanque	1:2	[33]
Altura del tanque	5.51 m	-
Diámetro del tanque	2.75 m	-
Capacidad volumétrica operativa del tanque	75%	[33]
Material de construcción	Acero inoxidable A304	[33]
Tipo de impulsor	Impulsor de hélice	[35]
Número de deflectores	3	[35]
Relación diámetro del tanque - diámetro del impulsor	3:1	[35] [15]
Diámetro del impulsor	0.92 m	-

**Tabla 5. 13.** Parámetros de diseño determinados para los tanques de precipitación de enzimas con etanol

Parámetro de operación	Magnitud estimada	Referencia
Velocidad de agitación	150 RPM	-
Potencia de agitación	2.86 kW	[35]
Tiempo de agitación	135.42 s	[35]
Energía destinada a la agitación	0.11 kW – h	-
Calor de hidratación del etanol	-95450.88 kJ	[63] [47]
Temperatura de operación durante la precipitación de enzimas	25 °C	[6]
Temperatura de alimentación del etanol anhidro	22.79 °C	-
Tiempo total de precipitación	6 h	[6]

**Tabla 5. 14.** Parámetros de operación determinados para la operación de precipitación de enzimas con etanol

El procedimiento seguido para determinar los volúmenes de diseño de los tanques permitió reducir la capacidad máxima operativa de cada tanque en casi medio metro cúbico frente a un caso en el que el dimensionamiento se realizó asumiendo volúmenes aditivos, lo que se traduce en una reducción de los costos de capital del proceso.

En relación a la temperatura de abastecimiento del etanol, al determinar una temperatura de suministro de etanol de 22.79 °C es posible eliminar la necesidad de contar con sistemas de control de temperatura instalados al interior de cada tanque, pues los cálculos efectuados garantizan que la temperatura de cada tanque al final del proceso de agitación será de 25 °C siempre que se respeten las proporciones volumétricas preestablecidas.

Por último, cabe mencionar que la potencia de agitación estimada para cada tanque es de 0.12 kW/m<sup>3</sup>, lo que concuerda con los valores típicos de agitación para operaciones de mezclado homogéneo sugeridos por Towler y Sinnott [33].

### 5.5.3. Recuperación de enzimas por centrifugación

Al término del proceso de precipitación de enzimas con etanol se obtiene una suspensión compuesta de dos fases: una fase líquida hidroalcohólica, la cual no tiene una utilidad en etapas posteriores del proceso y debe ser enviada nuevamente a las instalaciones de la planta de procesamiento de etanol 1G + 2G para su reprocesamiento, y una fase sólida compuesta por las proteínas de interés, la cual debe ser recuperada por métodos físico – mecánicos para continuar con el proceso.

Las consideraciones tomadas en cuenta para realizar el escalamiento de las cuatro centrífugas empleadas en esta etapa del proceso se muestran en la Sección 4.6.7. La Tabla 5.15 muestra los parámetros de diseño determinados.

Parámetro de diseño	Magnitud estimada	Referencia
Radio externo del tambor de centrifugación	0.663 m	[50]
Radio interno del tambor de centrifugación	0.0022 m	[50]
Número de discos	200	[49]
Ángulo de inclinación de los discos	45 °	[49]
Espacio de separación entre los discos	0.005 m	[49]
Velocidad angular	3484.74 RPM	[48]
Caudal de alimentación máximo	10.52 m <sup>3</sup> /h	[48]
Potencia de centrifugación (a 10.52 m <sup>3</sup> /h)	10.5 kW	[50]
Potencia de centrifugación (a 5.26 m <sup>3</sup> /h)	5.3 kW	[50]
Número de fuerzas G	9000	[6]
Material de construcción	Acero inoxidable A316	[33]

**Tabla 5. 15.** Parámetros de escalamiento determinados para las centrífugas empleadas en la operación de precipitación de enzimas con etanol

Los parámetros determinados en esta sección se hacen extensivos a las etapas de primer y segundo lavado por centrifugación y a la cosecha del caldo de fermentación por centrifugación (secciones 5.2.1, 5.2.3 y 5.5.1, respectivamente), en donde los caudales de operación son de  $10.52 \text{ m}^3/h$  a excepción de la operación de cosecha del caldo de fermentación, en donde es de  $5.26 \text{ m}^3/h$ .

El uso de una centrífuga por cada tanque de precipitación en esta etapa del proceso permite llevar a cabo la recuperación de enzimas en 2.34 horas, un tiempo razonablemente menor a las 9.36 horas que se desprenderían del empleo de una sola centrífuga para el contenido de los cuatro tanques. Un menor tiempo dedicado a la recuperación de enzimas reduce la posibilidad de pérdidas de la actividad enzimática en la masa de proteínas recuperadas, por lo que en principio su empleo estaría justificado pese a que esto pueda representar un incremento en el costo de capital del proceso. Asimismo, la rotación de los equipos dimensionados a otras etapas del proceso compensa esta decisión de diseño a nivel de costos de capital y permite reducir el tiempo en que cada centrífuga está en desuso.

#### **5.5.4. Resuspensión de enzimas**

La resuspensión de proteínas en un medio estabilizante constituye la última operación unitaria para la obtención del *cocktail* enzimático deseado. La operación en cuestión consiste en la solubilización de las proteínas utilizando un medio que evita la desnaturalización de éstas y permite su distribución y comercialización en fase acuosa de manera segura. En este caso, el medio estabilizante utilizado por Mariño *et al.* [6] consta de una solución  $0.05 \text{ M}$  de buffer de citrato de sodio a pH 4.8, valor óptimo de conservación de las enzimas xilanolíticas secretadas por *Trichoderma harzianum* P49P11. Típicamente, una operación de resuspensión toma lugar en un tanque agitado en el que se produce un mezclado hasta observar la solubilización completa de las proteínas recuperadas. La concentración objetivo de proteínas es de  $15.13 \text{ g/L}$ , la cual permite obtener la misma actividad enzimática de xilanasas del *cocktail* comercial Cellic HTec2 de acuerdo con Paye *et al.* [30].

El procedimiento seguido para el escalamiento del tanque de resuspensión de enzimas se encuentra descrito en las secciones 4.6.6, 4.6.7 y 4.6.8. Las Tablas 5.16 y 5.17 muestran los parámetros de diseño y operación determinados.

<b>Parámetro de diseño</b>	<b>Magnitud estimada</b>	<b>Referencia</b>
Capacidad de procesamiento de enzimas	35.55 <i>kg</i>	[5] [6]
Volumen de <i>cocktail</i> producido por lote	2.35 <i>m</i> <sup>3</sup>	[6] [30]
Volumen de diseño del tanque de resuspensión	3.13 <i>m</i> <sup>3</sup>	[30] [33]
Geometría del tanque	Cilíndrica	-
Relación altura – diámetro del tanque	1.15:1	[51]
Altura del tanque	1.74 <i>m</i>	-
Diámetro del tanque	1.51 <i>m</i>	-
Relación diámetro del tanque – diámetro del impulsor	3:1	[51] [33]
Diámetro del impulsor	0.54 <i>m</i>	-
Número de impulsores	2	[51]
Distancia entre los impulsores	0.15 <i>m</i>	[51]
Tipo de impulsor	Impulsor de paletas	[51]
Número de deflectores	3	[51]
Material de construcción	Acero inoxidable A304	[33]

**Tabla 5. 16.** Parámetros de escalamiento determinados para el tanque de resuspensión de enzimas

<b>Parámetro de operación</b>	<b>Magnitud estimada</b>	<b>Referencia</b>
Velocidad de agitación	150 <i>RPM</i>	[51]
Tiempo de resuspensión	363.74 <i>s</i>	[51]
Potencia de agitación	0.235 <i>kW</i>	[33]
Energía destinada a la agitación	0.02 <i>kW – h</i>	-

**Tabla 5. 17.** Parámetros de escalamiento determinados para la operación de resuspensión de enzimas

En relación a la composición del medio de resuspensión de enzimas, se empleó la calculadora de soluciones desarrollada por CUSABIO [64] para estimar las masas de citrato de sodio y ácido cítrico que deben estar presentes en solución para garantizar los parámetros de pH y concentración de insumos requeridos. Las cantidades halladas se utilizaron para realizar el balance de materia del proceso descrito en la Sección 5.6.

Es importante resaltar que Oniscu *et al.* [51] establecen que la correlación empleada para estimar el tiempo de resuspensión de enzimas en el medio estabilizante es de uso exclusivo para tanques agitados con 3 deflectores y dos impulsores de 6 paletas cada uno, en donde la relación entre el diámetro del impulsor y la separación entre ambos impulsores no es menor a 0.28. Por consiguiente, se hace indispensable respetar esta proporción en el equipo destinado a la operación unitaria en cuestión.

La estimación de la potencia de agitación en esta etapa del proceso se realizó utilizando los datos típicos de consumo de potencia de agitación por metro cúbico de solución resuspendida que reportan Towler y Sinnott [33] para operaciones de homogeneización por mezclado sin transferencia de calor, pues no se encontró información reportada en la literatura acerca de la conducta reológica y propiedades de transporte de soluciones de proteínas en función de la concentración de estas. Por consiguiente, no fue necesario validar el consumo de potencia estimado en esta operación unitaria en cuestión.

Finalmente, se consideró la adición de 1 mL de inhibidores de proteasas fúngicas por cada 20 g de biomasa celular producida durante la fermentación sumergida para evitar la degradación de las enzimas. Los cálculos se realizaron considerando la máxima concentración de biomasa celular observada en el esquema C de la Figura 5.5.

## **5.6. Balance de materia del proceso**

En base a los cálculos descritos en las secciones anteriores, se procedió a realizar los balances de materia para cada operación unitaria del proceso, de los cuales se desprenden las composiciones de las corrientes enumeradas en el Anexo 7. La Tabla 5.18 detalla las



asunciones tomadas a nivel de algunas operaciones unitarias para el cálculo de las composiciones de las corrientes, mientras que la Tabla 5.19 resume las etapas más importantes del proceso en materia de secreción y concentración de proteínas y la Tabla 5.20 muestra las actividades enzimáticas finales del *cocktail* producido.

Etapa del proceso	Asunción principal
Primer lavado de sólidos de bagazo por centrifugación	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La eficiencia de separación de los sólidos de bagazo de caña de azúcar pretratado por explosión de vapor es del 100% [42].</li> </ul>
Segundo lavado de sólidos de bagazo por centrifugación	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La eficiencia de separación de los sólidos de pulpa de celulosa es del 100% [42].</li> </ul>
Siembra de células	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La cantidad de proteínas secretadas durante los procesos de siembra de células en los tanques SF – 101, SF – 102, SF – 103 y SF – 104 es despreciable [5].</li> <li>• El consumo de nutrientes y de sustrato en el medio por parte de los microorganismos es asumido como completo [5].</li> </ul>
Fermentación principal	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El consumo de nutrientes en el medio por parte de los microorganismos es asumido como completo [5].</li> </ul>
Cosecha del caldo de fermentación por centrifugación	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La eficiencia de separación de los sólidos no consumidos de pulpa de celulosa y de la biomasa celular es del 100% [42].</li> </ul>
Precipitación de enzimas con etanol	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se consideró un factor de recuperación de proteínas del 85.2%, un factor de recuperación de actividad enzimática de xilanasas del 93.2%, un factor de recuperación de actividad enzimática de celulasas del 36% y un factor de recuperación de actividad enzimática de beta - glucosidasas del 100% [6].</li> </ul>
Centrifugación para la recuperación de enzimas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La eficiencia de separación de las proteínas precipitadas del 100% [42].</li> </ul>

**Tabla 5. 18.** Asunciones principales por etapa para efectuar los balances de materia del proceso bajo estudio

<b>Etapas del proceso</b>	<b>Concentración de enzimas (g/L)</b>	<b>Actividad enzimática de xilanasas (U/L)</b>	<b>Factor de concentración de enzimas / actividad enzimática de xilanasas</b>
Fermentación principal	4.17	121872.12	-
Precipitación de enzimas con etanol	3.55	114072.30	85.2% / 93.6%
Resuspensión de enzimas	15.13	485670.60	-

**Tabla 5. 19.** Resumen del balance de proteínas y actividades enzimáticas de xilanasas en las etapas clave del proceso bajo estudio

<b>Concentración de enzimas (g/L)</b>	<b>Actividad enzimática de xilanasas (U/mL)</b>	<b>Actividad enzimática de FPAsas (U/mL)</b>	<b>Actividad enzimática de beta - glucosidasas (U/mL)</b>
15.13	485.67	2.27	26.15

**Tabla 5. 20.** Resumen de las actividades enzimáticas presentes en el *cocktail* producido al término del proceso

De los cálculos efectuados, es posible concluir que al procesar un lote de 749 kg de bagazo de caña de azúcar desviado de la planta principal se recuperan 41.73 kg de proteínas, las cuales producen 2.35 m<sup>3</sup> de *cocktail* enzimático con una actividad xilanolítica idéntica a la reportada para el *cocktail* comercial Cellic HTec2 por Paye *et al.* [30] luego de ser resuspendidas en el medio estabilizante.

El balance de materia reveló cuatro puntos de recolección de efluentes (E1, E2, E3 y E4). Los puntos E1 y E2 corresponden a corrientes de desecho ricas en hemicelulosa (corriente W2) y lignina (corriente W4), respectivamente, y se asume que son enviadas a la planta de tratamiento de efluentes que opera de manera acoplada a la planta principal de producción de etanol 1G + 2G, en donde son tratadas para aprovechar los remanentes de ambos polímeros estructurales. El punto E3 corresponde a la biomasa celular recuperada del proceso unitario de fermentación principal (corriente 31), la cual es incinerada para evitar

una proliferación no deseada de los hongos unicelulares en instalaciones aledañas. Finalmente, el punto E4 corresponde al etanol al 90% en volumen empleado para la precipitación de las enzimas secretadas por fermentación (corriente 36), el cual es enviado a las instalaciones de la planta principal de producción de etanol para su recuperación por destilación y deshidratación.

#### **5.7. Sumario del consumo de utilidades en el proceso**

A continuación, se muestra el consumo de utilidades requerido por cada lote de enzimas procesado en base a los cálculos realizados en las secciones anteriores. La Tabla 5.21 muestra los datos en cuestión.

<b>Utilidad</b>	<b>Operación unitaria</b>	<b>Cantidad por lote</b>
Vapor saturado a 130 °C (kg)	Siembra de células	0.61
	Fermentación principal	8.91
Aceite térmico (kg)	Hidrólisis alcalina	145.78
Gas natural (kg)	Hidrólisis alcalina	46.71
	Primer lavado por centrifugación	22.46
	Hidrólisis alcalina	17.53
	Segundo lavado por centrifugación	52.40
	Siembra de células	6.23
	Fermentación principal	3717.78
	Cosecha del caldo de fermentación por centrifugación	10.08
	Precipitación de enzimas con etanol	0.43
	Recuperación de enzimas por centrifugación	98.21
	Resuspensión de enzimas	0.02
Agua de proceso (ton)	Primer lavado por centrifugación	22.43
	Hidrólisis alcalina	5.97
	Segundo lavado por centrifugación	44.87
	Siembra de células	0.5
	Fermentación principal	9.47
	Resuspensión de enzimas	2.78

**Tabla 5. 21.** Sumario del consumo de utilidades en el proceso bajo estudio

De la inspección de la Tabla 5.21, es posible verificar que la mayor parte del consumo de electricidad se concentra en el proceso de fermentación principal, lo cual es de esperarse ya que es la etapa de mayor consumo de tiempo en el proceso.

## 5.8. Sumario de la generación de residuos en el proceso

A continuación, se muestra la generación de residuos por cada lote de enzimas procesado en base a los cálculos realizados en las secciones anteriores. La Tabla 5.22 muestra los datos en cuestión.

Utilidad	Operación unitaria	Cantidad por lote
Biomasa residual (kg)	Cosecha del caldo de fermentación por centrifugación	135.30
Etanol (kg)	Precipitación de enzimas con etanol	70650.00
	Primer lavado por centrifugación	22.43
	Hidrólisis alcalina	5.97
Agua de proceso (ton)	Segundo lavado por centrifugación	44.87
	Siembra de células	0.5
	Fermentación principal	9.47

**Tabla 5. 22.** Sumario de la generación de residuos en el proceso bajo estudio

Es importante resaltar que la biomasa residual conformada por las células fúngicas y la pulpa de bagazo de caña de azúcar se elimina por incineración en las instalaciones de la planta principal de etanol 1G + 2G. Asimismo, el etanol recuperado es enviado a las instalaciones de esta planta para su reprocesamiento.

## 5.9. *E factor* del proceso

La metodología descrita en la Sección 4.7 fue ejecutada utilizando los balances de materia mostrados en el Anexo 7 para dos escenarios del proceso: el caso de operación por lotes descrito al término de la Sección 5.3.1 y el caso optimizado de operación por lotes alimentados descrito al término de las Secciones 5.3.3 y 5.13.3. Los resultados mostrados en la Tabla 5.23 demuestran que una operación por lotes redujo el *E factor* del proceso en un

48.48%. No obstante, según Manahan [52], ambos valores se encuentran dentro del rango esperado para un proceso de producción de *specialties*.

Escenario	<i>E factor</i>	Porcentaje de reducción
Proceso por lotes (Sección 5.3.1)	106.68	-
Proceso por lotes alimentados (Secciones 5.3.3 y 5.13.3)	54.97	48.48%

**Tabla 5. 23.** *E factors* calculados para el proceso bajo estudio

## 5.10. Evaluación económica del proyecto

### 5.10.1. Estimación del CapEx

Para la estimación del CapEx se siguió el procedimiento descrito en la Sección 4.7.1, el cual parte del cálculo del precio de compra (PC) de los equipos principales del proceso.

Para todos los equipos del proceso a excepción de los fermentadores, este procedimiento se realizó utilizando los métodos de costeo descritos por Towler y Sinnott [33] y Garrett [65], y se utilizó el índice CEPCI 2020 [53] para actualizar los costos de cada equipo al año 0 del proyecto. Ferreira *et al.* [8] sugieren no incluir el factor de localización al realizar un estimado de los costos de capital de un proceso de este tipo, pues no se tiene certeza de la cantidad de equipos que son manufacturados fuera de Brasil y deben ser importados necesariamente ni cómo esto puede afectar a los apartados de costos de capital directos e indirectos en las etapas de costeo subsecuentes, por lo que en principio se optó por no utilizar este factor al estimar el precio de compra de los equipos.

Como se detalla en las secciones previas, el material de construcción considerado para las centrífugas fue el acero A316, mientras que el material de construcción considerado para el resto de los equipos fue el acero A304.

En el caso particular de los fermentadores, se solicitó un estimado directo del costo de compra a Biotehniskais Centrs [54], compañía dedicada al diseño y construcción de biorreactores con sede en Letonia.

La Tabla 5.24 muestra los montos estimados para cada equipo.

<b>Equipo</b>	<b>Capacidad de procesamiento</b>		<b>Monto (\$)</b>	<b>Referencia</b>
AT - 101	9.98	m <sup>3</sup>	\$16,224.69	[33]
HR - 102	8.29	m <sup>3</sup>	\$248,851.18	[33]
SF - 101	0.01	m <sup>3</sup>	\$78,942.50	[54] [66]
SF - 102	0.05	m <sup>3</sup>	\$121,450.00	[54] [66]
SF - 103	0.18	m <sup>3</sup>	\$200,392.50	[54] [66]
SF - 104	0.67	m <sup>3</sup>	\$255,045.00	[54] [66]
TF - 101	13.33	m <sup>3</sup>	\$425,075.00	[54] [66]
CF - 101	8.69	ton/h	\$149,567.39	[65] [67]
CF - 102	8.69	ton/h	\$149,567.39	[65] [67]
CF - 103	8.69	ton/h	\$149,567.39	[65] [67]
CF - 104	8.69	ton/h	\$149,567.39	[65] [67]
TK - 101	32.81	m <sup>3</sup>	\$32,925.22	[33]
TK - 102	32.81	m <sup>3</sup>	\$32,925.22	[33]
TK - 103	32.81	m <sup>3</sup>	\$32,925.22	[33]
TK - 104	32.81	m <sup>3</sup>	\$32,925.22	[33]
TK - 105	3.13	m <sup>3</sup>	\$148,967.16	[33]
<b>Precio de compra (US\$)</b>			<b>\$2,224,918</b>	

**Tabla 5. 24.** Precio de compra de los principales equipos del proceso

Luego de conocer el precio de compra de los equipos listados, se procedió a utilizar los porcentajes descritos por Harrison *et al.* [17] para el cálculo de los costos directos, costos indirectos y otros costos de planta, los cuales se muestran en la Tabla 5.25.

<b>Concepto</b>	<b>Base de cálculo</b>	<b>Monto (US\$)</b>
Precio de compra	PC	\$2,224,918
Equipos no listados	0.25 x PC	\$556,230
Instalación	0.5 x PC	\$1,112,459
Tuberías	0.4 x PC	\$889,967
Instrumentación	0.35 x PC	\$778,721
Aislamiento	0.03 x PC	\$66,748
Electricidad	0.15 x PC	\$333,738
Construcción	0.45 x PC	\$1,001,213
Mejora del terreno	0.15 x PC	\$333,738
Instalaciones auxiliares	0.5 x PC	\$1,112,459
<b>Costos directos de planta</b>	<b>TPDC</b>	<b>\$8,410,192</b>
Ingeniería	0.25 x TPDC	\$2,102,548
Construcción	0.35 x TPDC	\$2,943,567
<b>Costos indirectos de planta</b>	<b>TPIC</b>	<b>\$5,046,115</b>
<b>Costos totales de planta</b>	<b>TPDC + TPIC</b>	<b>\$13,456,307</b>
Honorarios del contratista	0.05 x (TPDC + TPIC)	\$672,815
Contingencias	0.1 x (TPDC + TPIC)	\$1,345,631
<b>Otros costos</b>	<b>OC</b>	<b>\$2,018,446</b>
<b>Inversión de capital fijo (FCI)</b>	<b>OC + TPDC + TPIC</b>	<b>\$15,474,752.94</b>
<b>Capital de trabajo (WC)</b>	$\frac{0.15}{0.85} \times (\text{OC} + \text{TPDC} + \text{TPIC})$	<b>\$2,730,839</b>
<b>CapEx (US\$)</b>		<b>\$18,205,592</b>

**Tabla 5. 25.** Estimación de los costos de capital asociados al proceso bajo estudio

### 5.10.2. Estimación del OpEx

Para estimar el OpEx, se procedió a determinar los costos fijos y variables asociados al proceso utilizando las consideraciones detalladas la Sección 4.7.2. Los costos fijos determinados se muestran en la Tabla 5.26, mientras que los costos variables, cuya estimación se encuentra ligada al balance de materia del proceso, se muestran en las Tablas 5.27, 5.28 y 5.29.



<b>Concepto</b>	<b>Base de cálculo</b>	<b>Porcentaje utilizado</b>	<b>Monto anual (US\$/año)</b>
Mantenimiento	Precio de compra (PC)	0.1 x PC	\$222,492
Aseguramiento	Inversión de capital fijo (FCI)	0.01 x FCI	\$154,748
Impuestos	Inversión de capital fijo (FCI)	0.02 x FCI	\$309,495.06
Mano de obra base (BL)	11 trabajadores por turno 3 turnos por día 330 días laborados al año 8 US\$ / hora laborada	-	\$696,960
Supervisión (SM)	Mano de obra base (BL)	0.25 x BL	\$174,240
Beneficios (DSO)	Mano de obra base + Supervisión (BL + SM)	0.6 x (BL + SM)	\$522,720
Mano de obra total (TL)	Mano de obra base + Supervisión + Beneficios (BL + SM + DSO)	(BL + SM + DSO)	\$1,393,920
Gastos corporativos	Mano de obra total (TL)	0.65 x TL	\$906,048
<b>Importe total (US\$/año)</b>			<b>\$4,380,622</b>

**Tabla 5. 26.** Estimación de costos fijos para el proceso bajo estudio

<b>Materia prima</b>	<b>Cantidad (unidad/lote)</b>	<b>Costo unitario (\$/unidad)</b>	<b>Monto anual (US\$/año)</b>	<b>Referencia</b>
Bagazo de caña de azúcar (kg)	748.66	0	\$0.00	[55]
Hidróxido de sodio (kg)	60.27	0.29	\$17.48	[68]
Peptona (kg)	3.56	20	\$71.23	[69]
Tween 80 (kg)	3.78	2.2	\$8.31	[70]
Bifosfato de potasio (kg)	3.56	1.65	\$5.88	[71]
Sulfato de amonio (kg)	2.49	0.28	\$0.70	[72]
Urea (kg)	0.53	0.3	\$0.16	[73]
Sulfato de magnesio heptahidratado (kg)	0.53	0.15	\$0.08	[74]
Cloruro de calcio (kg)	0.53	0.5	\$0.27	[75]
Sulfato ferroso heptahidratado (kg)	0.01	1.235	\$0.01	[76]
Sulfato de zinc heptahidratado (kg)	0.0021	0.004	\$0.0000085	[76]
Sulfato de manganeso monohidratado (kg)	0.0032	1	\$0.0032	[76]
Cloruro de cobalto (kg)	0.0032	10	\$0.032	[77]
Etanol (kg)	70650.00	0.5156	\$36,427.14	[78]
Citrato de sodio (kg)	11.36	0.7	\$7.95	[79]
Ácido cítrico (kg)	18.66	0.65	\$12.13	[80]
Inhibidores de proteasas (mL)	95.90	94.4	\$9,052.96	[81]
<b>Importe total (US\$/año)</b>			<b>\$45,604.32</b>	

**Tabla 5. 27.** Estimación de costos variables asociados al consumo de materias primas por el proceso bajo estudio

<b>Utilidad</b>	<b>Consumo por lote (unidades/lote)</b>	<b>Costo unitario (US\$/unidad)</b>	<b>Monto (US\$/lote)</b>	<b>Referencia</b>
Vapor (kg)	9.52	0.012	\$0.11	[55]
Aceite térmico (kg)	145.78	27.65	\$4,030.78	[38]
Electricidad (kW – h)	3925.14	0.074	\$290.46	[55]
Agua de proceso (ton)	87.83	0.53	\$46.55	[55]
Gas natural (kg)	46.71	1.4	\$65.39	[82]
<b>Importe total (US\$/lote)</b>			<b>\$4,433.30</b>	

**Tabla 5. 28.** Estimación de costos variables asociados al consumo de utilidades para el proceso bajo estudio

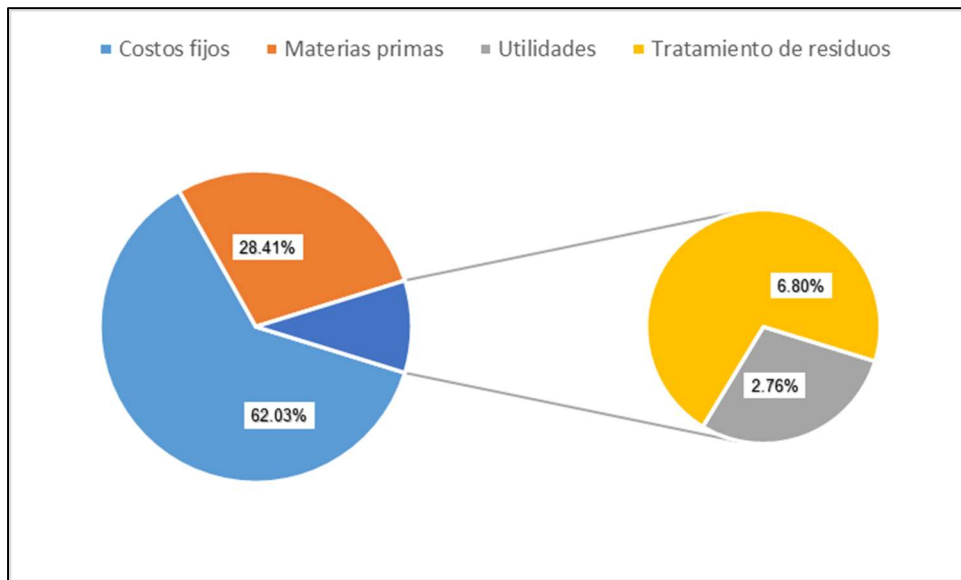
<b>Residuo</b>	<b>Consumo por lote (unidades/lote)</b>	<b>Costo unitario (US\$/unidad)</b>	<b>Monto (US\$/lote)</b>	<b>Referencia</b>
Agua de proceso (ton)	85.05	1.5	\$127.58	[55]
Etanol (kg)	70650.00	0.15	\$10,597.50	[57]
Biomasa residual (kg)	135.30	1.36	\$184.01	[58]
<b>Importe total (US\$/lote)</b>			<b>\$10,909.09</b>	

**Tabla 5. 29.** Estimación de costos variables asociados al tratamiento de residuos para el proceso bajo estudio

Un resumen de los costos de producción se muestra en la Tabla 5.30, y se esquematiza en la Figura 5.9 asumiendo una producción anual de 44 lotes, caso base discutido en la Sección 5.10.

Concepto	Monto (US\$/año)
Costos fijos	\$4,380,622
Materias primas	\$45,604.32
Utilidades	\$4,433.30
Tratamiento de residuos	\$10,909.09
<b>OpEx (US\$/año)</b>	<b>\$5,102,429</b>

**Tabla 5. 30.** Estimación de los costos operativos asociados al proceso bajo estudio asumiendo una producción anual de 44 lotes



**Figura 5. 9.** Repartición porcentual de los costos operativos del proceso bajo estudio asumiendo una producción anual de 44 lotes

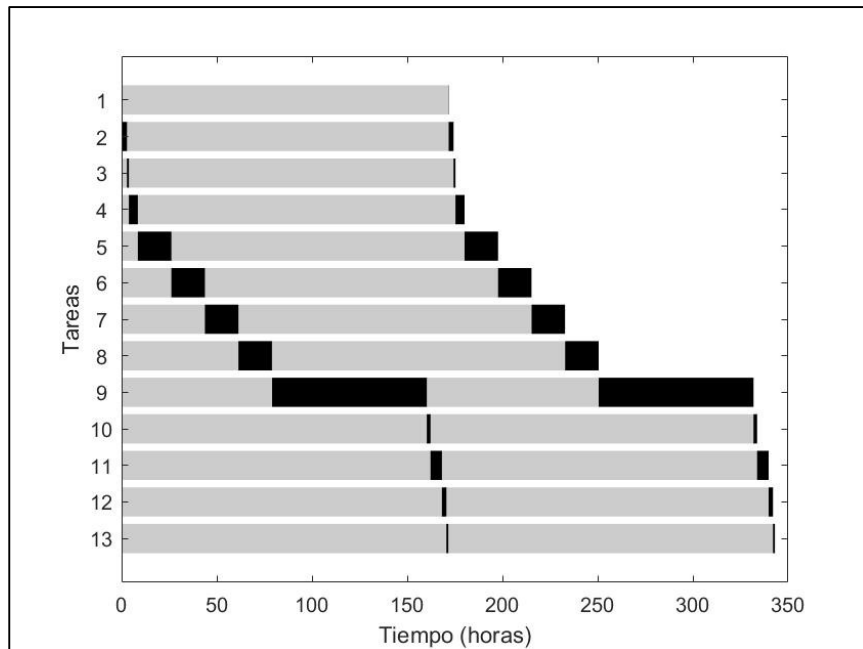
### **5.11. Secuenciamiento de tareas del proceso**

La cantidad de lotes de *cocktail* enzimático producidos por año depende del secuenciamiento de las operaciones unitarias requeridas para la producción de un lote de producto. Un secuenciamiento de tareas óptimo garantiza una productividad adecuada en un proceso por lotes y permite maximizar el uso de los equipos involucrados.

Para el proceso bajo estudio se realizó un primer secuenciamiento de tareas bajo un esquema conservador de acuerdo con los procedimientos establecidos en la Sección 4.8.1, en el cual las operaciones y procesos unitarios toman lugar en serie y se asume una ventana de tiempo laborable anual de 330 días. La Tabla 5.31 contiene una leyenda con las operaciones y procesos unitarios numeradas en el diagrama de Gantt mostrado en la Figura 5.10. Bajo el esquema de operación analizado, se obtienen 44 lotes por año, con un tiempo de procesamiento de 177.80 horas.

<b>Operación / proceso unitario</b>	<b>Equipos asociados</b>	<b>Número de tarea</b>	<b>Tiempo (h)</b>
Explosión de vapor	-	1	0.25
Primer lavado por centrifugación	AT - 101, CF - 101	2	3.64
Hidrólisis alcalina	HR - 102	3	1
Segundo lavado por centrifugación	AT - 101, CF - 101	4	9.38
Siembra de células 1	SF - 101	5	17.6
Siembra de células 2	SF - 102	6	17.6
Siembra de células 3	SF - 103	7	17.6
Siembra de células 4	SF - 104	8	17.6
Fermentación principal / Enfriamiento post fermentación	TF - 101	9	81.28
Cosecha de células por centrifugación	CF - 102	10	1.90
Precipitación de enzimas con etanol	TK - 101, TK - 102 TK - 103, TK - 104	11	6.00
Recuperación de proteínas por centrifugación	CF - 101, CF - 102 CF - 103, CF - 104	12	2.34
Resuspensión de proteínas	TK -105	13	1.60
<b>Tiempo total por lote producido (h)</b>			<b>177.80</b>
Tiempo laborable por año (h)			7920
<b>Total de lotes producidos al año</b>			<b>44</b>

**Tabla 5. 31.** Operaciones unitarias consideradas para los casos de secuenciamiento de tareas del proceso bajo estudio y resultados obtenidos para el caso base del proceso



**Figura 5. 10.** Secuenciamiento de tareas del caso base del proceso

De la Figura 5.10 se puede inferir que el esquema base de operación del proceso considera que la producción de un nuevo lote se inicia al término del procesamiento del lote anterior, lo cual puede resultar ineficiente en términos de productividad. Por otro lado, desde el punto de vista de los costos operativos, la Figura 5.9 muestra que más del 50% del OpEx corresponde a los costos fijos del proceso, hecho que puede ser subsanado incrementando el volumen de la producción anual de acuerdo con los preceptos de la economía de escala aplicados al diseño de procesos [33] [55]. Por estos factores, resulta necesario incrementar el número de lotes producidos al año, lo que puede hacerse superponiendo tareas, operando dos o más equipos para la operación unitaria que constituye el paso limitante del proceso o aplicando una combinación de ambas estrategias como sugiere Smith [59]. Estos puntos son discutidos en la Sección 5.11.

### 5.12. Estimación del costo por unidad de volumen de *cocktail* enzimático

Tras conocer el CapEx, el OpEx, el número de lotes producidos por año y el volumen de *cocktail* enzimático producido por lote en el proceso diseñado, fue posible calcular un costo por litro de volumen de *cocktail* enzimático producido siguiendo el procedimiento descrito en la Sección 4.7.4. Para ello, se ejecutó el procedimiento descrito en la Sección 4.7.3 para calcular la tasa de costo de capital anualizada y el costo anualizado de la inversión de capital fijo (FCI) del proceso. Los ítems obtenidos se muestran en la Tabla 5.32.

Concepto	Monto
Inversión de capital fijo (\$)	\$15,474,752.94
Tiempo de vida del proyecto (años)	20
Tasa de interés de capital (%)	15%
Tasa de costo de capital anualizada (%)	16%
Costo de capital anualizado (\$/año)	\$2,472,269.28
Costo variable de producción (\$/año)	\$2,681,655.49
Costo fijo de producción (\$/año)	\$4,380,622.44
Producción de <i>cocktail</i> enzimático (L/año)	103400
Costo por unidad de <i>cocktail</i> enzimático (\$/L)	\$92.21

**Tabla 5. 32.** Ítems determinados para la estimación del costo por unidad de masa de enzimas asociado al proceso bajo estudio

### 5.13. Reajuste del secuenciamiento de tareas del proceso

A continuación, se procede a realizar un reajuste del secuenciamiento de tareas del proceso con la finalidad de incrementar la producción anual de *cocktail* enzimático y mejorar la rentabilidad del proceso. Los números asignados a las tareas del proceso en las Figuras 5.11, 5.12 y 5.13 corresponden a las mismas tareas mostradas en la Tabla 5.30.

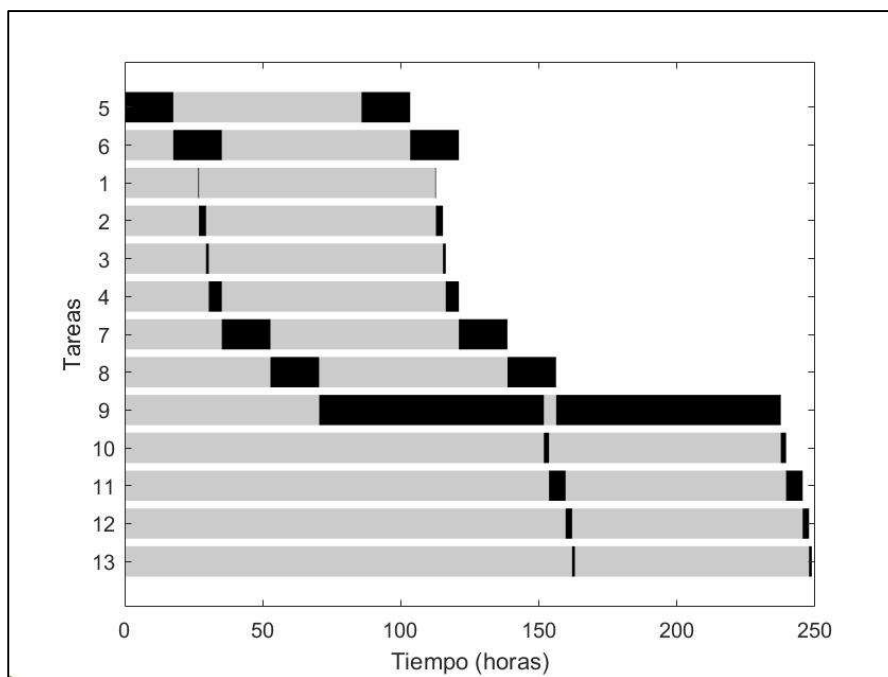


### **5.13.1. Secuenciamiento de tareas con operaciones superpuestas**

El diagrama de Gantt del caso base mostrado en la Figura 5.10 reveló que el paso limitante del proceso se encuentra en el proceso de secreción de enzimas por fermentación sumergida. Ante esto es posible reajustar el esquema de secuenciamiento para que el fermentador TF – 101 opere de manera ininterrumpida, considerando un período de 4.5 horas para realizar la limpieza, desinfección y carga de los equipos [33].

Por otro lado, se identificó que las etapas correspondientes al pretratamiento de materia prima (1, 2, 3 y 4) tienen una duración significativamente menor a la de los procesos unitarios posteriores que corresponden al tren de siembra (5, 6, 7 y 8), por lo que es posible hacer que estas tareas tomen lugar en algún momento comprendido entre el inicio de la operación del fermentador de siembra SF – 101 y el fermentador de siembra SF – 104 para reducir el tiempo de procesamiento promedio por cada lote.

La Figura 5.11 muestra el diagrama de Gantt correspondiente al esquema de secuenciamiento de operaciones superpuestas. Bajo este esquema, se logra incrementar la producción anual a 91 lotes por año, con un tiempo de procesamiento promedio por lote de 87.03 horas.

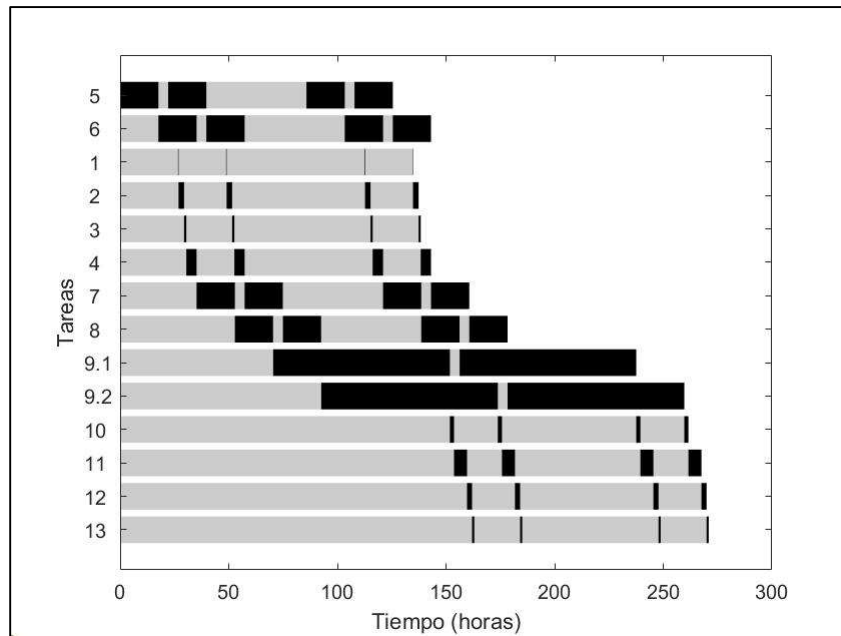


**Figura 5. 11.** Secuenciamiento de tareas considerando un esquema superpuesto de operaciones

### 5.13.2. Secuenciamiento de tareas considerando el uso de equipos adicionales

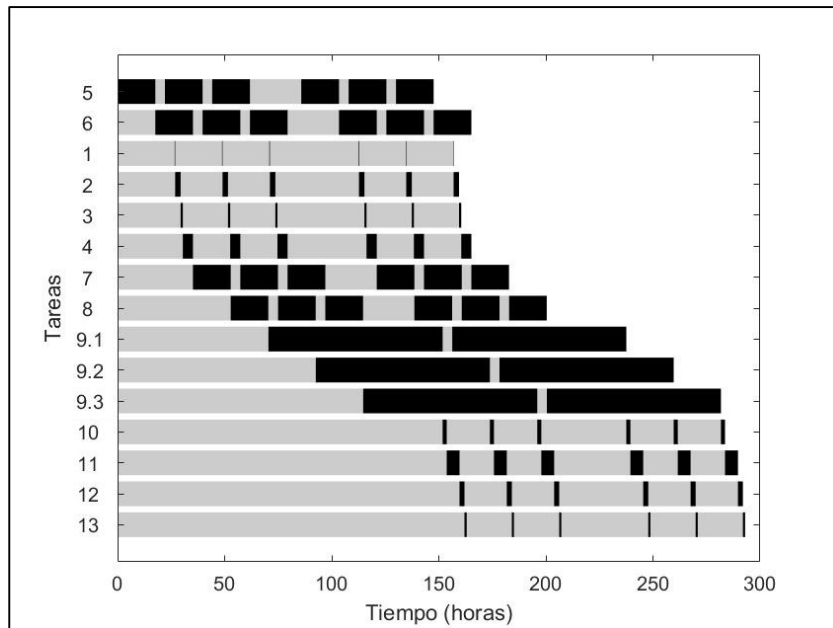
De acuerdo con los resultados mostrados en la Figura 5.11 si bien el uso del fermentador TF – 101 ha sido optimizado al superponer las tareas que conciernen a la etapa limitante del proceso, aún es factible incrementar el tiempo útil de los demás equipos del proceso. Para ello, se exploró el uso de equipos adicionales en la etapa limitante del proceso considerando un tiempo de 4.5 horas para efectos de limpieza, desinfección y carga de los fermentadores de siembra [33], equipos que constituyen un nuevo paso limitante en el esquema de tareas superpuestas.

La Figura 5.12 muestra el secuenciamiento de tareas considerando el uso de un segundo fermentador principal TF – 102. Bajo este esquema se logró incrementar la producción anual a 181 lotes por año, con un tiempo de procesamiento promedio por lote de 43.76 horas.



**Figura 5. 12.** Secuenciamiento de tareas considerando un esquema superpuesto de operaciones y el empleo de un fermentador principal adicional

Bajo esta misma lógica, es posible añadir un tercer fermentador principal TF - 103 al esquema de secuenciamiento de tareas mostrado en la Figura 5.12 para incrementar aún más el tiempo útil de los demás equipos del proceso. Los resultados se muestran en la Figura 5.13, en donde se logró incrementar la producción anual a 271 lotes por año, con un tiempo de procesamiento promedio por lote de 29.23 horas.



**Figura 5. 13.** Secuenciamiento de tareas considerando un esquema superpuesto de operaciones y el empleo de dos fermentadores principales adicionales

### 5.13.3. Impacto del secuenciamiento de tareas en los costos del proceso

La Tabla 5.33 muestra el impacto del reajuste del secuenciamiento de tareas en el costo de producción del *cocktail* enzimático. En ella se puede observar una reducción del 58.56% en el costo de producción respecto del caso baso al considerar un secuenciamiento óptimo de tareas y el uso de 3 fermentadores en paralelo.

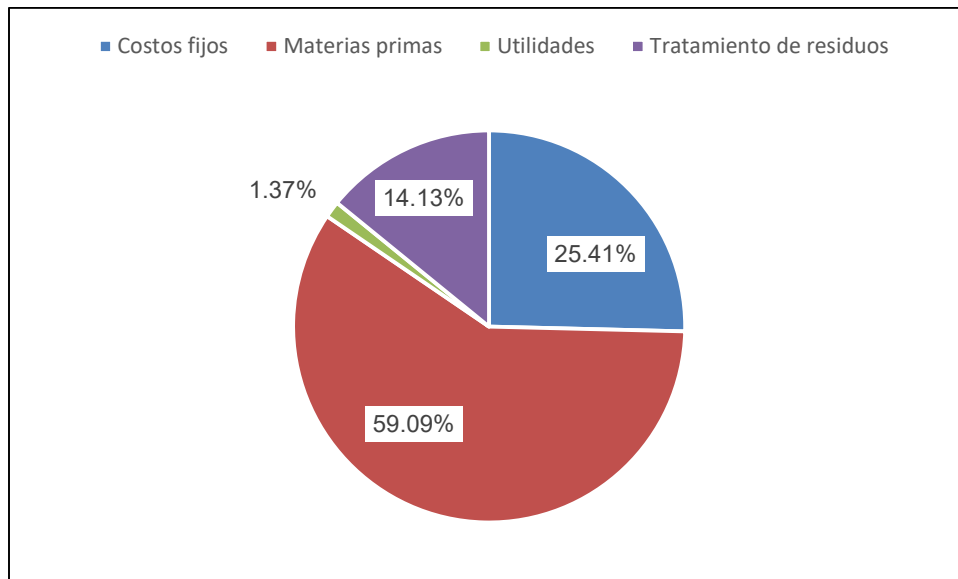
Escenario	Lotes producidos al año	Capacidad de producción (m <sup>3</sup> /año)	Tiempo de procesamiento por lote (h)	Costo unitario de producción (US\$/L)
Caso base	44	103.40	180.00	\$92.21
Tareas superpuestas	91	213.85	87.03	\$57.09
Tareas superpuestas con 2 fermentadores	181	425.35	43.76	\$42.96
Tareas superpuestas con 3 fermentadores	271	636.85	29.23	\$38.21

**Tabla 5. 33.** Escenarios de secuenciamiento de tareas e indicadores económicos asociados

El impacto del secuenciamiento de tareas del proceso se puede ver reflejado también en la distribución del OpEx, en donde se logró reducir la predominancia de los costos fijos observada en la Figura 5.9 de 62.03% a 25.41%. La Tabla 5.34 muestra los montos reajustados del OpEx, mientras que la Figura 5.14 muestra el reajuste de los porcentajes asociados a cada concepto.

Concepto	Monto (US\$/año)
Costos fijos	\$5,314,642.33
Materias primas	\$12,358,771.50
Utilidades	\$286,436.91
Tratamiento de residuos	\$2,956,363.44
<b>OpEx (US\$/año)</b>	<b>\$20,916,214</b>

**Tabla 5. 34.** Estimación de los costos operativos asociados al proceso bajo estudio asumiendo una producción anual de 271 lotes



**Figura 5. 14.** Repartición porcentual de los costos operativos del proceso bajo estudio asumiendo una producción anual de 271 lotes

Un resumen de los costos anualizados se puede ver en la Tabla 5.35, en donde se observa un incremento en el costo de capital anualizado resultante de la inclusión de dos fermentadores principales adicionales y un incremento en el costo fijo de producción resultante de la inclusión de 13 trabajadores por turno en vez de los 11 inicialmente contemplados en la Tabla 5.26. Información adicional acerca de los cambios en el FCI, WC y en el costo fijo se pueden encontrar en el Anexo 8. Como es de esperarse, se observa un incremento sustancial en el costo variable que se correlaciona con un mayor número de lotes producidos al año.

Concepto	Monto
Inversión de capital fijo (\$)	\$21,387,716
Tiempo de vida del proyecto (años)	20
Tasa de interés de capital (%)	15%
Tasa de costo de capital anualizada (%)	16%
Costo de capital anualizado (\$/año)	\$3,416,932.99
Costo variable de producción (\$/año)	\$15,601,571.86
Costo fijo de producción (\$/año)	\$5,314,642
Producción de <i>cocktail</i> enzimático (L/año)	636850
Costo por unidad de <i>cocktail</i> enzimático (\$/L)	\$38.21

**Tabla 5. 35.** Ítems determinados para la estimación del costo reajustado por unidad de masa de enzimas asociado al caso optimizado del proceso bajo estudio

## 5.14. Análisis de rentabilidad del proyecto

### 5.14.1. Cálculo del precio mínimo de venta

Bajo las condiciones descritas en la Sección 4.9.1, se obtuvo un precio mínimo de venta de 42.64 US\$/L de *cocktail* para un escenario de tareas superpuestas con 3 fermentadores principales operando en paralelo. Esto se logró al calcular de manera iterativa un precio de venta que genere una tasa de interés de retorno (TIR) igual a la tasa de interés de capital empleada en la elaboración del análisis de flujo de caja (en este caso, 15%).

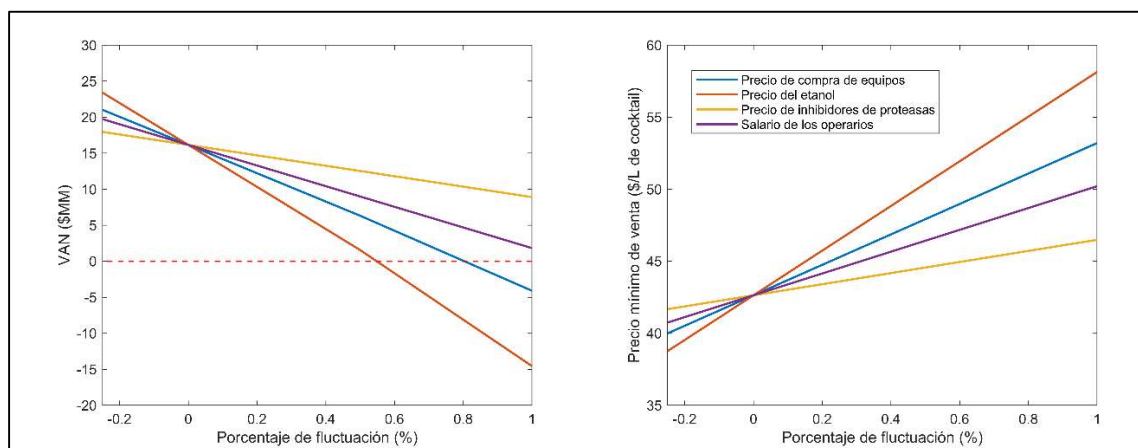
### 5.14.2. Cálculo de los índices de rentabilidad del proyecto

Bajo las condiciones descrita en la Sección 4.9.2 y fijando un precio de venta 20% por encima del precio mínimo de venta calculado (51.17 US\$/L de *cocktail*), se obtuvo un VAN de 16.16 US\$ MM y una TIR de 27.71%. De acuerdo con Longati *et al.* [3], la operación de un proceso acoplado a una planta de producción de etanol de primera y segunda generación debe tener una TIR mínima del 11% para que la propuesta sea considerada viable, por lo que se puede afirmar que el caso de mayor producción anual cumple con los criterios mínimos de economía de procesos asumiendo una operación acoplada a una planta de

producción de etanol 1G + 2G. Adicionalmente, es posible notar que la TIR obtenida para el caso de mayor producción anual es mayor al 15% de interés de capital asumido para el proyecto, por lo que es posible afirmar que el proceso bajo estudio es rentable en una etapa de diseño conceptual, y amerita ser estudiado a profundidad para atender una demanda objetivo a cubrir en el mercado interno de producción de etanol 2G en Brasil o en otros mercados con características similares.

### 5.14.3. Análisis de sensibilidad del proyecto

El análisis de sensibilidad del proyecto se realizó en base a los procedimientos establecidos en la Sección 4.9.3. Cuatro variables fueron seleccionadas: precio de compra de los equipos, precio por kilogramo del etanol, precio por mL del *cocktail* de inhibidores de proteasas y el salario por hora de los operarios. Los escenarios obtenidos se muestran en la Figura 5.15 para variaciones porcentuales discretas de -25%, 25% 50% y 100%.



**Figura 5.15.** Sensibilidad del valor actual neto y del precio mínimo de venta ante fluctuaciones de cuatro variables económicas



Los resultados del análisis demuestran que la rentabilidad del proyecto es volátil ante cambios en el precio de compra de los equipos y cambios en el precio del etanol, pudiendo llegar a ser inviable ante fluctuaciones de más del 50% en ambos casos. Por otro lado, variables como el precio del *cocktail* de inhibidores de proteasas y el salario por hora de los operarios no generaron escenarios de inviabilidad económica incluso ante incrementos extremos (100% del valor inicialmente contemplado en ambos casos). Es importante señalar que los cambios en el VAN se generaron asumiendo un escenario conservador de 20% de ganancia sobre el precio mínimo de venta. Para corroborar la validez de estos valores es necesario fijar un precio de venta acorde a las tendencias del mercado biotecnológico a atender, lo cual se encuentra fuera del alcance de esta tesis. Por consiguiente, se sugiere realizar un estudio de mercado al analizar el proyecto en la etapa de factibilidad.

### 5.15. Análisis de seguridad del proceso

A continuación, se presenta un análisis de seguridad del proceso bajo estudio basado en los indicadores de la metodología HAZID desarrollada por Germanischer Lloyd [61] descritos en la Sección 4.10. El análisis en cuestión se limita a los PFD de las distintas secciones del proceso que se muestran en las Figuras 5.1, 5.2 y 5.3.

La Tabla 5.36 muestra un extracto de la lista de peligros adaptada para el proceso bajo estudio.

Leyenda	Interpretación
TS	Sustancias tóxicas
GP	Gases a alta presión
HF	Fluidos calientes
DE	Equipos peligrosos
EG	Gases explosivos

**Tabla 5. 36.** Lista de peligros hallados en el proceso bajo estudio

En base a la leyenda mostrada en la Tabla 5.35 y a la matriz de análisis de riesgos desarrollada por el Departamento de Defensa de los Estados Unidos [62], se procedió a desarrollar la matriz HAZID mostrada en la Figura 5.16. Esta misma matriz se desarrolla en partes en el Anexo 10.

Equipo	Riesgo identificado	Causa	Evento	Consecuencia	Análisis de riesgos						Protecciones	
					Personas			Equipos			Protecciones técnicas	Protecciones organizacionales
					Probabilidad	Severidad	Riesgo	Probabilidad	Severidad	Riesgo		
HR - 102	TS - 1	Uso de una solución de hidróxido de sodio como agente hidrolítico.	Derrames. Fugas.	Daños por corrosión a los equipos. Lesiones incapacitantes.	C	II	6	C	III	11	Implementación de un sistema de control de nivel en el tanque HR - 102.	Mantenimientos preventivos periódicos. Capacitaciones sobre el uso correcto de EPP's a nivel del personal.
HR - 102	HF - 1	Calentamiento del tanque HR - 102 a 100 °C. Uso de aceite térmico a 200 °C como agente de calentamiento.	Fugas.	Lesiones incapacitantes por quemaduras. Muerte por quemaduras.	D	I	8	D	IV	19	Implementación de un sistema de control de nivel en el tanque HR - 102.	Mantenimientos preventivos periódicos. Capacitaciones sobre el uso correcto de EPP's a nivel del personal.
CF - 101, CF - 102, CF - 103, CF - 104	DE - 1	Rotación del tambor de las centrifugas a altas velocidades.	Eyección de partículas a alta velocidad. Inserción de extremidades en el tambor durante la operación del equipo.	Lesiones incapacitantes.	C	II	6	C	IV	18	Implementación de un sistema de control de actuador rotativo en las centrifugas CF - 101, CF - 102, CF - 103 y CF - 104.	Mantenimientos preventivos periódicos. Capacitaciones sobre el uso correcto de EPP's a nivel del personal.
SF - 101, SF - 102, SF - 103, SF - 104, TF - 101, TF - 102, TF - 103	EG - 1	Acumulación de gases de fermentación a altas presiones.	Explosión por sobrepresión.	Daños mecánicos a los equipos. Lesiones incapacitantes.	E	II	15	E	II	15	Uso de válvulas de alivio para permitir el escape de los gases. Instalación de interlocks de seguridad por sobrepresión acoplados a alarmas.	Mantenimientos preventivos periódicos. Capacitaciones sobre el uso correcto de EPP's a nivel del personal.
SF - 101, SF - 102, SF - 103, SF - 104, TF - 101, TF - 102, TF - 103	GP - 1	Uso de vapor saturado a 130 °C para la desinfección de los tanques de fermentación.	Explosión por sobrepresión.	Daños mecánicos a los equipos. Lesiones incapacitantes.	E	II	15	E	II	15	Implementación de un sistema de dosificación de vapor de desinfección en cada tanque de fermentación. Instalación de interlocks de seguridad por sobrepresión acoplados a alarmas.	Mantenimientos preventivos periódicos. Capacitaciones sobre el uso correcto de EPP's a nivel del personal.
SF - 101, SF - 102, SF - 103, SF - 104, TF - 101, TF - 102, TF - 103	TS - 2	Producción de dióxido de carbono durante la secreción de enzimas por fermentación sumergida.	Liberación de dióxido de carbono a las instalaciones de la sección de fermentación sumergida.	Muerte por asfixia.	E	I	12	E	IV	20	Uso de uniones bridadas en las vías de venteo. Implementación de un sistema de monitoreo de concentración de dióxido de carbono con un límite máximo admisible de 40 g/L al interior de las instalaciones.	Mantenimientos preventivos periódicos.
TK - 101, TK - 102, TK - 103, TK - 104	TS - 3	Uso de etanol enhiado para la precipitación de enzimas.	Derrames. Fugas.	Lesiones incapacitantes. Riesgo de incendio.	C	II	6	C	II	6	Implementación de un sistema de control de nivel en los tanques TK - 101, TK - 102, TK - 103 y TK - 104.	Mantenimientos preventivos periódicos. Capacitaciones sobre el uso correcto de EPP's a nivel del personal.

Figura 5. 16. Análisis de seguridad (HAZID) del proceso bajo estudio

La primera fuente de peligro identificada corresponde al reactor HR – 102, ya que este equipo emplea una solución al 1% en masa – volumen de hidróxido de sodio a 100 °C para llevar a cabo el proceso de deslignificación del bagazo pretratado por explosión de vapor y aceite térmico a 200 °C para llevar a cabo el calentamiento de la solución en cuestión. En caso de fugas y/o derrames por rebose, se pueden producir daños por corrosión a los equipos y lesiones incapacitantes en los trabajadores, que pueden incluso llegar a ocasionar la muerte del trabajador.

La segunda fuente de peligro identificada corresponde a las centrifugas CF – 101, CF – 102, CF – 103 y CF – 104, pues son equipos en donde ocurre una separación de tipo físico – mecánica basada en la rotación a altas velocidades de un tambor giratorio. Estos equipos pueden generar lesiones al expulsar partículas a altas velocidades y/o al ocurrir una introducción casual de extremidades por parte de los trabajadores.

La tercera fuente de peligro identificada corresponde a los fermentadores SF – 101, SF – 102, SF – 103, SF – 104, TF – 101, TF – 102 y TF – 103. En estos equipos se suministra vapor saturado a 130 °C para llevar a cabo la eliminación de patógenos durante los ciclos de limpieza de los tanques y se acumulan gases de fermentación que, además de producir un riesgo de explosión por exceso de presión, ponen en riesgo la salud de los trabajadores debido a los efectos nocivos del dióxido de carbono generado durante la fermentación en concentraciones mayores a 40 g/L, un escenario improbable pero factible en caso de una explosión o fuga de gases provenientes de la fermentación.

La cuarta y última fuente de peligro identificada corresponde a los tanques de precipitación de enzimas con etanol TK – 101, TK – 102, TK – 103 y TK – 104, pues la operación de estos equipos involucra el manejo de etanol anhidro, una sustancia volátil e inflamable que incrementa el riesgo de incendios y explosiones en las instalaciones de la sección de recuperación de enzimas.

Asimismo, el análisis integral del proceso no reveló riesgos significativos, pues a excepción de las etapas anteriormente descritas, se trabaja con soluciones cuyo pH, temperatura y composición deben ser favorables al crecimiento de microorganismos.

En cuanto al análisis de seguridad microbiológica de la sección de fermentación sumergida, Casson Moreno y Cozzani [83] sugieren ceñirse a la Directiva Europea 2000/54/CE para analizar el riesgo que representa un microorganismo en particular. Dicho documento no incluye a las especies de hongos filamentosos pertenecientes a la especie *Trichoderma harzianum*, por lo que en principio no fue necesario llevar a cabo un estudio adicional detallado de la seguridad microbiológica del proceso y se consideró pertinente mantener los lineamientos sugeridos por Shuler y Kargi [42], en donde se estipula que la biomasa residual debe ser incinerada para evitar la proliferación del microorganismo en instalaciones aledañas.

## CONCLUSIONES

1. La inspección de un caso típico de operación de una planta de producción de etanol 1G + 2G ubicada en la costa de Brasil descrito en la literatura permitió seleccionar una base de diseño de 0.749 toneladas de bagazo de caña de azúcar por lote para la producción de enzimas xilanolíticas. El valor de esta materia prima representa menos del 1% del bagazo de caña de azúcar producido por hora, por lo que se asume que no representa un cambio significativo en las condiciones de operación de la planta principal y hace factible la operación del proceso de producción del *cocktail* enzimático bajo estudio de forma acoplada.
2. El microorganismo seleccionado para el proceso de producción es la cepa P49P11 del hongo *Trichoderma harzianum*. Tras una evaluación del modelo cinético de producción enzimática propuesto por Gelain *et al.* [5], se seleccionó una estrategia de operación por lotes alimentados en el fermentador principal que logró reducir el consumo de pulpa de celulosa en un 66.66% en comparación a un escenario de operación por lotes convencional. Bajo esta estrategia, el 50% del total del sustrato (393.52 kg) se alimenta a un medio de cultivo con una concentración de 1 g/L de células para iniciar el proceso unitario, y el 50% restante se alimenta al cabo de 32 horas de iniciada la fermentación, instante en que ocurre un máximo local en la concentración de biomasa celular (2.54 g/L de células viables). El proceso unitario completo se lleva a cabo por 80.8 horas, tras lo cual se obtiene una actividad enzimática de xilanasas de 121872.12 U/L en un volumen total de 10 m<sup>3</sup> de caldo de fermentación por lote. Es importante resaltar que la validez del modelo es exclusiva para una temperatura de operación de 29 °C, un pH de 5, un porcentaje de oxígeno disuelto en el medio de 30% en masa - volumen y el uso de la pulpa de celulosa producida por la metodología desarrollada por Rocha *et al.* [31] como fuente de carbono para el metabolismo celular.

3. Se efectuó el diseño del proceso considerando 2 operaciones unitarias y 1 proceso unitario en la etapa de pretratamiento de materia prima, 5 procesos unitarios en la etapa de fermentación y 4 operaciones unitarias en la etapa de recuperación de enzimas por precipitación con etanol. Con un factor de concentración de proteínas de 85.2% y un factor de recuperación de actividad enzimática de xilanasas de 93.6%, el proceso en cuestión permite obtener  $2.35 \text{ m}^3$  de un *cocktail* con una actividad enzimática de xilanasas de 485670 U/L, valor idéntico al del *cocktail* Cellic HTec2 comercializado por Novozymes. Los equipos principales del proceso fueron dimensionados y diseñados en base a los balances de materia y energía, las especificaciones dadas por las metodologías experimentales tomadas como referencia para el escalamiento y los parámetros de operación de equipos reportados en la literatura técnica. Ello permitió la estimación de un CapEx de US\$ MM 18.21 y un OpEx de US\$ MM 7.06 por año para un proceso con una capacidad de producción base de 44 lotes por año y un costo unitario de producción de 92.21 US\$ por litro de *cocktail*.
4. La introducción de un reajuste en el esquema de secuenciamiento de tareas permitió incrementar la capacidad de producción del proceso, lo cual se tradujo en un incremento del tiempo útil de los equipos y en una reducción del costo unitario de producción del *cocktail* enzimático. Al incrementar la capacidad de producción del proceso de 44 lotes por año a 271 lotes por año, se logró reducir el costo unitario de producción desde US\$ 92.21 hasta US\$ 38.21 por litro de *cocktail*. Cabe añadir que el *E factor* del proceso fue reducido de 106.68 a 54.97 gracias a una combinación del empleo de una estrategia de alimentación por lotes reportado en la conclusión 2 y el reajuste en el esquema del secuenciamiento de tareas descrito líneas arriba.
5. El CapEx, OpEx y el precio mínimo de venta estimados para el escenario de máxima producción (271 lotes por año) fueron de US\$ MM 25.16, US\$ MM 20.92 por año y US\$ 42.64 por litro de *cocktail*, respectivamente. Asimismo, asumiendo una ganancia de 20% sobre el precio mínimo de venta para el escenario de máxima producción, se calculó un VAN de US\$ MM 16.16 y una TIR del 27.71% en un período de recuperación de la

inversión de 20 años. El valor calculado de la TIR es superior al 11% mínimo recomendado en la literatura técnica para la operación de cualquier proceso acoplado a una planta de etanol 1G + 2G y al 15% que respecta a la tasa de interés de capital considerada para el proyecto, lo que confirma que el proceso diseñado es técnica y económicamente viable.

6. El análisis HAZID del proceso reveló cuatro fuentes de peligro asociadas a la operación de los equipos del proceso. Los eventos identificados fueron la fuga y/o rebose de soluciones calientes, la expulsión de partículas a altas velocidades y/o la introducción casual de extremidades durante la operación de los equipos, la explosión por exceso de presión y/o la liberación de concentraciones elevadas de dióxido de carbono (valores superiores a 40 g/L) en las instalaciones del proceso y la ocurrencia de incendios y/o explosiones debido a la manipulación de etanol anhidro, respectivamente. Protecciones técnicas y organizacionales fueron propuestas para minimizar la ocurrencia de los eventos anteriormente descritos.

## RECOMENDACIONES

1. Si bien Gelain *et al.* [5] declaran que el modelo cinético que se desarrolló a partir de ensayos experimentales es válido para estrategias de alimentación discontinuas como la que se consideró en este trabajo, se recomienda llevar a cabo ensayos experimentales a escala piloto para validar la precisión del modelo cinético ante estos esquemas de alimentación. De demostrarse que la precisión es limitada, podría plantearse una investigación adicional cuyo objetivo sea el ajuste de los parámetros del modelo matemático o la introducción de variables adicionales que permitan un modelamiento más preciso de la cinética de *Trichoderma harzianum* P49P11 frente a alimentaciones discontinuas de sustrato.
2. A nivel de la formulación del *cocktail* enzimático, se recomienda llevar a cabo ensayos experimentales para determinar la cantidad óptima de *cocktail* de inhibidores de proteasas que puedan garantizar una preservación adecuada de las enzimas resuspendidas, de manera que sea posible conocer el tiempo de vida útil del producto formulado y refinar la precisión en la estimación de los costos de materias primas por lote de producto.
3. Se recomienda realizar un estudio de mercado en la etapa de factibilidad para determinar una demanda objetivo de enzimas xilanolíticas a atender y un precio de venta acorde a las tendencias del mercado, ya sea en el mercado interno de Brasil o en otros mercados como el de Estados Unidos. De esta forma se podrá evaluar hasta qué punto es factible incrementar la capacidad de producción del proceso por medio de la operación en paralelo de un número mayor de equipos que se discute en la Sección 5.11. En función del resultado obtenido se podrá evaluar también la posibilidad de reajustar la base de diseño para incrementar la capacidad individual de producción por lote del proceso.
4. Se recomienda evaluar el impacto económico del uso de las propias enzimas xilanolíticas producidas para mejorar el rendimiento de la hidrólisis enzimática en el proceso de



producción de etanol 2G. De esta forma, se podría eliminar la necesidad de adicionar excipientes al *cocktail* enzimático para su comercialización y, en su defecto, ser realimentado directamente a las instalaciones de la planta principal, lo que supondría un incremento en la productividad de etanol y una subsecuente reducción de los costos operativos de la planta principal.

## AGRADECIMIENTOS

1. A la Dra. Úrsula Fabiola Rodríguez Zúñiga, la asesora a cargo del desarrollo de esta tesis durante los años 2020 y 2021.
2. A la Universidad de Ingeniería y Tecnología por la iniciativa tomada al realizar el concurso “Tesis de pregrado 2020”, el cual tuvo como objetivo promover el espíritu científico entre los alumnos próximos a graduarse. Fue una sorpresa muy grata el haber recibido el primer lugar en la categoría “*Mejor plan de tesis 2020*” gracias a este trabajo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] GrandViewResearch, “Industrial Enzymes Market Size Worth \$9.63 Billion By 2024.” Accessed: Apr. 23, 2020. [Online]. Available: <https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-industrial-enzymes-market>
- [2] V. Juturu and J. C. Wu, “Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications,” *Biotechnology Advances*, vol. 30, no. 6, pp. 1219–1227, Nov. 2012, doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.11.006.
- [3] A. A. Longati, A. R. A. Lino, R. C. Giordano, F. F. Furlan, and A. J. G. Cruz, “Defining research & development process targets through retro-techno-economic analysis: The sugarcane biorefinery case,” *Bioresource Technology*, vol. 263, pp. 1–9, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.biortech.2018.04.102.
- [4] P. Bajaj and R. Mahajan, “Cellulase and xylanase synergism in industrial biotechnology,” *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 103, no. 21–22, pp. 8711–8724, Nov. 2019, doi: 10.1007/s00253-019-10146-0.
- [5] L. Gelain, J. G. da Cruz Pradella, and A. C. da Costa, “Mathematical modeling of enzyme production using *Trichoderma harzianum* P49P11 and sugarcane bagasse as carbon source,” *Bioresource Technology*, vol. 198, pp. 101–107, Dec. 2015, doi: 10.1016/j.biortech.2015.08.148.
- [6] M. A. Mariño, S. Freitas, and E. A. Miranda, “Ethanol Precipitation Of Glycosyl Hydrolases Produced By *Trichoderma harzianum* P49P11,” *Braz. J. Chem. Eng.*, vol. 32, no. 2, pp. 325–333, Jun. 2015, doi: 10.1590/0104-6632.20150322s00003268.
- [7] D. Klein-Marcuschamer, P. Oleskowicz-Popiel, B. A. Simmons, and H. W. Blanch, “The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 109, no. 4, pp. 1083–1087, Apr. 2012, doi: 10.1002/bit.24370.
- [8] R. da G. Ferreira, A. R. Azzoni, and S. Freitas, “Techno-economic analysis of the industrial production of a low-cost enzyme using *E. coli*: the case of recombinant  $\beta$ -glucosidase,” *Biotechnol Biofuels*, vol. 11, no. 1, p. 81, Dec. 2018, doi: 10.1186/s13068-018-1077-0.
- [9] P. Bajpai, *Xylanolytic enzymes*. Amsterdam: Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier, 2014.
- [10] P. Bajpai, “Structure of Lignocellulosic Biomass,” in *Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuel Production*, in SpringerBriefs in Molecular Science. , Singapore: Springer Singapore, 2016, pp. 7–12. doi: 10.1007/978-981-10-0687-6\_2.

- [11] F. L. Motta, C. C. P. Andrade, and M. H. A. Santana, "A Review of Xylanase Production by the Fermentation of Xylan: Classification, Characterization and Applications," in *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization*, A. Chandel, Ed., InTech, 2013. doi: 10.5772/53544.
- [12] M. J. Bailey, P. Biely, and K. Poutanen, "Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity," *Journal of Biotechnology*, vol. 23, no. 3, pp. 257–270, May 1992, doi: 10.1016/0168-1656(92)90074-J.
- [13] A. Knob, D. Fortkamp, T. Prolo, S. C. Izidoro, and J. M. Almeida, "Agro-residues as Alternative for Xylanase Production by Filamentous Fungi," p. 36, 2014.
- [14] K. Hofsetz and M. Silva, "Brazilian sugarcane bagasse: Energy and non-energy consumption," *Biomass and Bioenergy*, vol. 46, pp. 564–573, Nov. 2012, doi: 10.1016/j.biombioe.2012.06.038.
- [15] P. M. Doran, *Bioprocess engineering principles*, 2nd ed. Amsterdam; Boston: Elsevier/Academic Press, 2013.
- [16] N. Bhardwaj, B. Kumar, and P. Verma, "A detailed overview of xylanases: an emerging biomolecule for current and future prospective," *Bioresour. Bioprocess.*, vol. 6, no. 1, p. 40, Dec. 2019, doi: 10.1186/s40643-019-0276-2.
- [17] R. G. Harrison, P. Todd, S. R. Rudge, and D. P. Petrides, *Bioseparations science and engineering*, Second edition. Oxford: Oxford University Press, 2015.
- [18] A. Kundu, M. Karmakar, and R. R. Ray, "Simultaneous production of animal feed enzymes (endoxylanase and endoglucanase) by *Penicillium janthinellum* from waste jute caddies," *Int J Recycling Org Waste Agric*, vol. 1, no. 1, p. 13, 2012, doi: 10.1186/2251-7715-1-13.
- [19] P. da Silva Delabona, D. J. Lima, D. Robl, S. C. Rabelo, C. S. Farinas, and J. G. da Cruz Pradella, "Enhanced cellulase production by *Trichoderma harzianum* by cultivation on glycerol followed by induction on cellulosic substrates," *J Ind Microbiol Biotechnol*, vol. 43, no. 5, pp. 617–626, May 2016, doi: 10.1007/s10295-016-1744-8.
- [20] G. V. Gautério, L. G. G. da Silva, T. Hübner, T. da Rosa Ribeiro, and S. J. Kalil, "Maximization of xylanase production by *Aureobasidium pullulans* using a by-product of rice grain milling as xylan source," *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, vol. 23, p. 101511, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.bcab.2020.101511.
- [21] R. Biswas, V. Sahai, S. Mishra, and V. S. Bisaria, "Bioprocess strategies for enhanced production of xylanase by *Melanocarpus albomyces* IITD3A on agro-residual extract," *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 110, no. 6, pp. 702–708, Dec. 2010, doi: 10.1016/j.jbiosc.2010.07.013.

- [22] A. Knob, S. M. Beitel, D. Fortkamp, C. R. F. Terrasan, and A. F. de Almeida, "Production, Purification, and Characterization of a Major *Penicillium glabrum* Xylanase Using Brewer's Spent Grain as Substrate," *BioMed Research International*, vol. 2013, pp. 1–8, 2013, doi: 10.1155/2013/728735.
- [23] D. Fortkamp, and A. Knob, "High xylanase production by *Trichoderma viride* using pineapple peel as substrate and its application in pulp biobleaching," *Afr. J. Biotechnol.*, vol. 13, no. 22, pp. 2248–2259, May 2014, doi: 10.5897/AJB2013.13479.
- [24] G. Coman, "Modeling Process For Bioroduction Of Xylanase By *Streptomyces* Spp. P12-137 On Lignocelulloses Agro-Wastes," *The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati Fascicle IV - Food Technology*, 2012, pp. 49–57.
- [25] M. Z. Gong, R. Huang, J. L. Guo, H. S. Yu, J. Yao, and D. C. Gong, "Study on Process of Xylanase by Fed-Batch Fermentation," *AMM*, vol. 737, pp. 381–387, Mar. 2015, doi: 10.4028/www.scientific.net/AMM.737.381.
- [26] C. S. Farinas, L. M. Scarpelini, E. A. Miranda, and V. Bertucci Neto, "Evaluation of operational parameters on the precipitation of endoglucanase and xylanase produced by solid state fermentation of *Aspergillus niger*," *Braz. J. Chem. Eng.*, vol. 28, no. 1, pp. 17–26, Mar. 2011, doi: 10.1590/S0104-66322011000100003.
- [27] M. A. L. Costa, C. S. Farinas, and E. A. Miranda, "Ethanol Precipitation As A Downstream Processing Step For Concentration Of Xylanases Produced By Submerged And Solid-State Fermentation," *Braz. J. Chem. Eng.*, vol. 35, no. 2, pp. 477–488, Jun. 2018, doi: 10.1590/0104-6632.20180352s20160502.
- [28] V. Valtavirta, "Utilization of commercial batch process simulator for the process design of bio and pharmaceutical processes," Oct. 2016, Accessed: May 21, 2020. [Online]. Available: <https://aaltodoc.aalto.fi:443/handle/123456789/22822>
- [29] E. Papadaki, K. N. Kontogiannopoulos, A. N. Assimopoulou, and F. Th. Mantzouridou, "Feasibility of multi-hydrolytic enzymes production from optimized grape pomace residues and wheat bran mixture using *Aspergillus niger* in an integrated citric acid-enzymes production process," *Bioresource Technology*, vol. 309, p. 123317, Aug. 2020, doi: 10.1016/j.biortech.2020.123317.
- [30] J. M. D. Paye *et al.*, "Biological lignocellulose solubilization: comparative evaluation of biocatalysts and enhancement via cotreatment," *Biotechnol Biofuels*, vol. 9, no. 1, p. 8, Dec. 2016, doi: 10.1186/s13068-015-0412-y.
- [31] G. J. M. Rocha, A. R. Gonçalves, B. R. Oliveira, E. G. Olivares, and C. E. V. Rossell, "Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production," *Industrial Crops and Products*, vol. 35, no. 1, pp. 274–279, Jan. 2012, doi: 10.1016/j.indcrop.2011.07.010.

- [32] G. J. M. Rocha, C. Martín, V. F. N. da Silva, E. O. Gómez, and A. R. Gonçalves, “Mass balance of pilot-scale pretreatment of sugarcane bagasse by steam explosion followed by alkaline delignification,” *Bioresource Technology*, vol. 111, pp. 447–452, May 2012, doi: 10.1016/j.biortech.2012.02.005.
- [33] G. P. Towler and R. K. Sinnott, *Chemical Engineering Design: Principles, Practice, and Economics of Plant and Process Design*, 2nd ed. Boston, MA: Butterworth-Heinemann, 2013.
- [34] M. Cardoso, É. D. de Oliveira, and M. L. Passos, “Chemical composition and physical properties of black liquors and their effects on liquor recovery operation in Brazilian pulp mills,” *Fuel*, vol. 88, no. 4, pp. 756–763, Apr. 2009, doi: 10.1016/j.fuel.2008.10.016.
- [35] V. Uhl, *Mixing: Theory And Practice*, 1st ed., vol. 1, 3 vols. USA: Academic Press Inc., 1966.
- [36] Y. Lei, S. Liu, J. Li, and R. Sun, “Effect of hot-water extraction on alkaline pulping of bagasse,” *Biotechnology Advances*, vol. 28, no. 5, pp. 609–612, Sep. 2010, doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.05.009.
- [37] Perry and Green, *Perry’s Chemical Engineers’ Handbook*. New York: McGraw-Hill, 2008. Accessed: Oct. 26, 2020. [Online]. Available: <http://site.ebrary.com/id/10191917>
- [38] “High Flash Point Heat Transfer Oil | Duratherm HF,” Duratherm Fluids. Accessed: Apr. 18, 2021. [Online]. Available: <https://durathermfluids.com/products/duratherm-hf/>
- [39] J. D. Seader, E. J. Henley, and D. K. Roper, *Separation Process Principles: Chemical and Biochemical Operations*, 3rd ed. Hoboken, NJ: Wiley, 2011.
- [40] M. I. Rajoka, “Influence of various fermentation variables on exo-glucanase production in *Cellulomonas flavigena*,” *Electronic Journal of Biotechnology (Chile) Num.3 Vol.7*, vol. 7, Dec. 2004, doi: 10.2225/vol7-issue3-fulltext-2.
- [41] “Cellulase - Worthington Enzyme Manual.” Accessed: Dec. 05, 2020. [Online]. Available: <http://www.worthington-biochem.com/cel/default.html>
- [42] M. L. Shuler and F. Kargi, *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*, 2nd ed. in Prentice-Hall international series in the physical and chemical engineering sciences. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, 2002.
- [43] F. M. Cunha, “Liquefaction of sugarcane bagasse for enzyme production,” *Bioresource Technology*, p. 4, 2014.

- [44] “Excess Volumes of Ethanol + Water from Dortmund Data Bank.” Accessed: Oct. 26, 2020. [Online]. Available: <http://www.ddbst.com/en/EED/VE/VE0%20Ethanol%3BWater.php>
- [45] J. M. Smith, H. C. Van Ness, M. M. Abbott, and A. E. García Hernández, *Introducción a la termodinámica en ingeniería química*. México: McGraw-Hill, 2003.
- [46] I. S. Khattab, F. Bandarkar, M. A. A. Fakhree, and A. Jouyban, “Density, viscosity, and surface tension of water+ethanol mixtures from 293 to 323K,” *Korean J. Chem. Eng.*, vol. 29, no. 6, pp. 812–817, Jun. 2012, doi: 10.1007/s11814-011-0239-6.
- [47] J. A. Boyne and A. G. Williamson, “Enthalpies of Mixing of Ethanol and Water at 25OC.,” p. 1.
- [48] M. Yang, X. Liu, J. A. Howell, and H. Cheng, “Analysis and estimation/prediction of the disk stack centrifuge separation performance – Scaling from benchtop fixed rotor type to disk stack centrifuges,” p. 8.
- [49] W. W.-F. Leung, *Centrifugal Separations in Biotechnology*. Amsterdam ; Boston: Elsevier/Academic Press, 2007.
- [50] Alfa Laval, “PX 100 & PX 100EX Centrifuges Datasheet.” [Online]. Available: <https://www.alfalaval.com/products/separation/centrifugal-separators/separators/px/>
- [51] C. Oniscu, “Modeling of mixing in stirred bioreactors 2. Mixing time for non-aerated broths,” *Biochemical Engineering Journal*, p. 9, 2002.
- [52] S. E. Manahan, “Green Chemistry and the Ten Commandments of Sustainability”.
- [53] “2020 CEPCI Updates: February (prelim.) and January (final) - Chemical Engineering | Page 1.” Accessed: Jul. 10, 2020. [Online]. Available: <https://www.chemengonline.com/2020-cepci-updates-february-prelim-and-january-final/>
- [54] “A/S Biotehniskais Centrs – Bioreactors.net | Biotehniskais Centrs develops and manufactures laboratory and pilot scale bioreactors.” Accessed: Dec. 05, 2020. [Online]. Available: <https://bioreactors.net/>
- [55] M. S. Peters, K. D. Timmerhaus, and R. E. West, *Plant Design and Economics for Chemical Engineers*, 5th ed. in McGraw-Hill chemical engineering series. New York: McGraw-Hill, 2003.
- [56] World Nuclear Association, “Heat Values Of Various Fuels.” Accessed: Mar. 31, 2024. [Online]. Available: <https://world-nuclear.org/information-library/facts-and-figures/heat-values-of-various-fuels.aspx>

- [57] J. F. O. Granjo, D. S. Nunes, B. P. M. Duarte, and N. M. C. Oliveira, "A comparison of process alternatives for energy-efficient bioethanol downstream processing," *Separation and Purification Technology*, vol. 238, p. 116414, May 2020, doi: 10.1016/j.seppur.2019.116414.
- [58] International Committee of the Red Cross, "Medical Waste Management Reference." [Online]. Available: <https://www.icrc.org/en/doc/assets/files/publications/icrc-002-4032.pdf>
- [59] R. Smith, *Chemical Process Design and Integration*, 2nd ed. Wiley.
- [60] Tiemen Schuijbroek, "matlab-simple-gantt." Accessed: Jul. 09, 2021. [Online]. Available: <https://github.com/TiemenSch>
- [61] "Germanischer Lloyd rules and guidelines," DNV. Accessed: Jul. 19, 2021. [Online]. Available: <https://www.dnv.com/Default>
- [62] D. Ristic, "A TOOL FOR RISK ASSESSMENT," *Safety Engineering*, vol. 3, Dec. 2013, doi: 10.7562/SE2013.3.03.03.
- [63] "Excess Heat Capacities of Ethanol + Water from Dortmund Data Bank." Accessed: Oct. 26, 2020. [Online]. Available: <http://www.ddbst.com/en/EED/CPE/CPE0%20Ethanol%3BWater.php>
- [64] "Antibodies, Protein, ELISA Kits, Clone and Reagents for Life Science- Cusabio." Accessed: Oct. 26, 2020. [Online]. Available: <https://www.cusabio.com/>
- [65] D. E. Garrett, *Chemical Engineering Economics*. Place of publication not identified: Springer, 1989.
- [66] "EUR to USD Exchange Rate," Bloomberg.com. Accessed: Dec. 05, 2020. [Online]. Available: <https://www.bloomberg.com/quote/EURUSD:CUR>
- [67] W. M. Vatauvuk, "Updating the CE Plant Cost Index," pp. 62–70, 2002.
- [68] "Tianjin Chengyuan Chemical Co., Ltd. - Caustic Soda, Sodium Bicarbonate." Accessed: Dec. 15, 2020. [Online]. Available: <https://chengyuanchem.en.alibaba.com/?spm=a2700.details.cordpanyb.4.5a2f5d1b3eSmMu>
- [69] "Angel Yeast Co., Ltd. - Yeast, Yeast Extract." Accessed: Dec. 15, 2020. [Online]. Available: [https://ferment.en.alibaba.com/?spm=a2700.md\\_es\\_ES.cordpanyb.4.1c5a6d77SUij4o](https://ferment.en.alibaba.com/?spm=a2700.md_es_ES.cordpanyb.4.1c5a6d77SUij4o)



- [70] “Chemfine International Co., Ltd. - Antioxidants, Bleach.” Accessed: Dec. 15, 2020. [Online]. Available: [https://chemfine-group.en.alibaba.com/?spm=a2700.md\\_es\\_ES.cordpanyb.4.6e09635b2W9hxc](https://chemfine-group.en.alibaba.com/?spm=a2700.md_es_ES.cordpanyb.4.6e09635b2W9hxc)
- [71] “Lianyungang Dongtai Food Ingredients Co., Ltd. - Calcium Hydrogen Phosphate, Monocalcium Phosphate.” Accessed: Dec. 15, 2020. [Online]. Available: [https://lygtaida.en.alibaba.com/es\\_ES/?spm=a2700.md\\_es\\_ES.cordpanyb.4.306d1b43uOKCNV](https://lygtaida.en.alibaba.com/es_ES/?spm=a2700.md_es_ES.cordpanyb.4.306d1b43uOKCNV)
- [72] “HAIHANG INDUSTRY CO.,LTD. - Organic Intermediate, Pharmaceutical.” Accessed: Dec. 15, 2020. [Online]. Available: [https://haihangindustry.en.alibaba.com/?spm=a2700.md\\_es\\_ES.cordpanyb.4.168b42b6CEjUWy](https://haihangindustry.en.alibaba.com/?spm=a2700.md_es_ES.cordpanyb.4.168b42b6CEjUWy)
- [73] “Shandong New Blue Environmental Protection & Technology Co., Ltd. - adblue equipment, adblue.” Accessed: Dec. 15, 2020. [Online]. Available: [https://newblue.en.alibaba.com/?spm=a2700.md\\_es\\_ES.cordpanyb.2.76576f541fxW6r](https://newblue.en.alibaba.com/?spm=a2700.md_es_ES.cordpanyb.2.76576f541fxW6r)
- [74] “Richin International Trade(Dalian) Co., Ltd. - Magnesium Sulphate, Magnesium Oxide.” Accessed: Dec. 15, 2020. [Online]. Available: [https://richase.en.alibaba.com/?spm=a2700.md\\_es\\_ES.cordpanyb.4.530b454eFNRwIm](https://richase.en.alibaba.com/?spm=a2700.md_es_ES.cordpanyb.4.530b454eFNRwIm)
- [75] “Nanjing Jiayi Sunway Chemical Co., Ltd. - Sulfate, Water Treatment Agent.” Accessed: Dec. 15, 2020. [Online]. Available: [https://njsunway.en.alibaba.com/?spm=a2700.md\\_es\\_ES.cordpanyb.4.c1a0626axUIYaY](https://njsunway.en.alibaba.com/?spm=a2700.md_es_ES.cordpanyb.4.c1a0626axUIYaY)
- [76] “Lianyungang Zhonghong Chemical Co., Ltd. - beta tricalcium phosphate, magnesium chloride,” Alibaba.com. Accessed: Dec. 15, 2020. [Online]. Available: <https://cnlygzha.en.alibaba.com/>
- [77] “Shandong Haoyao New Materials Co., Ltd. - Paraffin, Rosin.” Accessed: Dec. 15, 2020. [Online]. Available: [https://haoyaonewmaterial.en.alibaba.com/?spm=a2700.md\\_es\\_ES.cordpanyb.4.4c4fd22Dpi7Ia](https://haoyaonewmaterial.en.alibaba.com/?spm=a2700.md_es_ES.cordpanyb.4.4c4fd22Dpi7Ia)
- [78] “Ethanol | 2005-2020 Data | 2021-2022 Forecast | Price | Quote | Chart | Historical.” Accessed: Dec. 15, 2020. [Online]. Available: <https://tradingeconomics.com/commodity/ethanol>
- [79] “Aurora Industry Co., Ltd. - Soya Lecithin, Sorbitol Liquid.” Accessed: Dec. 15, 2020. [Online]. Available: <https://auco.en.alibaba.com/?spm=a2700.details.cordpanyb.4.4d234041xGASu2>

- [80] “Inner Mongolia Pulisi Chemical Co., Ltd. - Ethanol, IPA.” Accessed: Dec. 15, 2020. [Online]. Available: <https://pulisichemical1.en.alibaba.com/?spm=a2700.details.cordpanyb.4.233164fclCv4Ff>
- [81] “Protease Inhibitor Cocktail for Fungal and Yeast Extracts DMSO Solution Sigma-Aldrich.” Accessed: Mar. 31, 2024. [Online]. Available: <http://www.sigmaaldrich.com/>
- [82] P. De Jong, E. Andrade Torres, S. A. Beisl Vieira De Melo, D. Mendes-Santana, and K. Valverde Pontes, “Socio-economic and environmental aspects of bio-LPG and bio-dimethyl ether (Bio-DME) production and usage in developing countries: The case of Brazil,” *Cleaner and Circular Bioeconomy*, vol. 6, p. 100055, Dec. 2023, doi: 10.1016/j.clcb.2023.100055.
- [83] V. Casson Moreno and V. Cozzani, “Integrated hazard identification within the risk management of industrial biological processes,” *Safety Science*, vol. 103, pp. 340–351, Mar. 2018, doi: 10.1016/j.ssci.2017.12.004.

# **ANEXOS**

## Anexo 1: Parámetros del modelo cinético propuesto por Coman

Fuente: adaptado de [24]

Parámetro	Unidades de medición	Valor numérico
$X_r$	$g L^{-1}$	-
$D$	$h^{-1}$	-
$Y$	-	0.7
$S_{in}$	$g L^{-1}$	0.005
$k_o$	$mg g^{-1}$	0.5
$\alpha$	-	0.018
$W$	$h^{-1}$	60
$DO_{max}$	$mg L^{-1}$	10
$q_P$	$h^{-1}$	0.00675
$\mu_{max}$	$h^{-1}$	0.15
$k_S$	$g L^{-1}$	-
$k_{DO}$	$mg L^{-1}$	2

**Anexo 2: Parámetros del modelo cinético propuesto por Gong *et al.***

**Fuente: extracto de [25]**

<b>Parámetro</b>	<b>Unidades de medición</b>	<b>Valor numérico</b>
$X_o$	$g L^{-1}$	1.39715
$X_m$	$g L^{-1}$	16.74972
$\mu_m$	$h^{-1}$	0.14353
$\alpha$	—	241.14265
$\beta$	$h^{-1}$	0.71826
$P_o$	$g L^{-1}$	-2654.1619
$S_o$	$g L^{-1}$	47.5674
$Y_{X/S}$	—	$2.32421 \times 10^{14}$
$Y_{P/S}$	—	228.11796
$m$	$h^{-1}$	0.00876

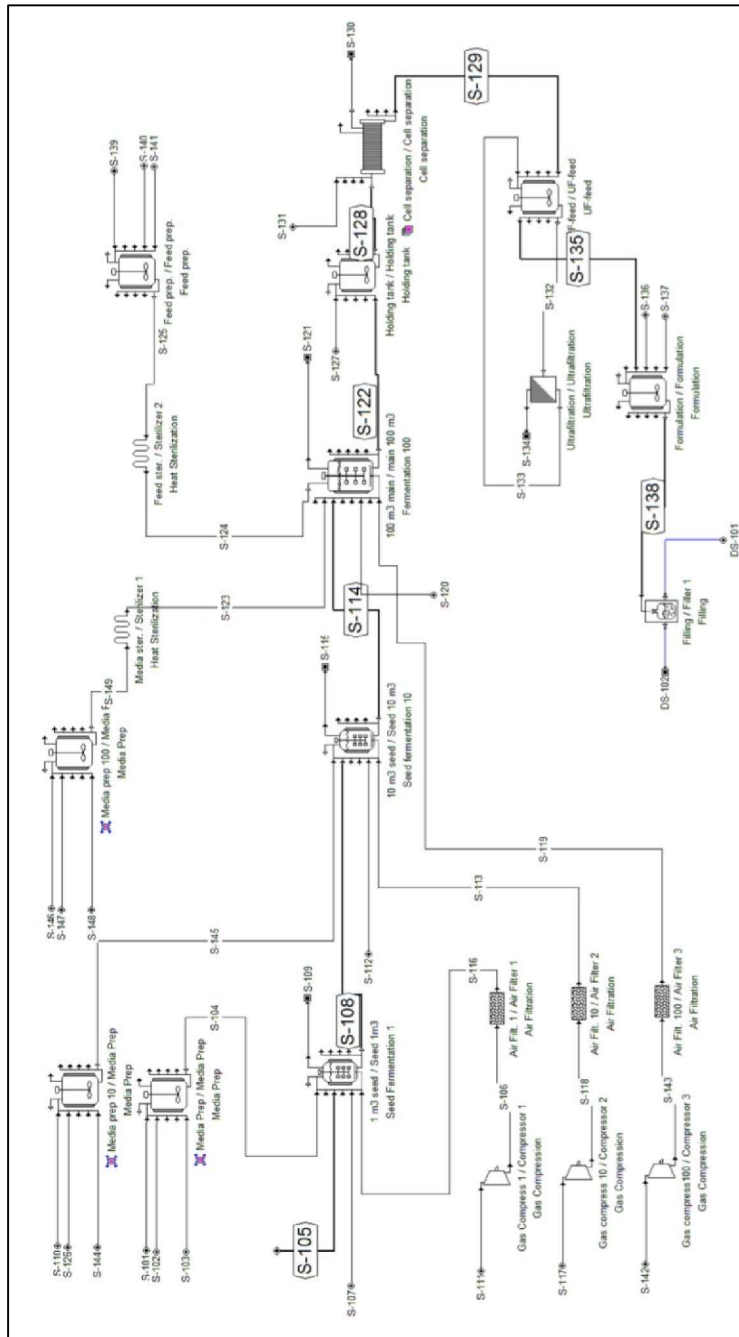
**Anexo 3: Parámetros del modelo cinético propuesto por Gelain  
*et al.***

**Fuente: extracto de [5]**

Parámetro	Unidades de medición	Valor numérico
$\mu_m$	$h^{-1}$	0.2
$k_S$	$g L^{-1}$	0.83
$X_m$	$g L^{-1}$	40
$r$	—	0.6
$\mu_{md}$	$h^{-1}$	0.18
$k_{Sd}$	$g L^{-1}$	0.47
$T_L$	$h$	14.4
$q_S$	$h^{-1}$	-0.027
$m_{xy}$	$U g^{-1}h^{-1}$	565.37
$Xy_m$	$U L^{-1}$	131240.7
$p$	—	0.44
$k_{XyS}$	$h L g^{-1}$	28.59
$k_{iXy}$	$g L^{-1}$	2.16
$k_{Xy_d}$	$h^{-1}$	0.014

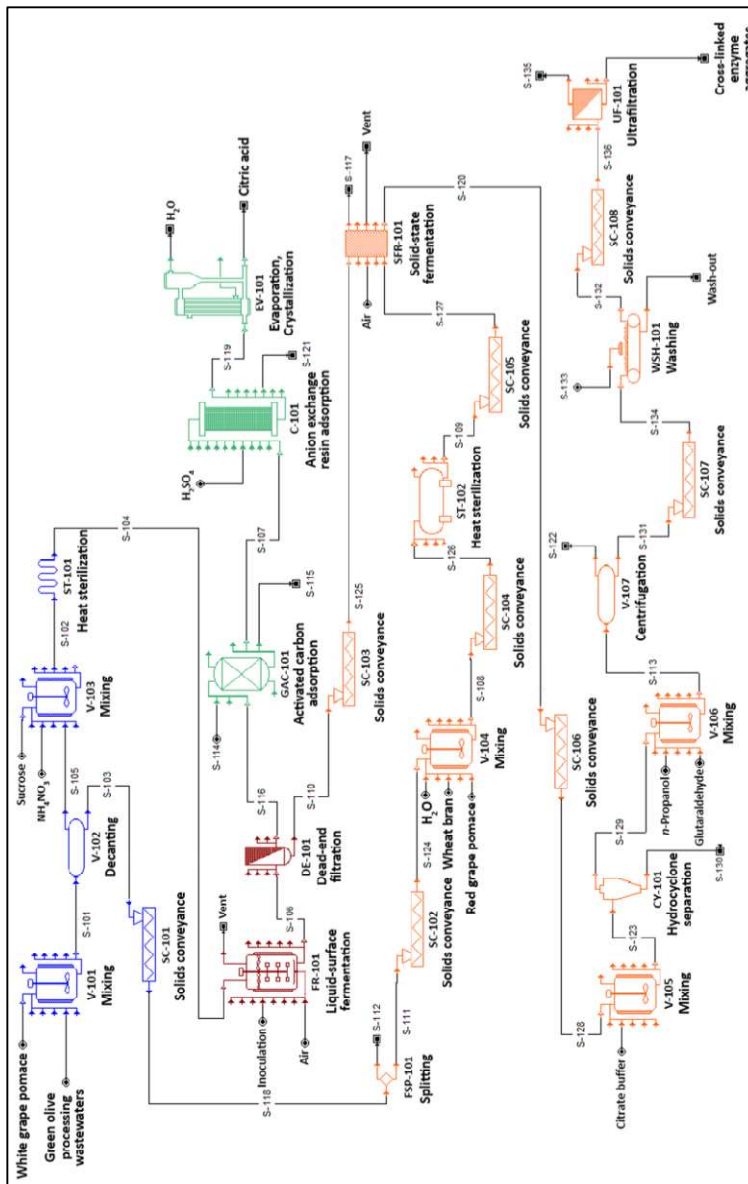
# Anexo 4: PFD del proceso de producción por lotes de enzimas xilanolíticas propuesto por Valtavirta

Fuente: extracto de [28]



# Anexo 5: PFD del proceso de producción de múltiples enzimas hidrolíticas acoplado a la producción de ácido cítrico propuesto por Papadaki *et al.*

Fuente: extracto de [29]





## Anexo 6: Código de MATLAB empleado para la resolución del modelo matemático de producción enzimática

Fuente: elaboración propia

```
%Declaración de variables numéricas
um = 0.2;
Ks = 0.83;
Xm = 40;
r = 0.6;
umd = 0.18;
Ksd = 0.47;
TL = 14.4;
qs = -0.027;
mXy = 565.37;
Xym = 131240.7;
p = 0.44;
KXys = 28.59;
KiXy = 2.16;
KXyd = 0.014;

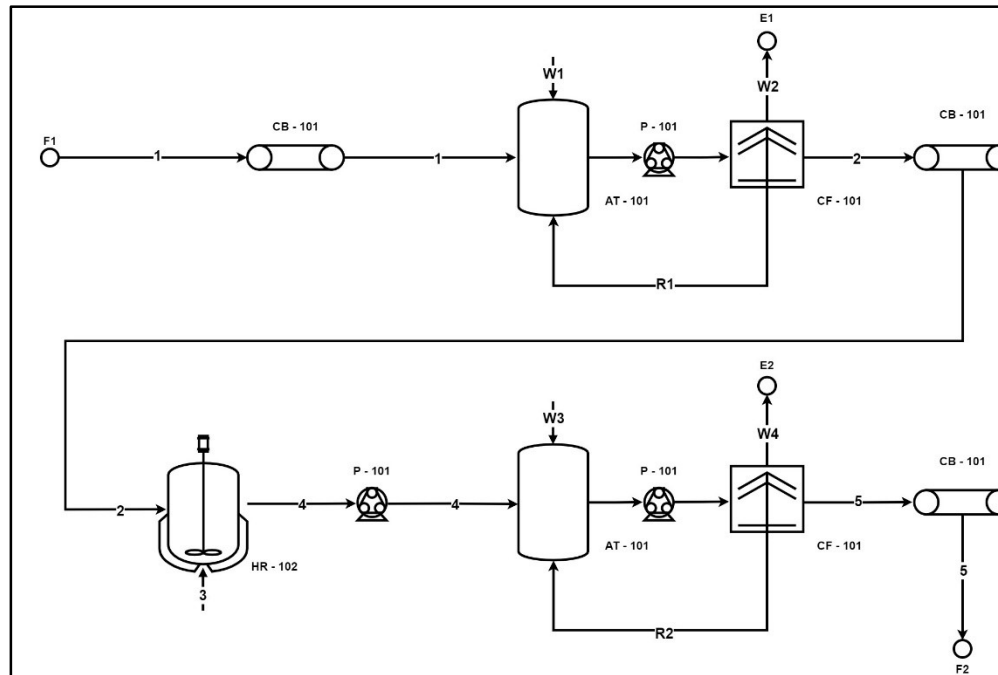
%Solución de las ODE's
syms S(t) Xy(t) X(t) f(t) t Y
f(t) = (1-exp(-t/TL));
eqns = [diff(S(t),t) == f(t)*qs*S(t), diff(Xy(t),t) == f(t)*mXy*X(t)*((1-
Xy(t)/Xym)^p)*(-KXys*f(t)*qs*S(t))*(1/(1+S(t)/KiXy))-
Xy(t)*KXyd,diff(X(t),t) == (um*(S(t)/(Ks+S(t)))*((1-X(t)/Xm)^r)-
f(t)*umd*(S(t)/(Ksd+S(t))))*X(t)];
[VF,Subs] = odeToVectorField(eqns)
odefcn = matlabFunction(VF, 'Vars', {t,Y})
tspan = [0:0.1:200];
ic = [0 34.72 5.5];
[T,XYZ] = ode45(@(t,Y)odefcn(t,Y), tspan, ic);

%Elaboración de las gráficas
figure
for k = 1:size(XYZ,2)
    subplot(size(XYZ,2),1,k)
    plot(T,XYZ(:,k))
    grid
    title(string(Subs(k)))
end
```

## Anexo 7: Balance de materia del proceso bajo estudio

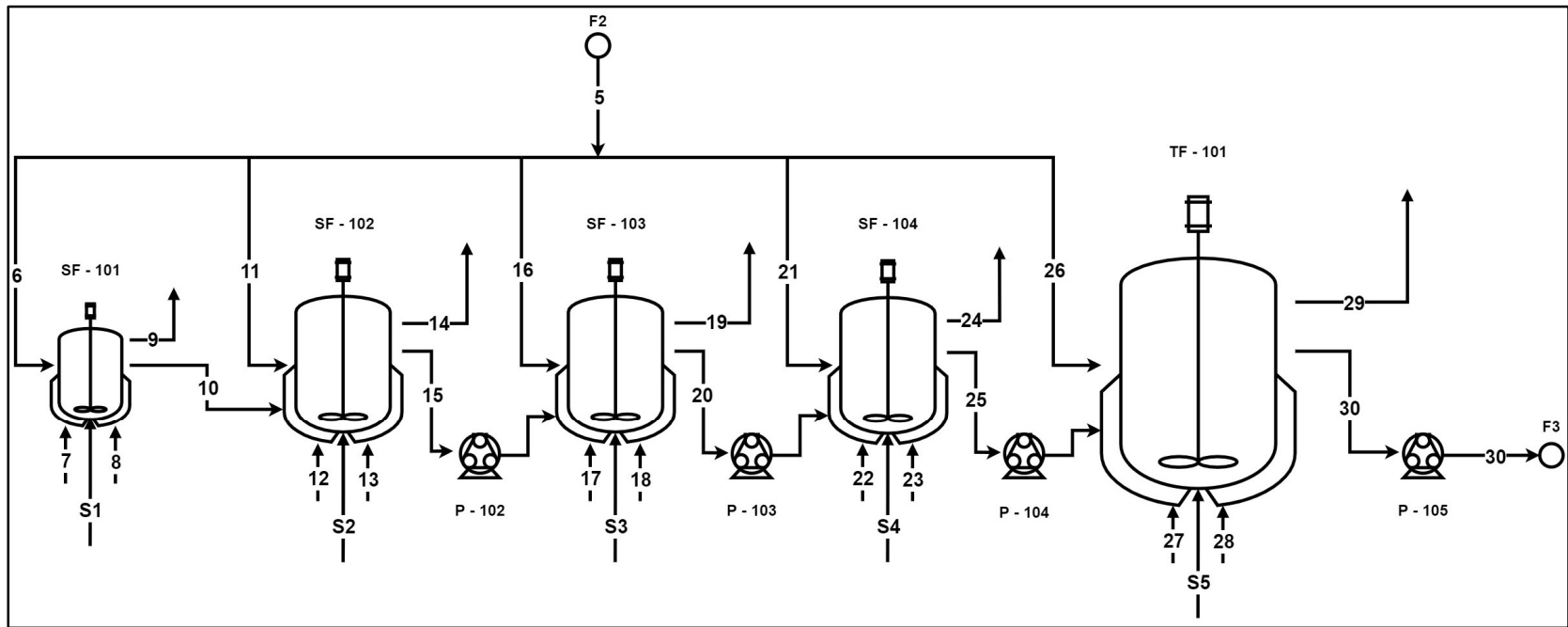
Fuente: elaboración propia

### Sección de pretratamiento del bagazo de caña



<b>Materia prima (kg/lote)</b>	<b>1</b>	<b>W1</b>	<b>W2</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>W3</b>	<b>W4</b>	<b>5</b>
Bagazo de caña	621.76	-	-	621.76	-	501.76	-	-	501.76
Celulosa	375.23	-	-	375.23	-	374.16	-	-	374.16
Hemicelulosa	142.63	-	-	142.63	-	110.54	-	-	110.54
Lignina	16.35	-	-	16.35	-	5.12	-	-	5.12
Agua	80.58	-	-	80.58	-	7.78	-	-	7.78
Otros compuestos	6.96	-	-	6.96	-	4.21	-	-	4.21
Agua	-	22433.63	22433.63	-	5966.45	5966.45	44867.25	44867.25	-
Hidróxido de sodio	-	-	-	-	60.27	60.27	-	-	-
Compuestos solubilizados	127.80	-	127.80	-	-	118.88	-	118.88	-
Celulosa	18.70	-	18.70	-	-	32.09	-	32.09	-
Hemicelulosa	77.98	-	77.98	-	-	11.23	-	11.23	-
Lignina	5.14	-	5.14	-	-	72.80	-	72.80	-
Otros compuestos	25.98	-	25.98	-	-	2.75	-	2.75	-
Temperatura (°C)	25	25	25	25	100	100	-	-	25
pH	-	-	-	7.00	13.4	13.4	-	-	-

# Sección de fermentación



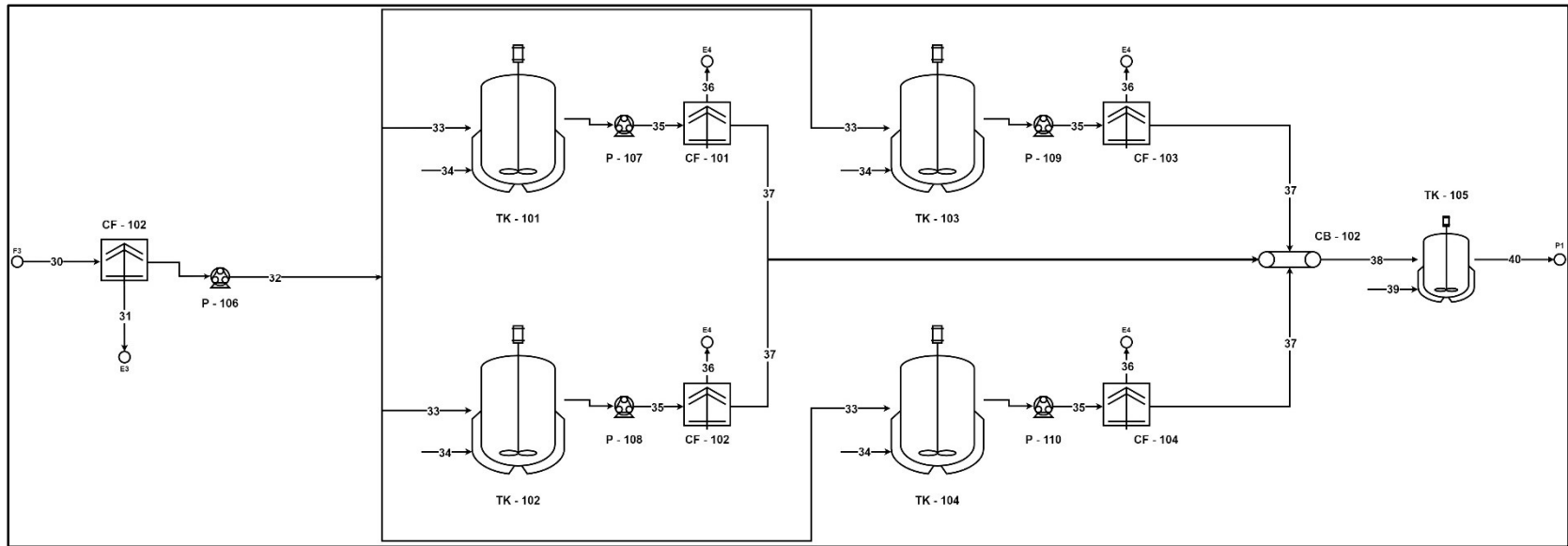
Materia prima (kg/lote)	6	7	8	9	10	S1	11	12	13	14	15	S2	16	17	18
Células	-	-	0.057	-	0.208	-	-	-	-	-	0.756	-	-	-	-
Bagazo de caña pretratado	1.636	-	-	-	-	-	5.95	-	-	-	-	-	21.64	-	-
Agua	-	-	10.37	-	10.37	-	-	-	27.33	-	37.70	-	-	-	99.39
Nutrientes del medio de cultivo	-	-	0.014608	-	0.015	-	-	-	0.053119	-	0.053	-	-	-	0.193160
Peptona	-	-	0.003466	-	0.003	-	-	-	0.012603	-	0.013	-	-	-	0.045829
Tween 80	-	-	0.003674	-	0.004	-	-	-	0.013359	-	0.013	-	-	-	0.048579
Bifosfato de potasio	-	-	0.003466	-	0.003	-	-	-	0.012603	-	0.013	-	-	-	0.045829
Sulfato de amonio	-	-	0.002426	-	0.002	-	-	-	0.008822	-	0.009	-	-	-	0.032079
Urea	-	-	0.000520	-	0.001	-	-	-	0.001891	-	0.002	-	-	-	0.006875
Sulfato de magnesio	-	-	0.000520	-	0.001	-	-	-	0.001891	-	0.002	-	-	-	0.006875
Cloruro de calcio	-	-	0.000520	-	0.001	-	-	-	0.001891	-	0.002	-	-	-	0.006875
Sulfato ferroso heptahidratado	-	-	0.0000083	-	0.0000083	-	-	-	0.000030	-	0.000030	-	-	-	0.000110
Sulfato de zinc heptahidratado	-	-	0.0000021	-	0.0000021	-	-	-	0.000008	-	0.000008	-	-	-	0.000028
Sulfato de manganeso heptahidratado	-	-	0.0000031	-	0.0000031	-	-	-	0.000011	-	0.000011	-	-	-	0.000041
Cloruro de cobalto	-	-	0.0000031	-	0.0000031	-	-	-	0.000011	-	0.000011	-	-	-	0.000041
Aire	-	a1	-	-	-	-	-	a2	-	-	-	-	-	a3	-
Oxígeno	-	b1	-	-	-	-	-	b2	-	-	-	-	-	b3	-
Nitrógeno	-	c1	-	-	-	-	-	c2	-	-	-	-	-	c3	-
Dióxido de carbono	-	-	-	d1	-	-	-	-	-	d2	-	-	-	-	-
Proteínas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vapor saturado a 130 °C	-	-	-	-	-	0.009	-	-	-	-	-	0.034	-	-	-
Temperatura (°C)	25	25	25	25	25	130	25	25	25	25	25	130	25	25	25
pH	5	5	5	5	5	-	5	5	5	5	5	-	5	5	5

*Cantidades expresadas en kg/lote. a: cantidad de aire requerida para mantener la concentración de oxígeno disuelto en 30%; b: cantidad de oxígeno correspondiente a una masa "a" de aire; c: cantidad de nitrógeno correspondiente a una masa "a" de aire; d: cantidad de dióxido de carbono producida durante la fermentación.*

Materia prima (kg/lote)	19	20	S3	21	22	23	24	25	S4	26	27	28	29	30	S5
Células	-	2.75	-	-	-	-	-	10.00	-	-	-	-	-	26.70	-
Bagazo de caña pretratado	-	-	-	78.70	-	-	-	-	-	393.52	-	-	-	108.60	-
Agua	-	137.09	-	-	-	361.43	-	498.53	-	-	-	9471.98	-	9970.50	-
Nutrientes del medio de cultivo	-	0.193	-	-	-	0.70240	-	0.702	-	-	-	14.05	-	-	-
Peptona	-	0.046	-	-	-	0.16665	-	0.167	-	-	-	3.333	-	-	-
Tween 80	-	0.049	-	-	-	0.17665	-	0.177	-	-	-	3.533	-	-	-
Bifosfato de potasio	-	0.046	-	-	-	0.16665	-	0.167	-	-	-	3.333	-	-	-
Sulfato de amonio	-	0.032	-	-	-	0.11665	-	0.117	-	-	-	2.333	-	-	-
Urea	-	0.007	-	-	-	0.02500	-	0.025	-	-	-	0.500	-	-	-
Sulfato de magnesio	-	0.007	-	-	-	0.02500	-	0.025	-	-	-	0.500	-	-	-
Cloruro de calcio	-	0.007	-	-	-	0.02500	-	0.02500	-	-	-	0.500	-	-	-
Sulfato ferroso heptahidratado	-	0.000110	-	-	-	0.00040	-	0.00040	-	-	-	0.008	-	-	-
Sulfato de zinc heptahidratado	-	0.000028	-	-	-	0.00010	-	0.00010	-	-	-	0.002	-	-	-
Sulfato de manganeso heptahidratado	-	0.000041	-	-	-	0.00015	-	0.00015	-	-	-	0.003	-	-	-
Cloruro de cobalto	-	0.000041	-	-	-	0.00015	-	0.00015	-	-	-	0.003	-	-	-
Aire	-	-	-	-	a4	-	-	-	-	-	a5	-	-	-	-
Oxígeno	-	-	-	-	b4	-	-	-	-	-	b5	-	-	-	-
Nitrógeno	-	-	-	-	c4	-	-	-	-	-	c5	-	-	-	-
Dióxido de carbono	d3	-	-	-	-	-	d4	-	-	-	-	-	d5	-	-
Proteínas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	41.73	-
Vapor saturado a 130 °C	-	-	0.123	-	-	-	-	-	0.446	-	-	-	-	-	8.91
Temperatura (°C)	25	25	130	25	25	25	25	25	130	25	25	25	25	25	130
pH	5	5	-	5	5	5	5	5	-	5	5	5	5	5	-

*Cantidades expresadas en kg/lote. a: cantidad de aire requerida para mantener la concentración de oxígeno disuelto en 30%; b: cantidad de oxígeno correspondiente a una masa "a" de aire; c: cantidad de nitrógeno correspondiente a una masa "a" de aire; d: cantidad de dióxido de carbono producida durante la fermentación.*

# Sección de recuperación de enzimas



Materia prima (kg/lote)	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Células	26.70	26.70	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bagazo de caña pretratado	108.60	108.60	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Agua	9970.50	-	9970.50	2492.63	-	2492.63	2492.63	-	-	2775.58	2775.58
Nutrientes del medio de cultivo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Peptona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tween 80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bifosfato de potasio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfato de amonio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfato de magnesio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cloruro de calcio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfato ferroso heptahidratado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfato de zinc heptahidratado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfato de manganeso heptahidratado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cloruro de cobalto	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Proteínas	41.73	-	41.73	10.43	-	10.43	1.544	8.89	35.55	-	35.554
Etanol	-	-	-	-	17662.50	17662.50	17662.50	-	-	-	-
Solución buffer de citrato 0.05 M a pH 4.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2805.60	2805.60
Citrato de sodio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11.36	11.36
Ácido cítrico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18.66	18.66
Excipientes	-	-	-	-	-	-	-	-	-	e	e
Temperatura (°C)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
pH	5	5	5	5	5	5	5	-	4.8	4.8	4.8

*Cantidades expresadas en kg/lote. e: cantidad de masa de cocktail de inhibidores de proteasas correspondiente a una dosis de 1 mL por 20 g de biomasa celular.*



**Anexo 8: Reajuste de los costos del proceso en función de las distintas capacidades de producción determinadas**

**Fuente: elaboración propia**

<b>Estrategia de secuenciamiento de tareas</b>	<b>Capacidad de producción</b>	<b>Precio de compra de equipos (PC) (US\$)</b>	<b>FCI / WC (US\$)</b>	<b>Número de trabajadores</b>	<b>Costo fijo (US\$/año)</b>
Escenario conservador	44	\$2,224,918	\$15,474,752.94 / \$2,730,839	11	\$4,380,622
Tareas superpuestas	91	\$2,224,918	\$15,474,752.94 / \$2,730,839	11	\$4,380,622
Tareas superpuestas y un fermentador principal extra	181	\$2,649,993	\$18,431,235 / \$3,252,571	12	\$4,847,632
Tareas superpuestas y dos fermentadores principales extras	271	\$3,075,068.47	\$21,387,716 / \$3,774,303	13	\$5,314,642

## Anexo 9: Análisis de flujo de caja del proyecto

Fuente: elaboración propia

Año	CapEx (SMM)	Ingresos (SMM)	OpEx (SMM)	Ganancia neta (SMM)	Depreciación (SMM)	Ingresos gravables (SMM)	Impuestos pagados por año (SMM)	Flujo de caja anual (SMM)	Factor de descuento	Valor actual del flujo de caja anual (SMM)	Valor actual neto (SMM)
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	8.56	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-8.56	0.87	-7.44	-7.44
2	12.83	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-12.83	0.76	-9.70	-17.14
3	3.77	16.29	13.12	3.18	4.28	0.00	0.00	-0.60	0.66	-0.39	-17.54
4	0.00	32.58	20.92	11.67	6.84	4.82	1.64	10.03	0.57	5.73	-11.80
5	0.00	32.58	20.92	11.67	4.11	7.56	2.57	9.10	0.50	4.52	-7.28
6	0.00	32.58	20.92	11.67	2.46	9.20	3.13	8.54	0.43	3.69	-3.59
7	0.00	32.58	20.92	11.67	2.46	9.20	3.13	8.54	0.38	3.21	-0.38
8	0.00	32.58	20.92	11.67	1.23	10.44	3.55	8.12	0.33	2.65	2.28
9	0.00	32.58	20.92	11.67	0.00	11.67	3.97	7.70	0.28	2.19	4.47
10	0.00	32.58	20.92	11.67	0.00	11.67	3.97	7.70	0.25	1.90	6.37
11	0.00	32.58	20.92	11.67	0.00	11.67	3.97	7.70	0.21	1.66	8.03
12	0.00	32.58	20.92	11.67	0.00	11.67	3.97	7.70	0.19	1.44	9.47
13	0.00	32.58	20.92	11.67	0.00	11.67	3.97	7.70	0.16	1.25	10.72
14	0.00	32.58	20.92	11.67	0.00	11.67	3.97	7.70	0.14	1.09	11.81
15	0.00	32.58	20.92	11.67	0.00	11.67	3.97	7.70	0.12	0.95	12.75
16	0.00	32.58	20.92	11.67	0.00	11.67	3.97	7.70	0.11	0.82	13.57
17	0.00	32.58	20.92	11.67	0.00	11.67	3.97	7.70	0.09	0.72	14.29
18	0.00	32.58	20.92	11.67	0.00	11.67	3.97	7.70	0.08	0.62	14.91
19	0.00	32.58	20.92	11.67	0.00	11.67	3.97	7.70	0.07	0.54	15.45
20	-3.77	32.58	20.92	11.67	0.00	11.67	3.97	11.48	0.06	0.70	16.16

<b>Año del proyecto</b>	<b>Porcentaje del FCI asumido como depreciación</b>
3	20%
4	32%
5	19.2%
6	11.52%
7	11.52%
8	5.76%

## Anexo 10: Análisis de seguridad del proceso mediante la metodología HAZID

Fuente: elaboración propia

Equipo	Riesgo identificado	Causa	Evento	Consecuencia
HR - 102	TS - 1	Uso de una solución de hidróxido de sodio como agente hidrolítico.	Derrames. Fugas.	Daños por corrosión a los equipos. Lesiones incapacitantes.
HR - 102	HF - 1	Calentamiento del tanque HR - 102 a 100 °C. Uso de aceite térmico a 200 °C como agente de calentamiento.	Fugas.	Lesiones incapacitantes por quemaduras. Muerte por quemaduras.
CF - 101, CF - 102, CF - 103, CF - 104	DE - 1	Rotación del tambor de las centrifugas a altas velocidades.	Eyección de partículas a alta velocidad. Inserción de extremidades en el tambor durante la operación del equipo.	Lesiones incapacitantes.
SF - 101, SF - 102, SF - 103, SF - 104, TF - 101, TF - 102, TF - 103	EG - 1	Acumulación de gases de fermentación a altas presiones.	Explosión por sobrepresión.	Daños mecánicos a los equipos. Lesiones incapacitantes
SF - 101, SF - 102, SF - 103, SF - 104, TF - 101, TF - 102, TF - 103	GP - 1	Uso de vapor saturado a 130 °C para la desinfección de los tanques de fermentación.	Explosión por sobrepresión.	Daños mecánicos a los equipos. Lesiones incapacitantes
SF - 101, SF - 102, SF - 103, SF - 104, TF - 101, TF - 102, TF - 103	TS - 2	Producción de dióxido de carbono durante la secreción de enzimas por fermentación sumergida.	Liberación de dióxido de carbono a las instalaciones de la sección de fermentación sumergida.	Muerte por asfixia.
TK - 101, TK - 102, TK - 103, TK - 104	TS - 3	Uso de etanol enhidro para la precipitación de enzimas.	Derrames. Fugas.	Lesiones incapacitantes. Riesgo de incendio.

Equipo	Análisis de riesgos					
	Personas			Equipos		
	Probabilidad	Severidad	Riesgo	Probabilidad	Severidad	Riesgo
HR - 102	C	II	6	C	III	11
HR - 102	D	I	8	D	IV	19
CF - 101, CF - 102, CF - 103, CF - 104	C	II	6	C	IV	18
SF - 101, SF - 102, SF - 103, SF - 104, TF - 101, TF - 102, TF - 103	E	II	15	E	II	15
SF - 101, SF - 102, SF - 103, SF - 104, TF - 101, TF - 102, TF - 103	E	II	15	E	II	15
SF - 101, SF - 102, SF - 103, SF - 104, TF - 101, TF - 102, TF - 103	E	I	12	E	IV	20
TK - 101, TK - 102, TK - 103, TK - 104	C	II	6	C	II	6

Equipo	Protecciones	
	Protecciones técnicas	Protecciones organizacionales
HR - 102	Implementación de un sistema de control de nivel en el tanque HR - 102.	Mantenimientos preventivos periódicos. Capacitaciones sobre el uso correcto de EPP's a nivel del personal.
HR - 102	Implementación de un sistema de control de nivel en el tanque HR - 102.	Mantenimientos preventivos periódicos. Capacitaciones sobre el uso correcto de EPP's a nivel del personal.
CF - 101, CF - 102, CF - 103, CF - 104	Implementación de un sistema de control de actuador rotativo en las centrifugas CF - 101, CF - 102, CF - 103 y CF - 104.	Mantenimientos preventivos periódicos. Capacitaciones sobre el uso correcto de EPP's a nivel del personal.
SF - 101, SF - 102, SF - 103, SF - 104, TF - 101, TF - 102, TF - 103	Uso de válvulas de alivio para permitir el escape de los gases. Instalación de interlocks de seguridad por sobrepresión acoplados a alarmas.	Mantenimientos preventivos periódicos. Capacitaciones sobre el uso correcto de EPP's a nivel del personal.
SF - 101, SF - 102, SF - 103, SF - 104, TF - 101, TF - 102, TF - 103	Implementación de un sistema de dosificación de vapor de desinfección en cada tanque de fermentación. Instalación de interlocks de seguridad por sobrepresión acoplados a alarmas.	Mantenimientos preventivos periódicos. Capacitaciones sobre el uso correcto de EPP's a nivel del personal.
SF - 101, SF - 102, SF - 103, SF - 104, TF - 101, TF - 102, TF - 103	Uso de uniones bridadas en las vías de venteo. Implementación de un sistema de monitoreo de concentración de dióxido de carbono con un límite máximo admisible de 40 g/L al interior de las instalaciones.	Mantenimientos preventivos periódicos.
TK - 101, TK - 102, TK - 103, TK - 104	Implementación de un sistema de control de nivel en los tanques TK - 101, TK - 102, TK - 103 y TK - 104.	Mantenimientos preventivos periódicos. Capacitaciones sobre el uso correcto de EPP's a nivel del personal.

<b>Leyenda</b>	<b>Interpretación</b>
TS	Sustancias tóxicas
HF	Fluidos calientes
DE	Equipos peligrosos
EG	Gases explosivos