

ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AGROINDUSTRIA

**ANÁLISIS COMPARATIVO DEL CONSUMO DE RECURSOS EN
PROCESOS QUE SIGUEN UNA RUTA TRADICIONAL O
BIOTECNOLÓGICA**

**ANÁLISIS COMPARATIVO DEL CONSUMO DE RECURSOS EN LA
HIDRÓLISIS QUÍMICA Y BIOTECNOLÓGICA DE BIOMASA
VEGETAL PARA LA LIBERACIÓN DE GLUCOSA, DESTINADA A
LA OBTENCIÓN DE BIOETANOL**

**TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR PRESENTADO COMO
REQUISITO PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA
AGROINDUSTRIAL**

NATHALY SILVANA PUNINA CHAMBA

nathaly.punina@epn.edu.ec

DIRECTOR: MARY CASA VILLEGAS

mary.casa@epn.edu.ec

DMQ, febrero 2022

CERTIFICACIONES

Yo, NATHALY SILVANA PUNINA CHAMBA declaro que el trabajo de integración curricular aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

NATHALY SILVANA PUNINA CHAMBA

Certifico que el presente trabajo de integración curricular fue desarrollado por NATHALY SILVANA PUNINA CHAMBA, bajo mi supervisión.

MARY CASA VILLEGAS
DIRECTOR

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

A través de la presente declaración, afirmamos que el trabajo de integración curricular aquí descrito, así como el (los) producto(s) resultante(s) del mismo, son públicos y estarán a disposición de la comunidad a través del repositorio institucional de la Escuela Politécnica Nacional; sin embargo, la titularidad de los derechos patrimoniales nos corresponde a los autores que hemos contribuido en el desarrollo del presente trabajo; observando para el efecto las disposiciones establecidas por el órgano competente en propiedad intelectual, la normativa interna y demás normas.

NATHALY SILVANA PUNINA CHAMBA

MARY CASA VILLEGAS

DEDICATORIA

El presente trabajo investigativo va dedicado especialmente a mi madre, mi mayor inspiración, por su paciencia y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTO

En primera instancia agradezco a mi madre, pues gracias a su esfuerzo y perseverancia, sus palabras de apoyo, su fe en mí, he logrado culminar una etapa importante en mi vida.

A mi directora del trabajo de integración curricular por los conocimientos impartidos y el tiempo dedicado.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CERTIFICACIONES.....	I
DECLARACIÓN DE AUTORÍA.....	II
DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTO.....	IIV
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	V
RESUMEN	VII
ABSTRACT	VIII
1 DESCRIPCION DEL COMPONENTE DESARROLLADO.....	1
1.1 Objetivo general	1
1.2 Objetivos específicos	1
1.3 Alcance	2
1.4 Marco teórico.....	2
1.4.1 Bioetanol de segunda generación.....	2
1.4.2 Transformación de biomasa lignocelulósica en bioetanol de segunda generación.....	3
Hidrólisis.....	4
Hidrólisis química.....	4
Hidrólisis enzimática.....	5
Fermentación.....	7
2 METODOLOGÍA.....	9
2.1 Composición de la biomasa lignocelulósica.....	9
2.2 Hidrólisis química	10
2.3 Hidrólisis biotecnológica.....	14
2.3.1 Pretratamientos aplicados al bagazo de caña	14
2.3.2 Producción de celulasas	14
2.3.3 Hidrólisis enzimática	15
3 RESULTADOS, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	21
3.1 Resultados	21
3.2 Conclusiones.....	25
3.3 Recomendaciones.....	25
4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

5 ANEXOS.....	30
ANEXO I.....	30
ANEXO II.....	31
ANEXO III.....	41

RESUMEN

El impacto ambiental causado por los combustibles fósiles ha promovido el desarrollo de los biocombustibles. El bioetanol de segunda generación es un biocombustible de gran interés por emplear material lignocelulósico, sin embargo, durante la hidrólisis presenta dificultades tecnológicas en la obtención de azúcares fermentables especialmente glucosa. El objetivo del presente trabajo fue, con base en información bibliográfica, identificar los principales recursos y estimar las cantidades empleadas en las hidrólisis clásica y biotecnológica de 1 kg de bagazo de caña que presentan rendimientos en glucosa del 91 % y 40 % respectivamente. Los procesos se ordenaron en diagramas de flujo y con balances de masa se calcularon las cantidades de insumos para cada etapa. Como resultado se determinó que la hidrólisis biotecnológica presentó el mayor consumo de reactivos aproximadamente 1,9 kg, a diferencia de la hidrólisis química que solo empleó ácido sulfúrico (489 g). En la ruta enzimática también se evidenció un alto requerimiento de bagazo de caña, ya que por cada kilogramo de sustrato a hidrolizar se procesaron 4 kilogramos adicionales para obtener los extractos de celulasas. El consumo energético en la ruta biotecnológica fue 5 veces mayor al estimado en la ruta ácida, debido a la esterilización de los medios de cultivo. Finalmente se estimó que los efluentes de la ruta biotecnológica fueron 1,5 veces el volumen calculado en la ruta clásica, no obstante, la carga de reactivos puede ser baja por tratarse de sales que son aprovechadas por los microorganismos.

PALABRAS CLAVE: hidrólisis enzimática, hidrólisis ácida, bagazo de caña, celulasas

ABSTRACT

The environmental impact caused by fossil fuels has promoted the development of biofuels. Second generation bioethanol is an interesting biofuel because of use lignocellulosic material, however, during the hydrolysis presents technological difficulties in obtaining fermentable sugars, especially glucose. Therefore, this work was carried on, based on bibliographic information, to identify the main resources and estimate the quantities used in the classical and biotechnological hydrolysis of 1 kg of sugarcane bagasse, which present glucose yields of 91% and 40%, respectively. The processes were arranged in flow diagrams and with mass balances the quantities of inputs for each stage were calculated. As a result, it was determined that the biotechnological hydrolysis presented the highest reagents consumption around of 1.4 kg, unlike the chemical hydrolysis that only used sulfuric acid (489 g). In the enzymatic route, a high requirement of cane bagasse was also evidenced, since for each kilogram of substrate to be hydrolyzed, 4 additional kilograms were processed to obtain cellulase extracts. The energy consumption in the biotechnological route was 5 times greater than energy consumption in the acid route, due to the sterilization of the culture media. Finally, it was estimated that the effluents of the biotechnological route were 1.5 times the volume calculated in the classic route, however, the load of reagents may be low because they are salts that are used by microorganisms.

KEYWORDS: enzymatic hydrolysis, acid hydrolysis, inputs, cane bagasse, cellulases

1 DESCRIPCIÓN DEL COMPONENTE DESARROLLADO

Debido al impacto ambiental causado por la emisión de gases de combustión provenientes de los combustibles fósiles, surgen alternativas energéticas amigables con el medio ambiente como los biocombustibles (Niphadkar, Praful y Ahmed, 2017, p.229). El bioetanol de segunda generación es un tipo de biocombustible que ha sido analizado con énfasis por emplear biomasa lignocelulósica, recurso que se caracteriza por ser renovable, económico y abundante a nivel mundial (Alvira, Ballesteros y Negro, 2012, p. 4581).

La obtención del bioetanol comprende las siguientes etapas: pretratamiento, hidrólisis, fermentación y destilación (Robak y Balcerek, 2018, p.177). La hidrólisis es considerada el cuello de botella del proceso, pues en función de su eficacia se liberarán azúcares fermentables (especialmente glucosa) que se convertirán en etanol. El proceso puede ser químico o biotecnológico con sus respectivas limitantes, consumo de recursos y empleo de diversas operaciones unitarias.

En la ruta química generalmente se emplean ácidos en altas concentraciones en conjunto con elevadas temperaturas que suelen degradar la celulosa, por ende, reducir los rendimientos de glucosa. Adicionalmente favorecen la generación de compuestos inhibidores de la fermentación como furfural e hidroximetilfurfural (Lenihan et al., 2009, pp. 395). En la ruta biotecnológica se utilizan enzimas ya sea comerciales o producidas por hongos y se caracteriza por desarrollarse en condiciones moderadas de pH y temperatura (Vasic, Knez, y Leitgeb, 2021, p.10). Este proceso requiere de pretratamientos para facilitar la degradación del sustrato. El rendimiento puede reducirse por factores como la inhibición de la actividad enzimática, dada la acumulación de azúcares como la celobiosa y glucosa (Lázaro y Arauzo, 1994, p.234; Singhania et al., 2013, p. 505).

1.1 Objetivo general

Analizar los principales recursos consumidos en la hidrólisis química y biotecnológica de biomasa vegetal para la liberación de azúcares fermentables (glucosa) requeridos en la producción de bioetanol.

1.2 Objetivos específicos

1. Estimar los principales recursos y cantidades empleadas en la hidrólisis química de bagazo de caña.

2. Estimar los principales recursos y cantidades empleadas en la hidrólisis biotecnológica de bagazo de caña.
3. Comparar los recursos demandados en las rutas química y biotecnológica de hidrólisis de bagazo de caña.

1.3 Alcance

El proyecto pretende identificar y comparar los principales recursos consumidos en las hidrólisis química y biotecnológica de 1 kg de bagazo de caña para obtener glucosa como materia prima en la producción de etanol. Para dicho análisis se realizará una revisión de información bibliográfica referente a hidrólisis química y biotecnológica del material lignocelulósico en términos de concentración de sustrato, relaciones líquido - sólido y concentración y rendimiento de glucosa, datos que permitirán seleccionar el caso de estudio cuyos rendimientos sean altos. Con base a la información proporcionada en los documentos seleccionados se buscará organizar los procesos implicados antes y después de la hidrólisis mediante un diagrama de flujo, determinar los principales insumos y estimar sus cantidades requeridas en cada ruta. Adicionalmente se recurrirá a nuevas fuentes para adquirir todos los datos necesarios que permitan resolver los balances de masa en los procesos. Establecidos los principales recursos y cantidades consumidas tanto en la ruta clásica como en la biotecnológica, se realizará una comparación entre ambas rutas.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Bioetanol de segunda generación

La huella de carbono originada por el uso desmesurado de combustibles fósiles representa una problemática ambiental que puede disminuirse mediante la implementación de alternativas energéticas como los biocombustibles (Niphadkar, Praful y Ahmed, 2017, p.229). El bioetanol es un biocombustible producto de la fermentación de azúcares presentes en diversas materias primas. Características como: alto índice de octano, bajo número de cetano y alto calor de vaporización permiten al biocombustible reemplazar a la gasolina convencional de forma parcial o total (Manfredi, 2018, p.2; Niphadkar, Praful, y Ahmed, 2017, p.230; Rodríguez, Castro y Pérez, 2017, p.8).

La biomasa clásica para elaborar bioetanol de primera generación comprende cultivos agrícolas como el maíz, el trigo, la caña de azúcar y la soja, por su contenido de almidón, azúcar y aceites vegetales respectivamente (Rodríguez, Castro y Pérez, 2017, pp. 7-8).

Al ser productos ya destinados a la alimentación humana o animal, su uso genera controversia por relacionarse con la hambruna en la población, aumento en el precio de los alimentos y fomento del monocultivo (Rodríguez, Castro, y Pérez, 2017,p.7; Vasic, Knez, y Leitgeb, 2021, p. 3).

Ante la polémica existente en la producción de bioetanol de primera generación, el uso de biomasa lignocelulósica toma ventaja para obtener bioetanol de segunda generación, por ser un recurso económico y abundante que no compite con los cultivos alimentarios (Alvira, Ballesteros y Negro, 2012, p. 4581). Se estima que la producción de dicha biomasa es cercana a 1×10^{10} t a nivel mundial, ya que está compuesta por diferentes partes de las plantas (hojas, cortezas), diversos pastos, residuos forestales o agrícolas e incluso subproductos provenientes de procesos agroindustriales (Vasic, Knez y Leitgeb, 2021, p.3). Sin embargo, dentro de la producción de bioetanol de segunda generación existen dificultades técnicas durante la degradación de la matriz formada entre la celulosa, hemicelulosa y lignina. De ahí que las investigaciones realizadas se hayan enfocado en procesos químicos, físicos o biológicos en etapas de pretratamiento e hidrólisis de la biomasa para potenciar la obtención de azúcares fermentables (especialmente glucosa) y su posterior conversión en etanol (Sánchez et al., 2010, p.62).

1.4.2 Transformación de biomasa lignocelulósica en bioetanol de segunda generación

La generación de bioetanol consta de cuatro procesos: pretratamiento, hidrólisis, fermentación y destilación; la hidrólisis se considera el proceso clave en la producción de azúcares fermentables (especialmente glucosa) (Robak y Balcerek, 2018, p.177). La hidrólisis puede ser química, enzimática o una combinación de ambas. La ruta enzimática ha sido estudiada con mayor énfasis por generar en bajas concentraciones compuestos inhibidores de la fermentación y ser amigable con el medio ambiente al reducir la generación de efluentes contaminantes (Kamiya et al., 2008, p. 1037).

Pretratamiento

Los pretratamientos son diversas operaciones esenciales, previo a la hidrólisis enzimática, para reducir el contenido de lignina, disminuir la cristalinidad de la celulosa e incrementar el área superficial que facilite el acceso de las celulasas al sustrato (Sánchez et al., 2010, p.65). De forma general, el pretratamiento se considera eficaz si la celulosa obtenida es altamente digerible con rendimientos en azúcares de hasta el 90 %, empleando bajas cargas de enzimas (10 FPU/g de sustrato); también es importante una baja producción de compuestos tóxicos y la facilidad de recuperar la lignina y otros

componentes como coproductos aprovechables (Alvira, Ballesteros y Negro, 2012, p. 4582).

Estas operaciones deberían demandar bajos consumos energéticos a fin de minimizar los costos de capital y operación (Manfredi, 2018, p.6). Los pretratamientos se pueden clasificar de la siguiente forma: mecánicos, térmicos, fisicoquímicos, químicos y biológicos, cuyo modo de acción y los resultados logrados se presentan en la ANEXO I.

Hidrólisis

La hidrólisis es considerada el cuello de botella de la producción de bioetanol, debido a las limitaciones existentes en el sustrato o el proceso que se traducen en bajos rendimientos de glucosa, y generación de productos inhibidores acorde al tipo de hidrólisis aplicada a la biomasa (Alvira, Ballesteros, y Negro, 2012, p.4852).

Hidrólisis química

La hidrólisis química es un método convencional que emplea ácidos como el sulfúrico, hipocloroso y fosfórico (Aguilar et al., 2002, p. 309). Se caracteriza por penetrar con facilidad la lignina y romper los polímeros de hemicelulosa y celulosa en sus monómeros fermentables. Su principal ventaja es la rapidez del proceso frente a la hidrólisis enzimática; no obstante, en condiciones ácidas, la glucosa se puede degradar, y su combinación con altas temperaturas puede formar productos inhibidores de la fermentación como el furfural e hidroximetilfurfural (Kumar et al., 2015, p. 851).

La hidrólisis química se efectúa de dos formas: diluida con concentraciones de 1 % al 10 % de ácido en altas temperaturas; o bien concentrada con ácidos al 10 % o 40 % a bajas temperaturas. En el primer caso se suelen requerir pretratamientos mecánicos, fisicoquímicos o químicos con ácidos (generalmente sulfúrico) en altas concentraciones por tiempos cortos. Adicionalmente tras la hidrólisis química se requieren procesos de concentración, neutralización y suplementación, que aumentan los costos operacionales (Lenihan et al., 2009, pp. 395). En la Tabla 1.1. se presentan procesos clásicos para hidrolizar material lignocelulósico, puesto que a la actualidad han surgido innovaciones para mejorar los rendimientos en azúcares fermentables. Gurgel et al. (2012) reportaron rendimientos de hasta 69,8 % de glucosa al realizar en el bagazo de caña una serie de pretratamientos térmicos con agua a 70 °C y 160 °C, combinados con un pretratamiento alcalino con NaOH al 16% (p/p) y antraquinona, para finalmente hidrolizar el material con ácido sulfúrico al 0,14% (p/p) a 210 °C. Otro caso es la hidrólisis con líquidos iónicos y ácido clorhídrico, con un pretratamiento con ácido peracético para obtener una conversión de celulosa de bagazo del 80 % (Uju, Goto y Kamiya, 2016, p.22).

Tabla 1.1. Hidrólisis química aplicada en biomosas lignocelulósicas

Biomasa	Descripción de la hidrólisis	Relación líquido-sólido	Glucosa obtenida (g/L)	Rendimiento de glucosa (%)	Referencia
Cáscaras de papas	Ácido fosfórico al 10 % (p/p) a 135 °C por 30 min.	20:1	28, 31	97, 35	(Lenihan et al., 2009, pp. 397-399)
Bagazo de caña	Hidrólisis en dos etapas: <i>Diluida:</i> ácido sulfúrico al 8 % (p/p), 100 °C durante 90 min. <i>Concentrada:</i> ácido sulfúrico al 40 % (p/p) a 80 °C por 90 min.	4:1	68, 2	44, 67	(Kumar, Dheeran, Singh, y Mishra, 2015, pp.851-856)
Bagazo de caña	Hidrólisis diluida en dos etapas: <i>Ácido sulfúrico</i> al 1% (v/v), 140 °C durante 3 min <i>Ácido sulfúrico</i> al 1% (v/v), 180 °C durante 3 min.	15:1	19,98	40, 00	(Chandler et al., 2012, pp. 249-251)

Hidrólisis enzimática

Se trata de un bioproceso catalizado por celulasas, cuyo propósito es degradar la celulosa pretratada, puesto que no es viable la hidrólisis directa de biomasa lignocelulósica incluso con altas cargas de enzima (40 FPU/ g biomasa seca). La hidrólisis enzimática es una reacción sinérgica donde el producto de una enzima se convierte en sustrato de otra como se indica en la Figura 1.1. El proceso implica la acción de las endoglucanasas sobre los enlaces glicosídicos internos de forma aleatoria, seguido de la ruptura de los terminales reductores y no reductores de la celulosa por acción de las celobiohidrolasas, liberando subunidades de celobiosa. Este último azúcar sirve como sustrato de las β - glucosidasas para obtener glucosa (Wang et al., 2012, pp.5-7). La acción enzimática mencionada es eficiente en condiciones operativas con temperaturas entre 40 °C a 50 °C y pH alrededor de 4,5 a 5 (Vasic, Knez, y Leitgeb, 2021, p.10).

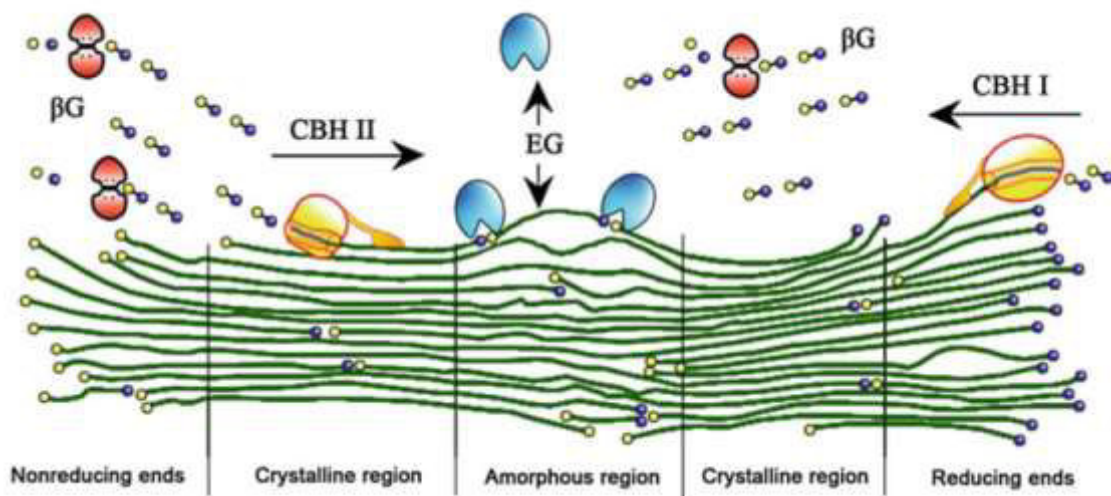


Figura 1.1. Esquema de biodegradación de la celulosa. EG: endoglucanasas; CBH: celobiohidrolasas y β G: β -glucosidasas.

Nota: Adaptado de “Cellulolytic Enzyme Production and Enzymatic Hydrolysis for Second-Generation Bioethanol Production” (p.6). por M. Wang et al., 2012, *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*. 128

Los factores relacionados con el sustrato que pueden afectar el rendimiento de la hidrólisis enzimática son: la cristalinidad y el grado de polimerización de la celulosa, el contenido de hemicelulosa y el tamaño de partícula (Alvira, Ballesteros, y Negro, 2012, p.4853). A nivel enzimático también surgen dificultades que limitan la síntesis y la actividad de las celulasas. La principal causa es la acumulación de celobiosa, debido a una baja concentración de β -glucosidasas o inhibición de dicha enzima por altas concentraciones de glucosa que bloquean el sitio activo. En las celobiohidrolasas, la celobiosa provoca una fuerte inhibición competitiva entre la unión enzima sustrato (celulosa) y enzima producto (celobiosa) (Lázaro y Arauzo, 1994, p.234; Singhania et al., 2013, p. 505)

Por lo mencionado, se han analizado varias alternativas descritas en la Tabla 1.2., que buscan disminuir el efecto inhibitor especialmente de la celobiosa. Se han reportado estrategias como la modificación genética de *Trichoderma reesei* para generar un sistema enzimático con mayor porcentaje de β -glucosidasas, puesto que el microorganismo expresa apenas un 1 % de esta enzima (Ahamed y Vermette, 2007, p.399); la adición de β -glucosidasas externas provenientes de cepas como *Aspergillus niger* (Bussamra, Freitas, y Costa, 2015, p.5); la combinación de enzimas derivadas de *Trichoderma harzianum*, *Penicillium funiculosom* y *Aspergillus niger* en cócteles,

acompañada de un pretratamiento; modificaciones en el proceso con sistemas de lotes alimentados o Sacarificación y Fermentación Simultánea (SSF) (Gao et al., 2014, p.10; Méndez et al., 2016, p.3); entre otros.

Fermentación

Mediante la fermentación, la glucosa obtenida de la hidrólisis se convierte en etanol por la acción de *Saccharomyces cerevisiae*, microorganismo capaz de procesar la hexosa en condiciones anaerobias con altos rendimientos de etanol. Generalmente en la hidrólisis también se libera xilosa, azúcar que requiere ser extraído o bien aprovechado por microorganismos como *Clostridium thermohydrosulfuricum* o *Zymomonas mobilis* (Vasic, Knezy Leitgeb, 2021, p.752).

Tabla 1.2. Alternativas para mejorar el rendimiento de la hidrólisis enzimática

Biomasa	Pretratamiento	Descripción del pretratamiento	Enzimas	Tipo de proceso	Concentración inicial de biomasa (p/v)	Concentración de glucosa obtenida (p/v)	Rendimiento de glucosa	Referencia
Racimo de palma de aceite *	Físico	Picado y molienda NaOH al 10 % (p/v) a 150 °C por 30 min	Cellic CTec2	SHF	15 %	10,67 %	87 %	(Dahnum, y otros, 2015, pp. 108-116)
	Alcalino		Cellic HTec2					
Bagazo de caña	Alcalino	NaOH al 1,8 % (p/v) a 110 °C por 60 min.	Cellic CTec2 β-glucosidasa	Lote alimentado	33 %	12,9 %	56,24 %	(Gao et al., 2014, pp. 5-26)
Bagazo de caña	Ácido	Ácido sulfúrico al 1,09 % (v/v) a 121 °C durante 27 min.	Cóctel de enzimas provenientes de diferentes microorganismos	Lote	2,5 %	1,72 %	91 %	(Méndez et al., 2016, pp.2-8)
	Alcalino	NaOH al 4 % (p/v) a 121 °C durante 30 min						
Bagazo de caña	Hidrotérmico	Agua a 190 °C durante 10 min	Cóctel de enzimas provenientes de diferentes microorganismos	Lote	5 %	2,4 %	72 %	(Bussamra, Freitas, y Costa, 2015, pp. 1-38)
Fibra de algodón**	Ácido	Ácido fosfórico al 85 % a 50 °C durante 30 min	Celluclast 1.5L	Lote	2 %	1,71 %	81,57 %	(Amiri y Karimi, 2013, pp. 11495-11500)
		Ácido fosfórico al 0,5 % a 150 °C durante 60 min.	Novozyme 188					

*La fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* produjo 4,74 % (p/v) de etanol, con un rendimiento del 76 %.

** La fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* generó etanol al 3,41 % (p/v).

2 METODOLOGÍA

El desarrollo del presente proyecto se basó en el método deductivo para describir un punto crítico (hidrólisis) dentro de la producción de bioetanol de segunda generación, enfocándose en la comparación entre la hidrólisis clásica y biotecnológica. Con este fin se realizó una revisión bibliográfica de ambas rutas, aplicadas en materiales lignocelulósicos como: bagazo de caña, cáscara de papa, fibra de algodón y racimos de palma de aceite. Los resultados en concentración y rendimiento de glucosa reportados en las investigaciones se compararon para seleccionar un estudio de caso. Por ende, se analizó la hidrólisis de 1 kg de bagazo de caña con rendimientos en glucosa del 91 % para la ruta enzimática y 40 % para la ruta clásica. El enfoque del método fue cuantitativo pues se estimaron las cantidades de insumos requeridos en la hidrólisis, en función de los datos proporcionados (concentración de azúcar, relación líquido - sólido, porcentaje de conversión entre otros). Acorde al procedimiento descrito en las diversas fuentes se ordenaron las operaciones unitarias en los diagramas de flujo mostrados en las Figura 2.1., Figura 2.2., Figura 2.3. y Figura 2.4. Previo a la descripción de los procesos químicos o biotecnológicos se describió la composición de biomasa lignocelulósica con el fin de entender su efecto durante la hidrólisis.

2.1 Composición de la biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica está conformada por tres polímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina unidos entre sí mediante puentes de hidrógeno y enlaces covalentes, que brindan una estructura resistente y rígida a la pared celular para evitar cualquier daño químico o enzimático (Wang et al., 2017, p.35).

La celulosa es un polisacárido lineal formado por la unión de 500 a 14 000 unidades de D-glucosa mediante enlaces β -1,4-glucosídicos (Robak y Balcerek, 2018, p. 176). Su estructura cristalina se debe a la formación de puentes de hidrógeno inter y extra moleculares, que generan microfibrillas y son las responsables de la resistencia e insolubilidad en agua del polímero (Manfredi, 2018, pp.3). Dicha cristalinidad se puede reducir bajo condiciones de alta temperatura y presión (320 °C y 25 MPa) (Robak y Balcerek, 2018, p. 176). En las microfibrillas también existen regiones desordenadas (celulosa amorfa), las cuales son susceptibles al ataque químico o enzimático (Manfredi, 2018, pp.3-4).

La hemicelulosa es un heteropolímero ramificado formado por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-glucosa, D-galactosa y D-manosa), que mediante puentes de

hidrógeno se unen a la celulosa (Robak y Balcerek, 2018, p.177). Su principal función es servir de conector entre la lignina y la celulosa para brindar rigidez a la estructura (Sánchez, et al., 2010, p.63).

La lignina es un polímero tridimensional unido a la hemicelulosa con enlaces covalentes y puentes de hidrógeno. Está formado por unidades de fenilpropano y su función es brindar soporte estructural, impermeabilidad y resistencia al estrés oxidativo (Manfredi, 2018, p.5; Robak y Balcerek, 2018, p.177). Se trata de un componente no deseado en la producción de bioetanol por ser recalcitrante y difícil de biodegradar, impidiendo así la acción enzimática (Robak y Balcerek, 2018, p.177).

2.2 Hidrólisis química

Las operaciones unitarias expuestas en el diagrama de flujo de la Figura 2.1. se obtuvieron de la metodología reportada por Chandler et al. Previo a la hidrólisis el bagazo de caña requiere de un secado hasta un 10% de humedad, molienda con cuchillas y un tamizaje que permita obtener un tamaño de partícula de 1 mm. De esta forma se favorece la penetración del ácido en el sustrato. Para incrementar el rendimiento de glucosa y reducir la producción de compuestos inhibidores de la fermentación, en la investigación se propone una hidrólisis diluida en doble etapa. En el proceso se utiliza una solución de ácido sulfúrico al 1% (v/v) y una carga de sólidos que obedece a la relación 1:15 (sólido - líquido). En la primera etapa se opera a 140 °C durante 3 min para lograr un incremento en la concentración de glucosa. Tras la hidrólisis se da un proceso de filtración al vacío que separa el residuo sólido del hidrolizado. En este último se determinan las cantidades de glucosa y subproductos (furfural, hidroximetilfurfural y compuestos fenólicos). El bagazo residual es lavado con agua destilada en cantidades de 5 a 10 veces del hidrolizado extraído y se calienta a 120 °C por 2 h, ya que el material se almacena a 4 °C previo a su uso. En la segunda etapa se mantiene la relación sólido - líquido, la solución de ácido sulfúrico al 1% (v/v), el tiempo de procesamiento y varía en la temperatura de operación (180 °C). Al producto obtenido se aplica una filtración al vacío, el residuo sólido se trata igual que en la primera etapa y en la fracción líquida se analiza la composición (Chandler et al., 2012, p.247).

Los valores presentados en el diagrama fueron estimados a partir de la relación sólido - líquido y las concentraciones de azúcares y subproductos. Sin embargo, también se realizaron las suposiciones descritas a continuación para realizar los cálculos expuestos en el ANEXO II.

- La composición del bagazo previo a secado, molienda y trituración presentó un 12, 34% de agua en base húmeda (bh) acorde a lo reportado por Villalba y Arzola (2019, p.27)
- La materia seca estuvo netamente constituida por celulosa, hemicelulosa y lignina cuyas composiciones porcentuales en base seca se encuentran en el ANEXO II.
- Las condiciones operativas del secado se seleccionaron en función de la eficiencia térmica que se da a 35 °C durante 120 min según Villalba y Arzola (2019, p.34).
- No existieron pérdidas en masa del bagazo de caña durante la molienda y tamizado.
- El bagazo resultado de la filtración estuvo compuesto por materia seca y solución de ácido sulfúrico. La masa de la materia seca dependió del contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina que no se logró hidrolizar.
- Los rendimientos en glucosa fueron calculados mediante la Ecuación 2.1. según lo descrito por Liu et al. (2017, p. 100).

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{g \text{ azúcares experimentales} * V_{\text{disolución}} * 0,9}{g \text{ azúcares teóricos}} * 100$$

Ecuación 2.1. Rendimiento de azúcares fermentables

Donde:

g azúcares experimentales: concentración de azúcar en g/L

V_{disolución}: volumen del hidrolizado

g azúcares teóricos : masa de celulosa

- La estimación de celulosa remanente en el bagazo dependió de la concentración de glucosa en el hidrolizado y la concentración de celulosa en el bagazo antes de la hidrólisis. Adicionalmente se consideró que el hidroximetilfurfural (HMF) reportado en el licor influyó en la masa de celulosa, puesto que el compuesto es producto de la degradación de hexosas (Mena, 2020, p.9).
- El cálculo del contenido de hemicelulosa dependió de la concentración de furfural en el hidrolizado, ya que este es producto de la degradación de pentosas (Mena, 2020, p.9).

- El valor en masa de la lignina en el bagazo filtrado estuvo en función del contenido de los compuestos fenólicos en el hidrolizado, pues estos se forman a partir de las pérdidas de lignina (Mena, 2020, p.9).
- La densidad del hidrolizado se mantuvo semejante a la densidad de la solución de ácido sulfúrico al 1 % (v/v).
- Para el tratamiento del bagazo residual después del filtrado se omitió el proceso de refrigeración y se cambió el proceso de calentamiento por un secado a temperatura ambiente, similar a lo descrito en la metodología del pretratamiento de aserrín de pino (Rodríguez et al., 2017, p.319).
- En los procesos de lavado se estimó que el 1 % del agua empleada se quedó en el bagazo. Adicionalmente se asumió que el lavado logró eliminar al 100% la solución de ácido sulfúrico remanente en el bagazo después de la filtración.
- Se estimó que después de los secados los bagazos quedaron con un 10% de agua en base húmeda.
- El consumo energético se calculó en las etapas claves (secado, primera y segunda hidrólisis) de la generación de glucosa.
- Para estimar el consumo energético en las hidrólisis se asumió que los sustratos tuvieron una temperatura inicial similar a la ambiental y una temperatura final igual a la temperatura del proceso.
- Los calores específicos de los sustratos y las soluciones de ácido sulfúrico dependieron solo de las concentraciones y no de la temperatura.
- El calor específico de la fracción seca del bagazo de caña fue similar al calor específico de la celulosa.

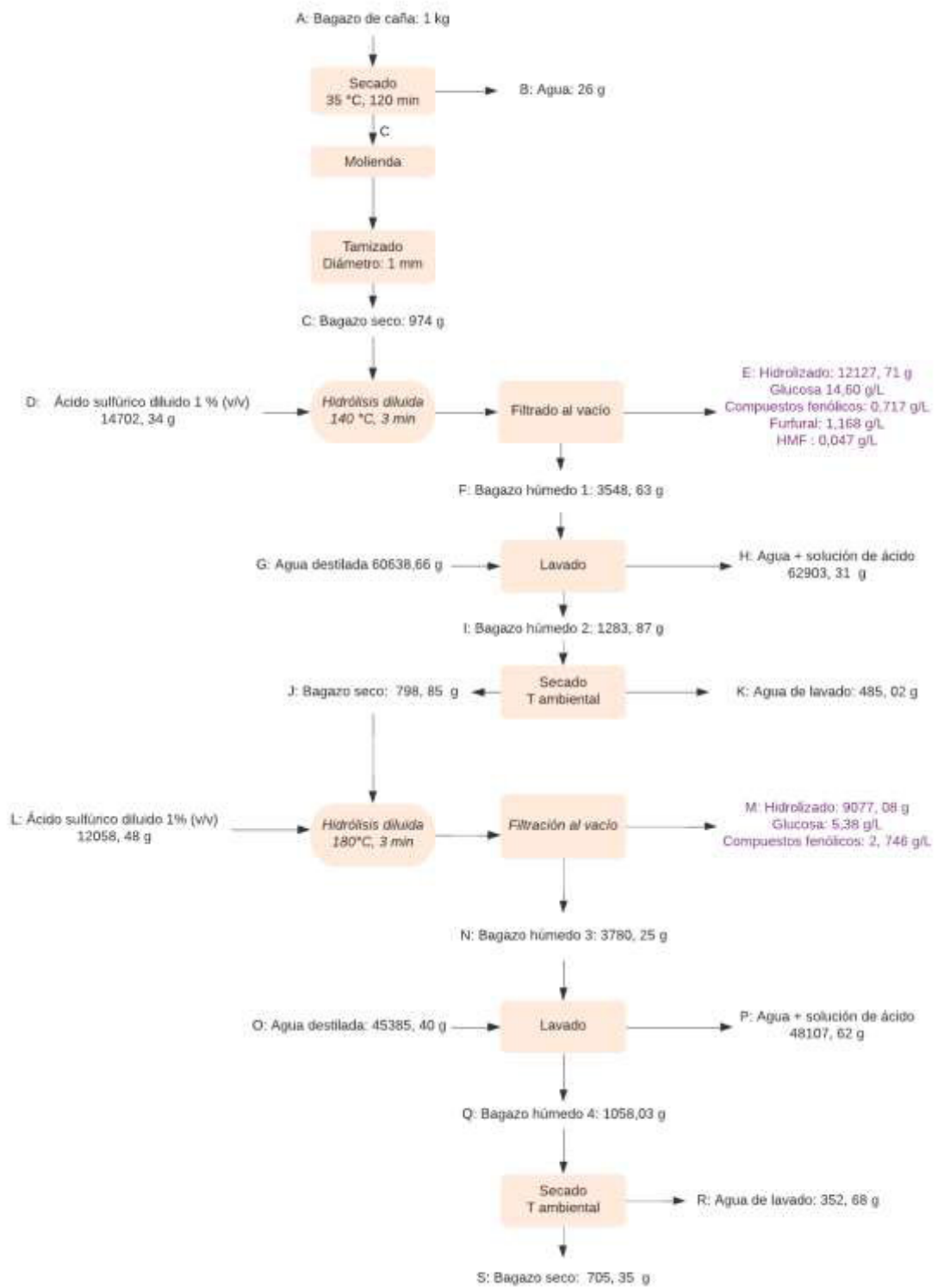


Figura 2.1. Diagrama de flujo del procesamiento de bagazo de caña para la obtención de glucosa.

2.3 Hidrólisis biotecnológica

El diagrama de flujo mostrado en la Figura 2.2. se basó en las operaciones unitarias mencionadas en la metodología de Méndez et al. (2016, p.2). Previo a la hidrólisis enzimática, el bagazo de caña sufre dos tipos de pretratamientos y se da la producción de celulasas por parte de los microorganismos *Trichoderma harzianum*, *Penicillium funiculosum* y *Aspergillus Niger*.

2.3.1 Pretratamientos aplicados al bagazo de caña

La función de los pretratamientos en el bagazo de caña es reducir los contenidos de hemicelulosa y lignina para incrementar los rendimientos en glucosa. El primer pretratamiento emplea ácido sulfúrico al 1,09 % (v/v) en una relación sólido - líquido de 1: 2,8 a 121 °C durante 27 min. La celulignina obtenida de este proceso es sometida a un segundo pretratamiento con hidróxido de sodio al 4 % (w/v) en una relación sólido - líquido de 1:20 a 121 °C por 30 min. El resultado de ambos procesos es un residuo denominado celulignina parcialmente designificada (CPL) (Méndez et al., 2016, p.2).

2.3.2 Producción de celulasas

La producción de celulasas se realiza en un biorreactor de tanque agitado con una capacidad nominal de 10 L. En 8 L de medio esterilizado se adiciona un preinóculo correspondiente al 10% del volumen del medio y 15 g/L de CPL como fuente de carbono para *T. harzianum* y *P. funiculosum*, y 7, 5 g/L de CPL para *A. niger* (Dias, 2011, p. 34; Maeda et al., 2010, p.413; Rocha et al., 2013, p. 2). El preinóculo se obtiene al añadir 10⁶ conidios/ mL de una suspensión de esporas en 400 mL de medio bajo ciertas condiciones. Los medios se mantienen agitados a 200 rpm, 30 °C durante 30 h para *T. harzianum* y 72 h para *P. funiculosum* y *A. niger*. La composición de los medios en función del microorganismo empleado se presenta en la Tabla 2.1., Tabla 2.2. y Tabla 2.3. El tiempo de incubación para *T. harzianum*, *P. funiculosum* y *A. niger* es de 42, 72 y 90 h respectivamente, transcurrido dicho tiempo se da un proceso de filtración al vacío para separar el medio fermentado de residuos celulares y de bagazo. Con el fin de incrementar la actividad enzimática y concentrar las proteínas deseadas, el filtrado se concentra mediante un sistema de fibra hueca que presenta un corte de 10 kDa. Al complejo de celulosa de cada microorganismo se añade glicerol al 5% (v/v) como agente estabilizante para finalmente ser almacenado a 4°C hasta su posterior uso (Méndez et al., 2016, p.2). Los diagramas de flujo correspondientes a esta etapa se presentan en la Figura 2.3., Figura 2.4. y Figura 2.5.

Tabla 2.1. Composición del medio para el crecimiento de *T. harzianum*

Reactivo	Concentración (mg/L)
Urea	2,24 g/L
Extracto de levadura	1,14 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,42 g/L
KH ₂ PO ₄	2,00
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	0,40
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,30
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	5,00
MnSO ₄ * 4 H ₂ O	1,60
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	1,40
CoCl ₂ * 6 H ₂ O	2,00

Adaptado de: (Rocha et al., 2013, p. 3)

Tabla 2.2. Composición del medio para el crecimiento de *P. funiculosum*

Reactivo	Concentración (g/L)
Urea	0,97
(NH ₄) ₂ SO ₄	4,00
Extracto de levadura	0,36

Adaptado de: (Maeda et al., 2010, p.421)

Tabla 2.3. Composición del medio para el crecimiento de *A. niger*

Reactivo	Concentración (g/L)
Extracto de levadura	10
(NH ₄) ₂ SO ₄	4,0
KH ₂ PO ₄	3,0

Adaptado de: (Dias, 2011)

2.3.3 Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática se da a 50 °C, pH 5 por 48 h con una concentración de sólidos (CPL) de 25 g/L. La carga enzimática requerida en la hidrólisis es de 10 mg/ g de celulosa. El cóctel se elabora al mezclar los complejos de celulasa de los diferentes microorganismos en las siguientes proporciones: 15% de *T. harzianum*, 50% de *P. funiculosum* y 35% de *A. niger*. Concluido el proceso se analiza el hidrolizado para determinar la concentración de glucosa lograda (Méndez et al., 2016, p.4).

La estimación de las cantidades de insumos consumidas en la hidrólisis enzimática combinada con pretratamiento ácido y alcalino se realizó con base en las relaciones sólido - líquido, concentración y rendimiento de glucosa reportado por Méndez et al., (2016, pp. 2-6). Adicionalmente los cálculos indicados en el ANEXO III se basaron en las suposiciones mencionadas a continuación:

Hidrólisis enzimática

- Dadas las condiciones del pretratamiento ácido y alcalino y la relación sólido - líquido manejada, la hidrólisis de celulosa fue despreciable, por tanto, su masa se mantuvo hasta después del pretratamiento alcalino.
- En el pretratamiento ácido el agua de lavado fue 5 veces el hidrolizado obtenido en el proceso de filtración.
- El lavado removi6 en su totalidad la soluci6n remanente de 6cido sulf6rico y el material obtenido de este proceso present6 1% del agua de lavado.
- La humedad de la celulignina despu6s del secado fue del 10%.
- La hidrólisis enzimática se realiz6 en una soluci6n tamp6n de citrato de sodio 0,05 M acorde a lo reportado por Amiri y Karimi (2013, p.11495).
- La densidad del volumen de trabajo para la hidrólisis y la densidad del hidrolizado fueron similares a la densidad del agua.

Producci6n de celulasas

- Existi6 una p6rdida del 10% del medio durante la filtraci6n.
- Despu6s del filtrado la masa de residuos de CPL sumado a los residuos celulares fueron igual a la masa de CPL previo a la producci6n de celulasas.
- El complejo de celulasa de *T. harzianum* se obtuvo al concentrar 48 veces el hidrolizado seg6n lo descrito por Rocha et al. (2013, p.3).
- El complejo de celulasas de *P. funiculosum* fue resultado de reducir 36 veces el hidrolizado considerando que la concentraci6n enzimática reportada por Maeda et al., (2010, p.413) es la concentraci6n enzimática del extracto concentrado.
- El complejo de celulasas de *A. niger* requiri6 una reducci6n del hidrolizado de 6 veces en funci6n de la metodología empleada por Dias (2011, p. 38).
- La estimaci6n de los vol6menes de medio y prein6culo necesarios para producir celulasas que permitan hidrolizar la masa de CPL calculada, se realiz6 en funci6n de la cantidad de proteínas existentes en el complejo de celulasa mencionado por Méndez et al. (2016, p.2).

- En el complejo de celulasas de *T. harzianum* la cantidad de proteínas se determinó con base en la actividad enzimática específica de las endoglucanasas, puesto que fue la proteína con mayor producción.
- En el complejo de celulasas de *P. funiculosum* y *A. niger* la cantidad de proteínas se calculó al considerar la actividad enzimática de endoglucanasas y β -glucosidasas.

Consumo energético

- Se estimó el consumo energético en las etapas claves (producción de celulasas, pretratamientos e hidrólisis) de la generación de glucosa.
- La esterilización de los medios de cultivo duró 15 min a 121 °C.
- Se asumió que los sustratos y las soluciones empleadas en los pretratamientos e hidrólisis tuvieron una temperatura inicial similar a la ambiental y una temperatura final igual a la temperatura del proceso.
- Los calores específicos de los sustratos y las soluciones dependieron solo de las concentraciones y no de la temperatura.
- El calor específico de la fracción seca del bagazo de caña fue similar al calor específico de la celulosa.
- Los calores específicos y las densidades de la solución tamponada con citrato de sodio 0,05 M y los medios necesarios para el desarrollo de cada microorganismo fueron iguales al calor específico y densidad del agua.

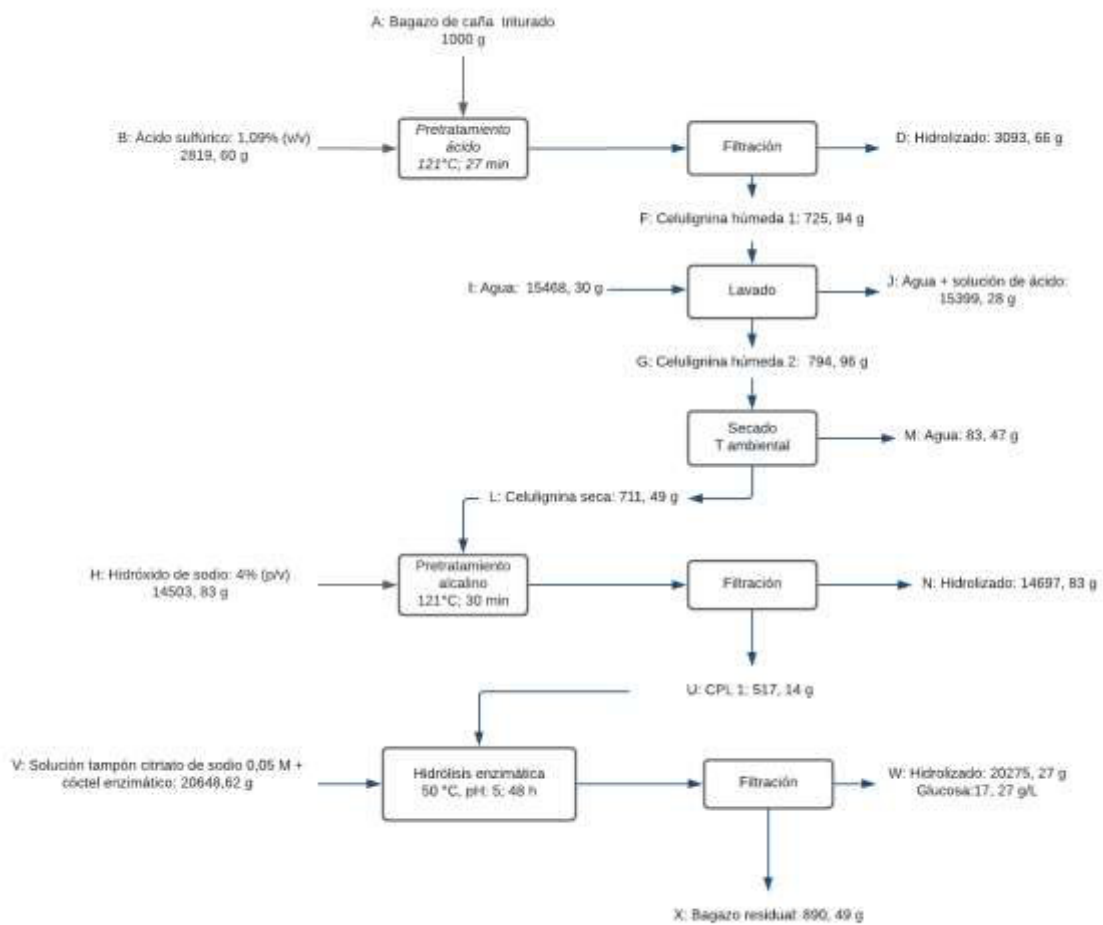


Figura 2.2. Diagrama de flujo del procesamiento de bagazo de caña para la obtención de glucosa.

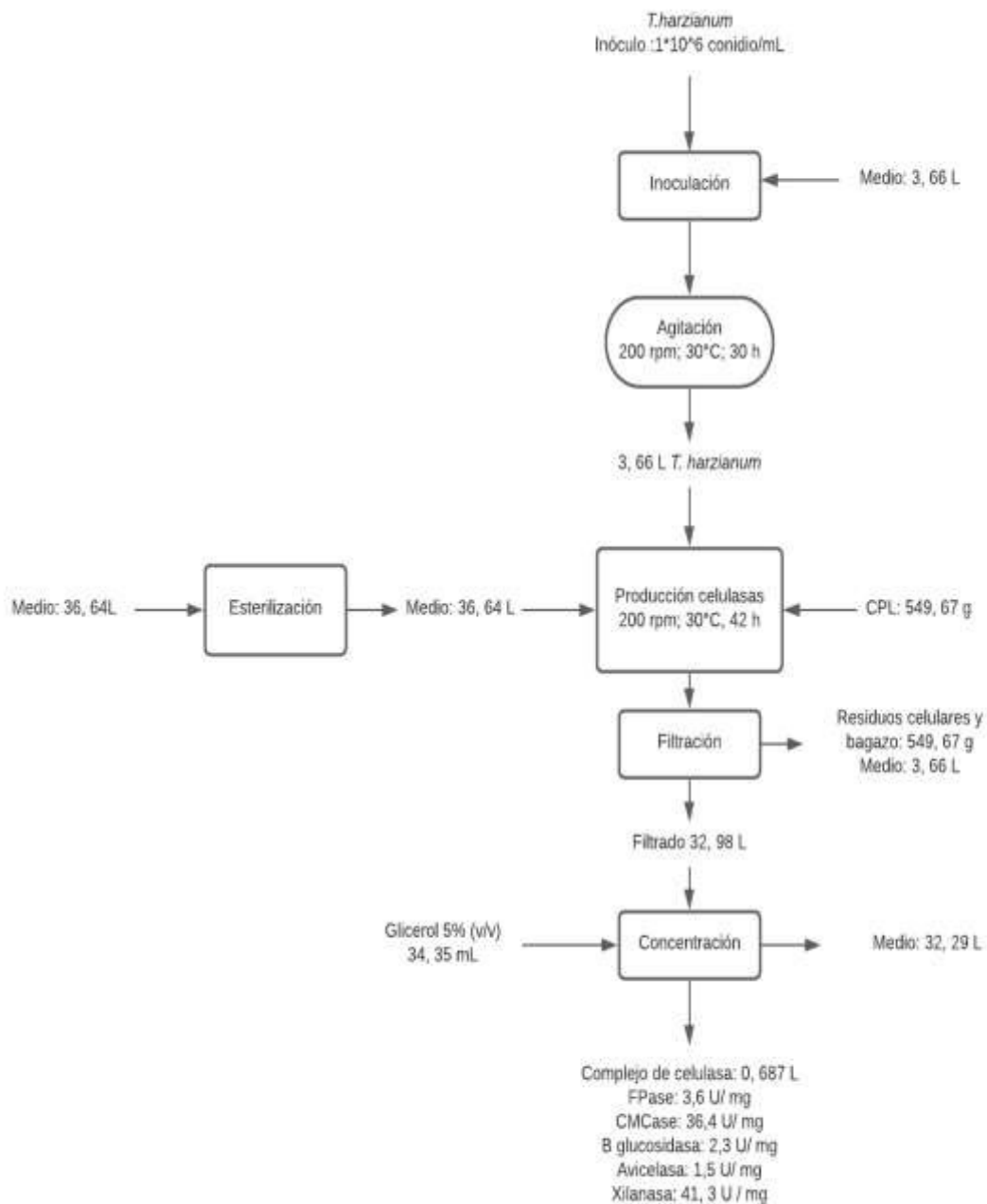


Figura 2.3. Diagrama de flujo de la obtención de celulasas por parte del microorganismo *T. harzianum*

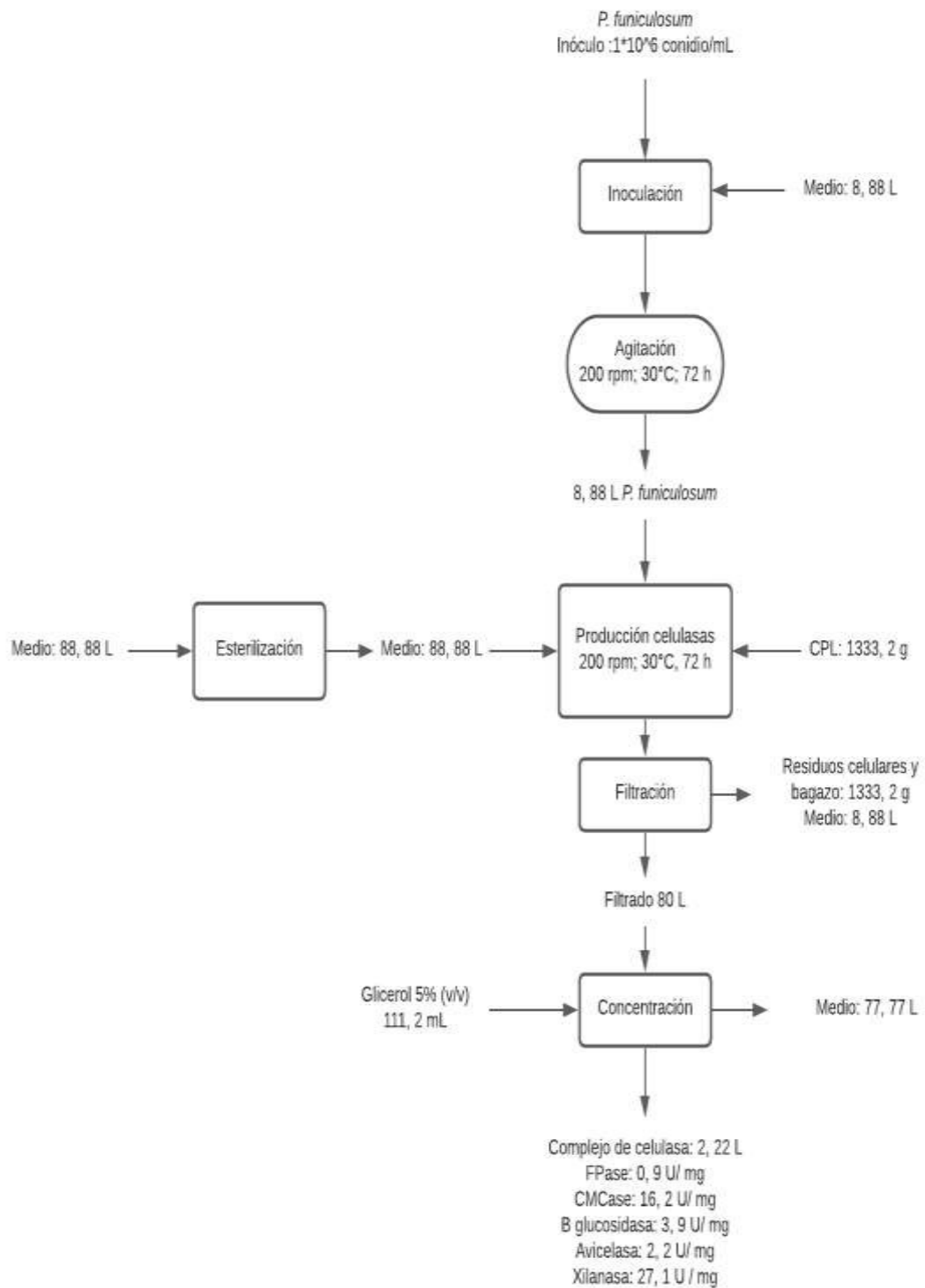


Figura 2.4. Diagrama de flujo de la obtención de celulasas por parte del microorganismo *P. funiculosum*

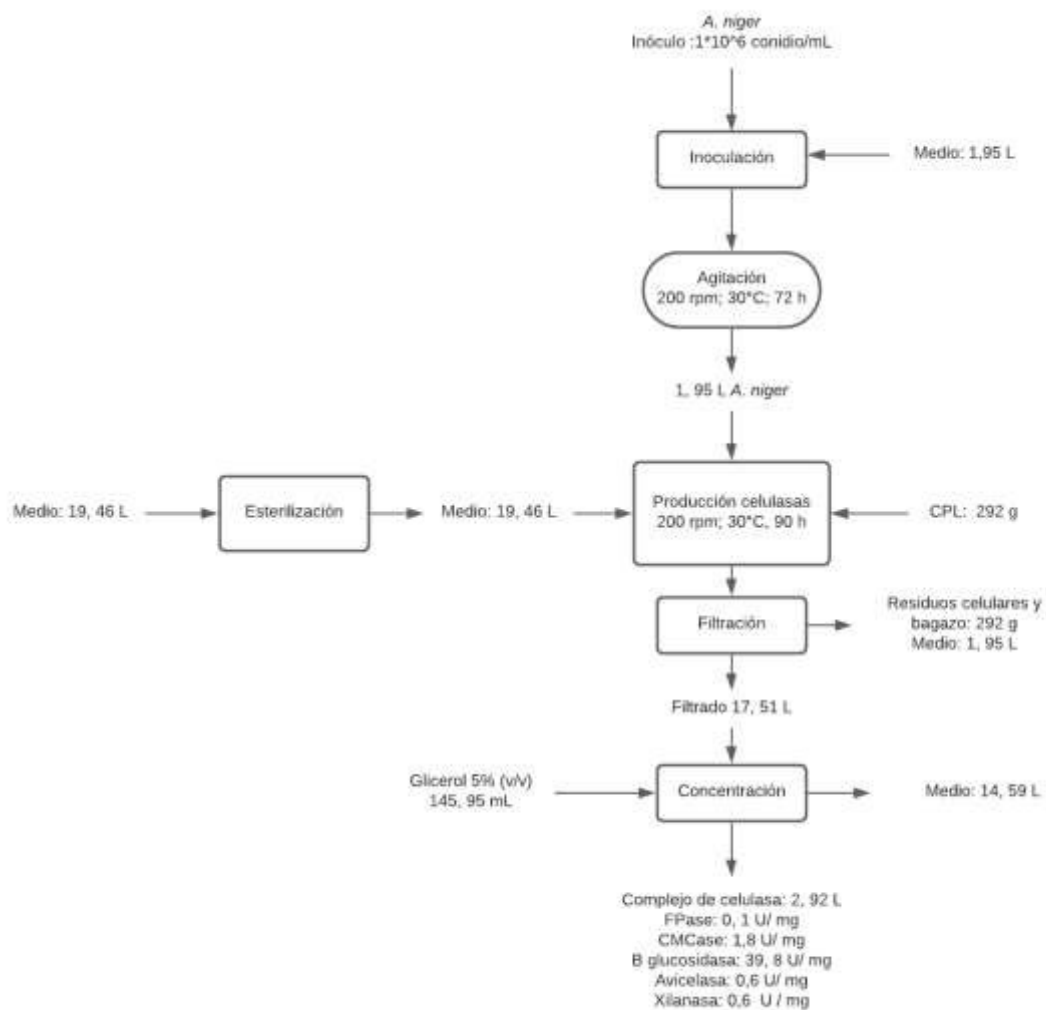


Figura 2.5. Diagrama de flujo de la obtención de celulastas por parte del microorganismo *A. niger*

3 RESULTADOS, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

3.1 Resultados

En la Figura 3.1. se presentan los reactivos químicos y las cantidades consumidas en la hidrólisis química e hidrólisis biotecnológica de 1 kg de bagazo de caña.

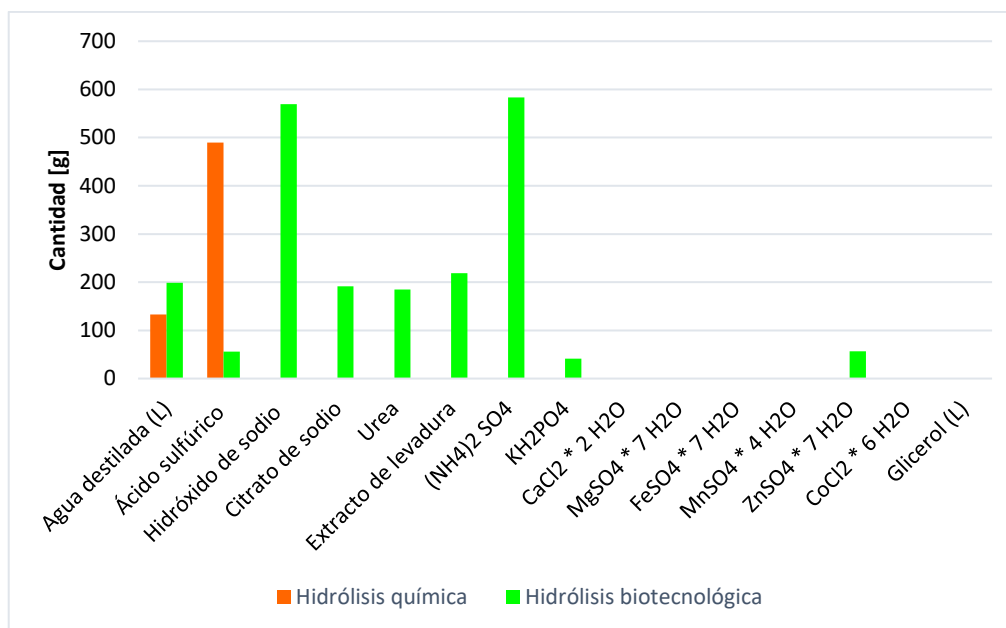


Figura 3.1. Reactivos químicos consumidos en las hidrólisis química y biotecnológica. La cantidad de agua destilada y glicerol se reportan en L.

De acuerdo con la Figura 3.1. en la hidrólisis biotecnológica existió un mayor requerimiento de reactivos químicos en un total de 1,9 kg, de los cuales fueron representativas las cantidades de hidróxido de sodio (569 g) para el pretratamiento de la celulignina y sales (681 g) para la producción de extractos enzimáticos. El último proceso permite generar un cóctel enzimático con alta digestibilidad de celulosa gracias a la presencia de β - glucosidasas que disminuyen la inhibición enzimática por acumulación de celobiosa en el medio (Percival, Himmel y Mielenz, 2006, p. 455). Fang, Zhao y Song determinaron que un cóctel enzimático derivado de microorganismos fue capaz de producir altos rendimientos (80%) con bajas dosis de celulasas, a diferencia de las enzimas comerciales cuyas cargas fueron el doble para lograr los mismos resultados. Es así como en la hidrólisis enzimática de rastrojo de maíz se necesitaron solo 20 U/ g de glucano del cóctel enzimático para alcanzar un rendimiento de 80,1 %, en contraste con los 25 U/ g de glucano de celulasa comercial suplementada con 5 U/g de glucano de β -glucosidasas (2010, p. 4118).

En la Figura 3.1. también resalta la diferencia en el contenido de ácido sulfúrico consumido en cada hidrólisis. En la hidrólisis química se añadieron 489 g de ácido sulfúrico para hidrolizar el bagazo de caña, valor que resultó ser 9 veces mayor a la cantidad consumida en la hidrólisis biotecnológica (55 g). Las relaciones sólido - líquido influyen en estos valores puesto que en la hidrólisis química es de 1:15 en las dos etapas, mientras que en la hidrólisis biotecnológica es de 1:2,8. La diferencia en las relaciones sólido – líquido se debe al uso que tiene el ácido, en el primer caso el ácido diluido tiene la función de hidrolizar la

hemicelulosa y celulosa en las dos etapas; en cambio, en el segundo caso el ácido se usa como pretratamiento para separar gran parte de la fracción hemicelulósica del bagazo de caña y a su vez mejorar la difusión de hidróxido de sodio en la estructura lignocelulósica. Como resultado de ambos pretratamientos se facilita la hidrólisis de la celulosa alcanzando altos rendimientos de glucosa (91%) comparado con el rendimiento obtenido en la hidrólisis química (40 %) (Chandler et al., 2012, pp. 249-250; Méndez et al., 2016, pp.3-5).

El consumo de agua en la hidrólisis biotecnológica fue 1,5 veces el volumen estimado en la hidrólisis química, ya que este insumo es demandado en la hidrólisis y preparación de diferentes volúmenes de medios para la producción de celulasas por parte de *T. harzianum*, *P. funiculosum* y *A. niger*.

En la Figura 3.2 se mencionan otros tipos de insumos demandados en ambas hidrólisis.

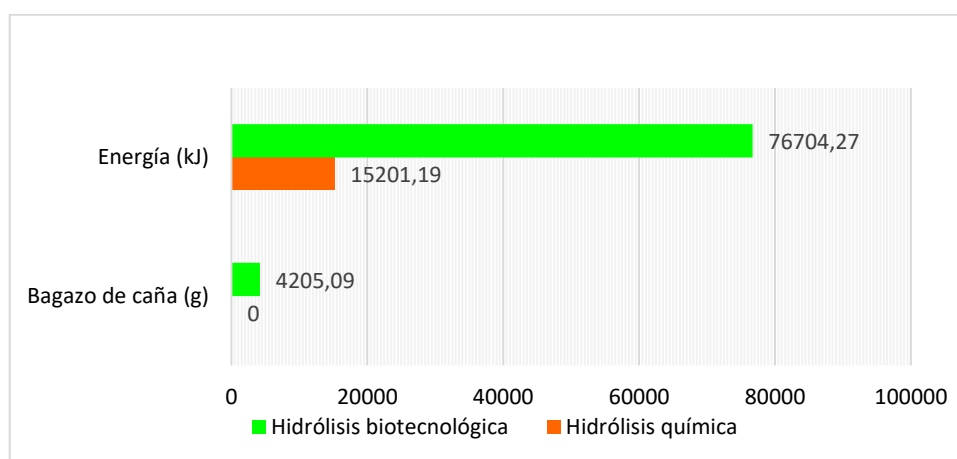


Figura 3.2. Cantidad de insumos demandados en las hidrólisis química y biotecnológica

En la Figura 3.2. se aprecia que la hidrólisis enzimática tuvo un consumo energético 5 veces mayor al de la hidrólisis química, debido a la esterilización de los medios de cultivo. En cuanto al tiempo de procesamiento, la hidrólisis enzimática ocurrió en 48 h, a diferencia de la hidrólisis clásica que se dio en 6 min. Por ende, Kumar et al. mencionaron que la velocidad de la hidrólisis biotecnológica es relativamente lenta frente a la hidrólisis química. Sin embargo, los procesos que ocupan mayor tiempo dentro de la ruta biotecnológica son la formación del preinóculo y la producción de celulasas, de tal manera que la ruta biotecnológica puede tomar hasta 210 h en obtener glucosa.

La Figura 3.2 muestra un consumo de bagazo de caña de 4 kg para la generación de celulasas capaces de hidrolizar 1 kg de bagazo de caña. El uso de este residuo como sustrato es una forma de potenciar el aprovechamiento de residuos agroindustriales y reducir los costos de producción biotecnológica de celulasas. Esto considerando que las

celulasas comerciales pueden costar hasta 4 USD/ mililitro de extracto (Llenque et al., 2015, p.45; Viñals et al., 2012, p.12). En la hidrólisis enzimática también se emplean suspensiones de microorganismos que obedecen una concentración de 10^6 conidios/ mL en 3,66 L, 8,88 L y 1,95 L de medio para *T. harzianum*, *P. funiculosum* y *A. niger* respectivamente.

Otro aspecto importante por analizar son los desechos generados en ambas hidrólisis cuyos valores estimados se presentan en la Figura 3.3.

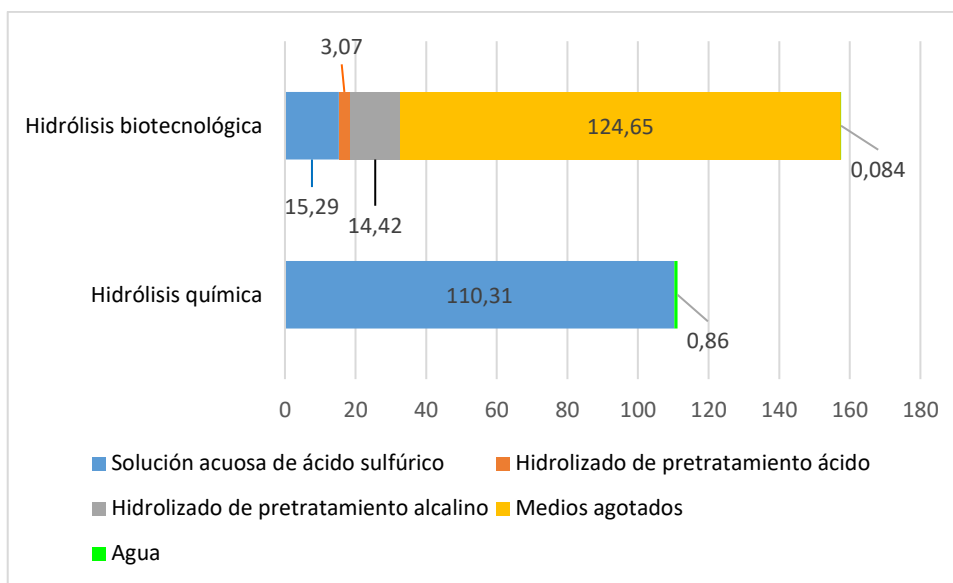


Figura 3.3. Volumen de efluentes generados (L) en las hidrólisis química y biotecnológica

Acorde con la Figura 3.3 en la hidrólisis biotecnológica se formó un mayor volumen de efluentes, llegando a ser 1,5 veces el valor estimado para la hidrólisis ácida. Los efluentes generados en mayor proporción en la ruta enzimática fueron los medios de cultivo agotados (124 L), mientras que en la ruta clásica fue la solución acuosa de ácido sulfúrico (110 L). Si se considera los volúmenes elevados de agua involucrados en los procesos de lavado y que las concentraciones de ácido sulfúrico para la hidrólisis y el pretratamiento bordean el 1 %, el reactivo sobrante estaría altamente diluido, por ende, la solución acuosa proveniente de la hidrólisis ácida no representaría una potencial amenaza ambiental. Sin embargo, la recuperación del ácido mediante sistemas de adsorción sería una buena opción para reciclar el reactivo en las etapas de hidrólisis y pretratamiento, reduciendo así el consumo del compuesto (Kumar et al., 2015, p.851).

En la Figura 3.3. se evidencia la generación de 2 efluentes aprovechables en la hidrólisis biotecnológica pues son fuentes de xilosa y lignina. El hidrolizado del pretratamiento ácido con un valor de 3 L puede ser rico en xilosa, según Campos et al. (2021, p.277) este

hidrolizado se puede neutralizar con perlas de hidróxido y ser sometido a fermentación con *Candida intermedia* para producir xilitol, edulcorante no calórico de gran interés comercial (Campos et al., 2021, p.277). El hidrolizado del pretratamiento alcalino es posible fuente de lignina al igual que el bagazo residual (890 g), por ende se puede extraer dicho componente al adicionar una solución de ácido sulfúrico en los desechos mencionados y procesarlos a 175 °C por 40 min. Se estima que de una alimentación de 5000 kg de bagazo residual más 4000 kg de hidrolizado se obtienen alrededor de 2000 kg de lignina aprovechables como precursores en la producción de fibras de carbono (Gutiérrez et al., 2020, pp.98-102).

3.2 Conclusiones

- Para el procesamiento de 1 kg de bagazo de caña, la hidrólisis enzimática que alcanza un rendimiento en glucosa del 91 %, demandó la mayor cantidad de reactivos (1,9 kg) principalmente sales (681 g) para los medios de cultivo; en contraste con la hidrólisis química la cual empleó únicamente ácido sulfúrico (490 g) pero llega a un rendimiento del 40 %.
- El consumo energético en la hidrólisis enzimática fue 5 veces mayor que en la ruta ácida debido a la necesidad de esterilizar los medios de cultivo.
- En la ruta enzimática por cada kilogramo de bagazo de caña a hidrolizar se requirieron 4 adicionales para la producción de los extractos enzimáticos, lo cual favorece el aprovechamiento de este residuo.
- En la ruta biotecnológica se generó un volumen de efluentes 1,5 veces mayor al generado en la ruta ácida. Sin embargo, el contenido de reactivos en los efluentes de la ruta enzimática podría ser menor, ya que muchos de ellos son consumidos por los microorganismos, lo cual podría facilitar su disposición final.

3.3 Recomendaciones

Ampliar el estudio hacia la determinación de la composición de los efluentes generados en las rutas clásica y biotecnológica para establecer el impacto ambiental de cada una.

Determinar y comparar la viabilidad de la producción de glucosa con la rutas clásica y biotecnológica mediante un análisis de costos.

Validar de forma experimental los datos presentados en este estudio, replicando los ensayos propuestos en la bibliografía y midiendo otros parámetros como por ejemplo las

pérdidas por filtración, el volumen de los extractos enzimáticos utilizados en la hidrólisis, el agua requerida en los procesos de lavado, la composición del bagazo hidrolizado y del remanente.

4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, R., Ramírez, G., Garrote, G., y Vázquez, M. (2002). Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. *Journal of Food Engineering*, 55(4), 309-318. doi:10.1016/s0260-8774(02)00106-1
- Ahamed, A., y Vermette, P. (2007). Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 40(3), 399-407. doi: 10.1016/j.bej.2007.11.030
- Alvira, P. T.-P., Ballesteros, M., y Negro, M. (2012). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, 101(13), 4851-4861. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.093>
- Amiri, H., y Karimi, K. (2013). Efficient Dilute-Acid Hydrolysis of Cellulose Using Solvent Pretreatment. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 52(33), 11494 -11501. <https://doi.org/10.1021/ie4017368>
- Bussamra, B., Freitas, S., y Costa, A. (2015). Improvement on sugar cane bagasse hydrolysis using enzymatic mixture designed. *Bioresource Technology*, 187, 1-38. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.117>
- Campos, Ulda; Llontop, Keyla; Gil, Armando; Villena, Luigi y Cruz, José. (2021). Influencia del medio fermentativo en el consumo de xilosa por *Candida intermedia* a partir de hidrolizados de bagacillo de caña de azúcar. *Manglar*, 18(3), 275-281. <http://dx.doi.org/10.17268/manglar.2021.036>
- Chandler, C., Villalobos, N., González, E., Arenas, E., Mármol, Z., Ríos, J., y Aiello, C. (2012). Hidrólisis ácida diluida en dos etapas de bagazo. *MULTICIENCIAS*, 12(3), 245-253.
- Dahnum, D., Tasum, S., Triwahyuni, E., Nurdin, M., Abimanyu, y Haznan. (2015). Comparison of SHF and SSF processes using enzyme and dry yeast. *Energy Procedia*, 68, 107-116. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2015.03.238>
- Dias, D. (2011). *PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E APLICAÇÃO DE β -GLUCOSIDASES DE *Aspergillus niger**. (Trabajo de titulación previo a la obtención del título en Master en Ciencias). Brazil: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO.
- Fang, H., Zhao, C., y Song, X. Y. (2010). Optimization of enzymatic hydrolysis of steam-exploded corn stover by two approaches: Response surface methodology or using cellulase from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* NL02. *Bioresource Technology*, 101 (11), 4111-4119. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.078>
- Gao, Y., Xu, J., Yuan, Z., Zhang, Y., Liu, Y., y Liang, C. (2014). Optimization of fed-batch enzymatic hydrolysis from. *Bioresource Technology*, 167, 1-26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.034>
- Gurgel, L. V. A., Marabezi, K., Zambom, M. D., y Curvelo, A. A. da S. (2012). Dilute Acid Hydrolysis of Sugar Cane Bagasse at High Temperatures: A Kinetic Study of

Cellulose Saccharification and Glucose Decomposition. Part I: Sulfuric Acid as the Catalyst. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 51(3), 1173–1185. doi:10.1021/ie2025739 .

- Gutiérrez, A., Guirola, C., de Armas, A., Albornas, Y., y Villanueva, G. (2020). Valorización de la lignina en el concepto de biorrefinería. *Centro Azúcar*, 47 (3), 95-105. ISSN: 2223- 4861
- Kamiya, N., Matsushita, Y., Hanaki, M., Nakashima, K., Narita, M., Goto, M., y Takahashi, H. (2008). Enzymatic in situ saccharification of cellulose. *Biotechnology Lett*, 30(6), 1037-1040. <http://dx.doi.org/10.1007/s10529-008-9638-0>
- Kumar, S., Dheeran, P., Singh, S. P., Mishra, I., y Adhikari, D. (2015). Kinetic studies of two-stage sulphuric acid hydrolysis of sugarcane. *Renewable Energy*, 83, 850-858. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.05.033>
- Lázaro, L., y Arauzo, J. (1994). Aprovechamiento de residuos de las industria de conservas vegetales hidrólisis enzimática, *Zubía*, 12, 227-240. ISSN 0213-4306
- Lenihan, P., Orozco, A., O'Neill, E., Ahmad, M., Rooney, D., y Walker, G. (2009). Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Chemical Engineering Journal*, 156(2), 395. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2009.10.061>
- Liu, Z., Li, L., Liu, C., y Xu, A. (2017). Saccharification of cellulose in the ionic liquids and glucose recovery. *Renewable Energy*, 106, 99- 102. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.01.023>
- Llenque, L., Muñoz, M., Espejo, E., y Moreno, A. (2015). Producción de celulasas por *Aspergillus niger* a partir de bagazo de caña de azúcar en biorreactor aireado. *Ciencia y Tecnología*, 39-49.
- Maeda, R., da Silva, M., Santa Anna, L., y Pereira, N. (2010). Nitrogen Source Optimization for Cellulase Production by *Penicillium funiculosum*, using a Sequential Experimental Design Methodology and the Desirability Function. *Biochem Biotechnology*, 161(1 - 8), 411-422. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8875-6>
- Manfredi, A. (2018). *Desarrollo de estrategias para la producción de bioetanol utilizando hidrolizados de recursos lignocelulósicos*. Argentina: Universidad Nacional de Tucumán. Facultad de Ciencias Exactas y Tecnología.
- Mena, G. (2020). *Estudio de viabilidad técnica y económica para la producción de xilitol a partir del bagazo de caña de azúcar*. (Trabajo de titulación previo a la obtención del Título de Ingeniero Químico). Bogotá: Facultad de la Ingeniería Química. Universidad de los Andes.
- Méndez, J., Amarante, L., Polikarpov, I., y Pereira, N. (2016). Design of an Enzyme Cocktail Consisting of Different Fungal Platforms for efficient hydrolysis of sugarcane bagasse: Optimization and synergism studies. *American Institute of Chemical Engineers*, 32(5), 1-8. doi: 10.1002/btpr.2306
- Niphadkar, S., Praful, B., y Ahmed, S. (2017). Bioethanol production: insight into past, present and future perspectives. *Biofuels*, 9(2), 229-238. <https://doi.org/10.1080/17597269.2017.1334338>

- Percival, Y.-H., Himmel, M., y Mielenz, J. (2006). Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*, 24(5), 452-481. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.03.003>
- Robak, K., y Balcerek, M. (2018). Review of Second Generation Bioethanol Production. *Food Technology & Biotechnology*, 56(2), 174-187. doi: 10.17113/ftb.56.02.18.5428.
- Rocha, V., Maeda, R., Santa Anna, L., y Pereira, N. (2013). Sugarcane bagasse as feedstock for cellulase production by *Trichoderma harzianum* in optimized culture medium. *Electronic Journal of Biotechnology*, 16(5).1-13. <http://dx.doi.org/10.2225/vol16-issue5-fulltext-1>
- Rodríguez, G., Castro, R., y Pérez, V. (2017). *Obtención de bioetanol de segunda generación a partir de cáscara de naranja*. España: Universidad de Vigo.
- Rodríguez, M., Castrillo, M., Velázquez, J., Kramer, G., Sedler, C., Zapata, P., y Villalba, L. (2017). Obtención de azúcares fermentables a partir de aserrín de pino pretratado secuencialmente con ácido-base. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33(2), 317-324. doi:10.20937/RICA.2017.33.02.12
- Sánchez, A., Gutierrez, A., Muñoz, J., y Rivera, C. (2010). Producción de bioetanol a partir de subproductos. *Revista Tumbaga*, 61-91.
- Singhania, R., Patel, A., Sukumaran, R., Larroche, C., y Pandey, A. (2013). Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 127, 500-507. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.012>
- Uju, Goto, M., y Kamiya, N. (2016). Powerful peracetic acid-ionic liquid pretreatment process for the efficient chemical hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 214, 487-495. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.121>
- Vasic, K., Knez, Z., y Leitgeb, M. (2021). Bioethanol Production by Enzymatic Hydrolysis from Different Lignocellulosic Sources. *Molecules*, 26(3), 1-23.
- Villalba, J., y Arzola, N. (2019). Estudio experimental sobre el secado de bagazo de caña de azúcar panelera. *Scientia et Technica*, 24(1), 25- 34. <https://dx.doi.org/10.3390%2Fmolecules26030753>
- Viñals, M., Bell, A., Michelena, G., y Ramil, M. (2012). Obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica . *ICIDCA de Investigaciones de los derivados de la caña de azúcar*, 46(1), 7-16. ISSN: 0138-6204
- Wang, M., Li, Z., Fang, X., Wang, L., y Qu, Y. (2012). Cellulolytic Enzyme Production. *Biotechnology in China III: Biofuels and Bioenergy*, 128, 1-24. DOI: 10.1007/10_2011_131
- Wang, S., Dai, G. D., Yang, H., y Luo, Z. (2017). Lignocellulosic biomass pyrolysis mechanism: A state- of-the- arte review. *Progress in Energy and Combustion Science*, 62, 33-86. <https://doi.org/10.1016/J.PECS.2017.05.004>

5 ANEXOS

ANEXO I

Tabla 5.1 Pretratamientos usados en biomasa vegetal previo a la hidrólisis enzimática

	Insumos	Condiciones de procesamiento	Resultado
Pretratamiento mecánico			
Trituración mecánica	Molino de bolas, fresadora de rodillo, martillos.	Altas potencias	Reducción del tamaño de partícula, de la cristalinidad de la lignocelulosa, y del grado de polimerización.
Ultrasonido	NA	25 °C durante 30 min.	Extracción de lignina y hemicelulosa.
Pretratamiento térmico			
Explosión por vapor	Vapor saturado	160 - 260°C durante 1 a 10 min.	Desagregación y ruptura de fibras, despolimerización y ruptura de enlaces.
Agua líquida a alta temperatura	Agua caliente	170 - 230 °C durante 46 min. pH de 4 a 7	Solubilización de hemicelulosa y menor producción de inhibidores.
Pretratamiento fisicoquímico			
Explosión de con amoníaco	Amoníaco	Temperatura ambiental o hasta 120 °C durante 10 a 60 días.	Aumento en el rendimiento de hidrólisis enzimática hasta 6 veces y 2,5 veces el rendimiento de etanol.
Explosión con CO ₂	CO ₂ supercrítico	Alta presión y temperaturas hasta 200 °C.	Incrementa rendimiento de glucosas tras hidrólisis enzimática por el aumento del tamaño de poros.
Pretratamiento químico			
Hidrólisis ácida	Ácido sulfuroso, sulfúrico, clorhídrico, fosfórico, nítrico y fórmico	Altas concentraciones (10-30 %) a 170 °C- 190 °C Bajas concentraciones (1-5%) a 160 °C- 240 °C	Hidrólisis de hemicelulosa y condensación y precipitación de lignina.
Hidrólisis alcalina	Hidróxido de sodio diluido	60 °C durante 24 horas.	Hinchamiento de biomasa, descomposición de polisacáridos y rompimiento de radicales finales.
Pretratamiento biológico			
Tratamiento con hongos	Hongos de podredumbre marrón, blanca y suave.	NA	Degradación de lignina y hemicelulosa.

Adaptado de: (Sánchez et al., 2010, pp.65-68)

ANEXO II

1. Composición del bagazo de caña antes de la hidrólisis

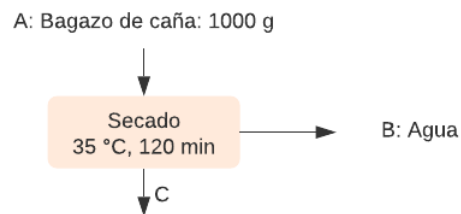
Tabla 5.2. Composición del bagazo de caña con 10% de agua en base húmeda

Componente	Contenido (%)
Materia seca	90%
Celulosa	62,25 %*
Hemicelulosa	25,27 %*
Lignina	12.49 %*

*Porcentajes expresados en base seca

2. Balances de masa para la hidrólisis química

2.1 Balance de masa en el secado



Balance de masa general

$$A = B + C$$

$$1000 \text{ g} = B + C$$

Balance de masa de agua

$$A * x_A = B * x_B + C * x_C$$

$$1000 \text{ g} * 0,1234 = B + C * 0,1$$

$$B = 26 \text{ g}; C = 974 \text{ g}$$

2.2 Balance de masa en la primera hidrólisis y filtración

Cálculo de la masa del hidrolizado

La masa de hidrolizado se obtuvo a partir del rendimiento (29,02 %) reportado por Chandler et al. (2012, p.249) y la concentración de glucosa (14,60 g/L) relacionadas mediante la Ecuación 2.1.

$$\text{Rendimiento} = \frac{G \text{ azúcares experimentales} * V_{\text{disolución}} * 0,9}{g \text{ azúcares teóricos}} * 100$$

Ecuación 2.1. Rendimiento de azúcares reductores

El volumen de hidrolizado se obtuvo de la siguiente forma:

$$29,02 = \frac{14,60 \text{ g/L} * V_{\text{disolución}} * 0,9}{0,6225 * 0,9 * 974 \text{ g}} * 100$$

$$V: 12,05 \text{ L}$$

La densidad de la solución de ácido sulfúrico al 1% (v/v), cuyo volumen fue 14610 mL cumpliendo la relación sólido - líquido de 1:15, se usó como densidad del hidrolizado y se calculó con la Ecuación 5.1.

$$\delta_{\text{mezcla}} = \frac{m_{H_2SO_4} + m_{H_2O}}{V_{H_2SO_4} + V_{H_2O}}$$

Ecuación 5.1. Densidad de mezcla

$$\delta_{\text{solución } H_2SO_4} = \frac{0,01 * 14610 \text{ mL} * \frac{1,83 \text{ g}}{\text{mL}} + 0,99 * 14610 \text{ mL} * \frac{0,998 \text{ g}}{\text{mL}}}{14610}$$

$$\delta_{\text{solución } H_2SO_4} = 1,00632 \text{ g/mL}$$

Por tanto, la masa de hidrolizado fue igual a:

$$E = 12,05 \text{ L} * 1000 * \frac{1,00632 \text{ g}}{\text{mL}} = 12127,71 \text{ g}$$

Balance de masa en el hidrolizado y filtrado



La masa en D se calculó obedeciendo la relación sólido - líquido 1: 15

$$D = 15 * \text{Bagazo seco}$$

$$D = 15 * 974 \text{ g} = 14610 \text{ mL}$$

Con la densidad ya calculada en el apartado anterior se obtuvo la masa de solución de ácido sulfúrico empleada en la primera hidrólisis.

$$D = 14610 \text{ mL} * \frac{1,00632 \text{ g}}{\text{mL}} = 14702,34 \text{ g}$$

Balance de masa general

$$D + C = F + E$$

$$14702,34 \text{ g} + 974 \text{ g} = F + 12127,71 \text{ g}$$

$$F = 3548,63 \text{ g}$$

Cálculo de la composición del flujo F

El contenido de celulosa en el bagazo residual del primer filtrado se calculó al considerar la celulosa en el bagazo antes de la hidrólisis, la glucosa y HMF en el filtrado.

$$\begin{aligned} \text{Celulosa} = & \text{Materia seca}_{\text{bagazo}} * x_{\text{celulosa}} - 0,9 * \text{Hidrolizado}_1 * x_{\text{glucosa}} \\ & - \text{Hidrolizado}_1 * x_{\text{HMF}} \end{aligned}$$

$$\text{Celulosa} = 0,9 * 974 \text{ g} * 0,6225 - 0,9 * 12,05 \text{ L} * 14,60 \text{ g/L} - 12,05 \text{ L} * 0,047 \text{ g/L}$$

$$\text{Celulosa} = 386,78 \text{ g}$$

El contenido de hemicelulosa se obtuvo al considerar la hemicelulosa en el bagazo antes de la hidrólisis y el furfural presente en el filtrado.

$$\text{Hemicelulosa: } \text{Materia seca}_{\text{bagazo}} * x_{\text{hemicelulosa}} - \text{Hidrolizado}_1 * x_{\text{furfural}}$$

$$\text{Hemicelulosa} = 0,9 * 974 \text{ g} * 0,2527 - 1,168 \text{ g/L} * 12,05 \text{ L}$$

$$\text{Hemicelulosa} = 207,44 \text{ g}$$

El contenido de lignina se estimó a partir de la lignina presente en el bagazo antes de la hidrólisis y los compuestos fenólicos en el filtrado.

$$\text{Lignina: } \text{Materia seca}_{\text{bagazo}} * x_{\text{lignina}} - \text{Hidrolizado}_1 * x_{\text{compuestos fenólicos}}$$

$$\text{Lignina} = 0,9 * 974 \text{ g} * 0,1249 - 0,717 \text{ g/L} * 12,05 \text{ L}$$

$$\text{Lignina} = 100,85 \text{ g}$$

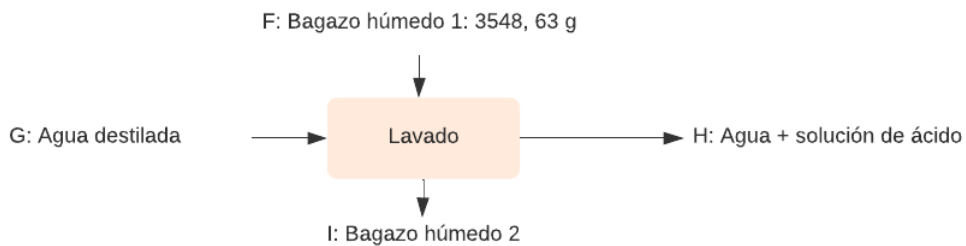
El restante se consideró es solución de ácido sulfúrico remanente

$$\text{Solución de ácido remanente} = F - \text{Celulosa} - \text{Hemicelulosa} - \text{Lignina}$$

$$\text{Solución de ácido remanente} = 3548,63 \text{ g} - 386,78 \text{ g} - 207,44 \text{ g} - 100,85 \text{ g}$$

$$\text{Solución de ácido remanente} = 2853,56 \text{ g}$$

2.3 Balance de masa en el primer lavado



Para determinar el valor de G se sabe que fue 5 veces mayor al hidrolizado obtenido de la filtración.

$$G = 5 * E = 5 * 12127,71 \text{ g} = 60638,55 \text{ g}$$

El valor de H se calculó considerando que la solución de ácido remanente en F y el 99% del agua destilada inicial se quedó en H.

$$H: \text{Solución de ácido remanente}_F + 0,99 * G$$

$$H = 2853,56 \text{ g} + 0,99 * 60638,55 \text{ g}$$

$$H = 62885,72 \text{ g}$$

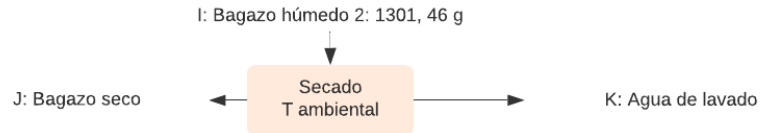
Balance de masa general

$$F + G = H + I$$

$$3548,63 \text{ g} + 60638,55 \text{ g} = 62885,72 \text{ g} + I$$

$$I = 1301,46 \text{ g}$$

2.4 Balance de masa en el secado



El secado se realizó hasta obtener un 10 % de agua en base húmeda.

Balance de masa general

$$I = J + K$$

$$1301,46 \text{ g} = J + K$$

Balance de masa de agua

$$I * x_I = J * x_J + K * x_K$$

$$1301,46 \text{ g} * 0,44 = J * 0,1 + K$$

$$J = 809,79 \text{ g} ; K = 491,66 \text{ g}$$

2.5 Balance de masa en la segunda hidrólisis y filtración

Cálculo de la masa de hidrolizado

La masa del segundo hidrolizado se estimó a partir del rendimiento (11,83 %) reportado por Chandler et al. (2012, p. 251) y la concentración de azúcar experimental (5,38 g/L) relacionadas con la Ecuación 2.1.

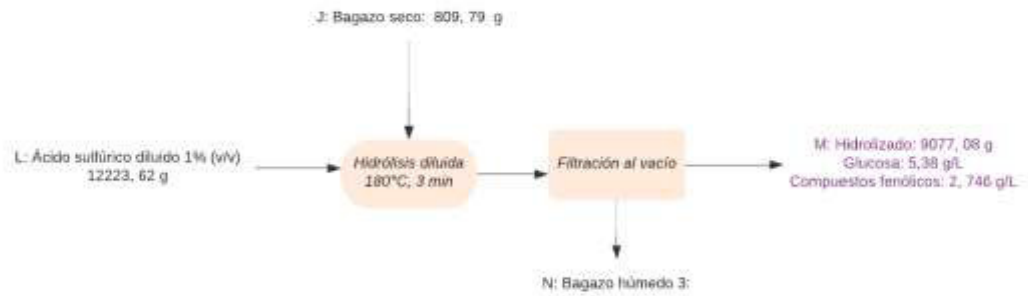
$$11,83 = \frac{5,38 \text{ g/L} * V_{\text{disolución}} * 0,9}{369,19 \text{ g}} * 100$$

$$V: 9,02 \text{ L}$$

La densidad de la solución de ácido sulfúrico al 1% (v/v), se usó como densidad del segundo hidrolizado, por tanto, la masa fue igual a:

$$M = 9,02 \text{ L} * 1000 * \frac{1,00632 \text{ g}}{\text{mL}} = 9077,08 \text{ g}$$

Balance de masa en el hidrolizado y filtrado



La masa en L se calculó obedeciendo la relación sólido - líquido 1: 15

$$L = 15 * \text{Bagazo seco}$$

$$L = 15 * 809,79 \text{ g} = 12146,85 \text{ mL}$$

La masa de solución de ácido sulfúrico empleada en la segunda hidrólisis se obtuvo de la siguiente forma:

$$L = 12146,85 \text{ mL} * \frac{1,00632 \text{ g}}{\text{mL}} = 12223,62 \text{ g}$$

Balance de masa general

$$J + L = M + N$$

$$809,79 \text{ g} + 12223,62 \text{ g} = 9077,08 \text{ g} + N$$

$$N = 3956,33 \text{ g}$$

Cálculo de la composición del flujo N

El contenido de celulosa en el bagazo residual del segundo filtrado se calculó al considerar la celulosa en el bagazo antes de la segunda hidrólisis y la glucosa en el filtrado.

$$\text{Celulosa} = \text{masa}_{\text{celulosa en F}} - 0,9 * \text{Hidrolizado}_2 * x_{\text{glucosa}}$$

$$\text{Celulosa} = 386,78 \text{ g} - 0,9 * 5,38 \text{ g/L} * 9,02 \text{ L}$$

$$\text{Celulosa} = 343,11 \text{ g}$$

El contenido de hemicelulosa se obtuvo al considerar la hemicelulosa en el bagazo antes de la segunda hidrólisis.

$$\text{Hemicelulosa} = \text{masa}_{\text{hemicelulosa en F}}$$

$$\text{Hemicelulosa} = 207,44 \text{ g}$$

El contenido de lignina se estimó a partir de la lignina presente en el bagazo antes de la segunda hidrólisis y los compuestos fenólicos en el filtrado.

$$\text{Lignina: } \text{masa}_{\text{lignina en F}} - \text{Hidrolizado}_2 * x_{\text{compuestos fenólicos}}$$

$$\text{Lignina} = 100,85 \text{ g} - 2,746 \text{ g/L} * 9,02 \text{ L}$$

$$\text{Lignina} = 76,08 \text{ g}$$

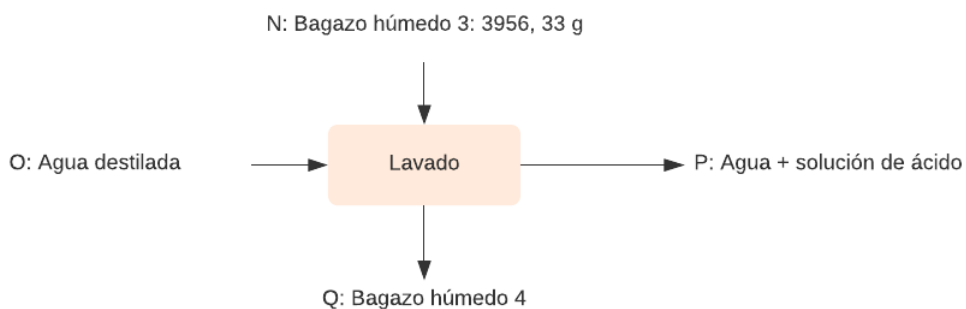
El restante se consideró es solución de ácido sulfúrico remanente

$$\text{Solución de ácido remanente} = N - \text{Celulosa} - \text{Hemicelulosa} - \text{Lignina}$$

$$\text{Solución de ácido remanente} = 3956,33 \text{ g} - 343,11 \text{ g} - 207,44 \text{ g} - 76,08 \text{ g}$$

$$\text{Solución de ácido remanente} = 3329,7 \text{ g}$$

2.6 Balance de masa en el segundo lavado



Para determinar el valor de O se sabe que fue 5 veces mayor al hidrolizado obtenido de la segunda filtración.

$$O = 5 * M = 5 * 9077,08 \text{ g} = 45385,40 \text{ g}$$

El valor de P se calculó considerando que la solución de ácido remanente en N y el 99% del agua destilada inicial se quedó en P.

$$P: \text{Solución de ácido remanente}_N + 0,99 * O$$

$$P = 3329,07 + 0,99 * 45385,40 \text{ g}$$

$$P = 48261,25 \text{ g}$$

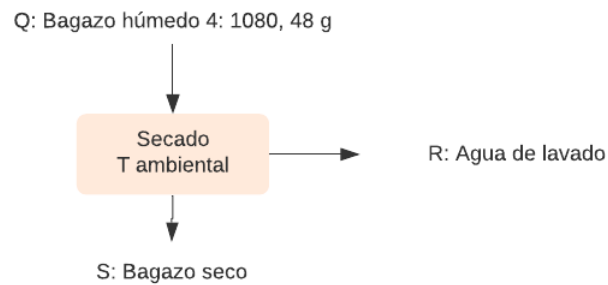
Balance de masa general

$$N + O = P + Q$$

$$3956,33 \text{ g} + 45385,40 \text{ g} = 48261,25 \text{ g} + Q$$

$$Q = 1080,48 \text{ g}$$

2.7 Balance de masa en el segundo secado



El secado se realizó hasta obtener un 10 % de agua en base húmeda.

Balance de masa general

$$Q = R + S$$

$$1080,48 \text{ g} = R + S$$

Balance de masa de agua

$$Q * x_Q = R * x_R + S * x_S$$

$$1080,48 \text{ g} * 0,40 = S * 0,1 + R$$

$$S = 720,32 \text{ g}; R = 360,16 \text{ g}$$

3. Consumo energético en la hidrólisis

3.1 Secado

En el secado se realizó un balance de energía para calcular el consumo energético.

Balance de energía

$$-\Delta H_{aire} = \Delta H_{bagazo\ de\ caña}$$

$$\Delta H_{bagazo\ de\ caña} = m_{BH} * C_{pBH} * T_{BH} - m_{BS} * C_{pBS} * T_{BS}$$

Donde:

m_{BH} : masa del bagazo de caña húmedo

C_{pBH} : calor específico del bagazo de caña húmedo

T_{BH} : temperatura del bagazo de caña húmedo

m_{BS} : masa del bagazo de caña seco

C_{pBS} : calor específico del bagazo de caña seco

T_{BS} : temperatura del bagazo de caña seco

Los calores específicos se calcularon en función de la humedad presente en cada bagazo.

$$\Delta H_{bagazo\ de\ caña} = m_{BS} * C_{pBS} * T_{BS} - m_{BH} * C_{pBH} * T_{BH}$$

$$\Delta H_{bagazo} = 0,974\ kg * (0,10 * 4,18 + 0,9 * 1,33) * 35\ ^\circ C - 1\ kg * (0,12 * 4,18\ kJ / kg\ ^\circ C + 0,88 * 1,33) * 25\ ^\circ C$$

$$\Delta H_{bagazo\ de\ caña} = 13,25\ kJ$$

3.2 Primera hidrólisis

El consumo energético en las hidrólisis se obtuvo con la Ecuación 5.2

$$Q = m_1 * C_{p1} * \Delta T + m_2 * C_{p2} * \Delta T$$

Ecuación 5.2. Calor ganado

Donde:

m_1 : masa del bagazo de caña seco

C_{p1} : calor específico del bagazo de caña seco

m_2 : masa de la solución de ácido sulfúrico

C_{p2} : calor específico de mezcla de la solución de ácido sulfúrico

ΔT : variación de temperatura

El calor específico de mezcla de la solución de ácido sulfúrico se calculó mediante la Ecuación 5.3.

$$C_{p \text{ mezcla}} = C_{p1} * x_1 + C_{p2} * x_2$$

Ecuación 5.3. Calor específico de mezcla

Donde:

C_{p1} : calor específico del ácido sulfúrico 1,42 kJ/ kg °C

x_1 : fracción másica de ácido sulfúrico

C_{p2} : calor específico del agua 4,18 kJ/ kg °C

x_2 : fracción másica de agua

Cálculo del calor específico de mezcla

$$C_{p \text{ solución}} = 1,42 \text{ kJ/ kg } ^\circ\text{C} * \frac{146,1 \text{ mL} * \frac{1,83 \text{ g}}{\text{mL}}}{14702,34 \text{ g}} + 4,18 \text{ kJ/ kg } ^\circ\text{C} * \frac{14463,90 \text{ mL} * \frac{0,998 \text{ g}}{\text{mL}}}{14702,34 \text{ g}}$$

$$C_{p \text{ mezcla solución}} = 4,13 \text{ kJ/ kg } ^\circ\text{C}$$

Cálculo del consumo energético

$$Q_1 = 0,97 \text{ kg} * (0,1 * 4,18 \text{ kJ/ kg } ^\circ\text{C} + 0,9 * 1,33 * \text{kJ/ kg } ^\circ\text{C}) * (140 - 25) + 14,70 * 4,13 \text{ kJ/ kg } ^\circ\text{C} * (140 - 25)$$

$$Q_1 = 7161,92 \text{ kJ}$$

3.3 Segunda hidrólisis

El consumo energético en esta etapa se calculó considerando calores específicos de mezcla tanto para el bagazo de caña como para la solución de ácido sulfúrico.

$$Q_2 = 0,81 \text{ kg} * (0,1 * 4,18 \text{ kJ/ kg } ^\circ\text{C} + 0,9 * 1,62 \text{ kJ/ kg } ^\circ\text{C}) * (180 - 25) + 12,22 * 4,13 \text{ kJ/ kg } ^\circ\text{C} * (180 - 25)$$

$$Q_2 = 8026,02 \text{ kJ}$$

3.4 Consumo energético total

$$Q_T = Q_1 + Q_2$$

$$Q_T = 15201,19 \text{ kJ}$$

ANEXO III

1. Composición del bagazo de caña, celulignina y celulignina parcialmente deslignificada

Tabla 5.3. Composición del bagazo de caña en estado natural

Componente	Contenido (%)
Celulosa	34,70 %
Hemicelulosa	25,20 %
Lignina	19,20 %
Cenizas	1 %
Humedad	19,9 %

Tabla 5.4. Composición del residuo sólido denominado celulignina

Componente	Contenido (%)
Celulosa	47,80 %
Hemicelulosa	14,60 %
Lignina	25,70 %
Cenizas	0,1 %
Humedad	11, 8 %

Tabla 5.5. Composición del residuo sólido denominado celulignina parcialmente deslignificada

Componente	Contenido (%)
Celulosa	67,10 %
Hemicelulosa	12,50 %
Lignina	5,50 %
Humedad	14,9 %

2. Balances de masa en la hidrólisis enzimática

2.1 Balance de masa en el pretratamiento ácido y filtrado

Cálculo de la masa de la fracción sólida después del filtrado

Se estimó el valor en masa del residuo sólido (celulignina) obedeciendo la Ecuación 5.4, dado que la masa de celulosa inicial se mantiene hasta después del filtrado y que el porcentaje másico de celulosa es de 47,80 % en dicho residuo según Méndez et al. (2016, p.2).

$$\%m/m = \frac{\text{masa del azúcar}}{\text{Masa total de celulignina}} * 100$$

Ecuación 5.4. Porcentaje másico

$$47,80 = \frac{347 \text{ g}}{F} * 100$$

$$F = 725,94 \text{ g}$$

Cálculo de la solución ácida

El volumen de la solución ácida se estimó acorde a la relación sólido - líquido (1:2,8) reportada por Méndez et al. (2016, p.2).

$$V_{\text{solución ácida}} = 2,8 * A$$

$$V_{\text{solución ácida}} = 2,8 * 1000 \text{ g} = 2800 \text{ mL}$$

La densidad de la solución de ácido sulfúrico al 1,09 % (v/v), se calculó con la Ecuación 5.5.

$$\delta_{\text{mezcla}} = \frac{m_{H_2SO_4} + m_{H_2O}}{V_{H_2SO_4} + V_{H_2O}}$$

Ecuación 5.5. Densidad de mezcla

$$\delta_{\text{solución } H_2SO_4} = \frac{30,52 \text{ mL} * \frac{1,83 \text{ g}}{\text{mL}} + 2769,48 \text{ mL} * \frac{0,998 \text{ g}}{\text{mL}}}{2800 \text{ mL}}$$

$$\delta_{\text{solución } H_2SO_4} = 1,007 \text{ g/mL}$$

Mediante la densidad se calculó el valor másico de la solución ácida de la siguiente forma:

$$B = \delta_{\text{solución H}_2\text{SO}_4} * V_{\text{solución ácida}}$$

$$B = 1,007 \text{ g/mL} * 2800 \text{ mL} = 2819,60 \text{ g}$$

Balance de masa general en el pretratamiento y filtrado

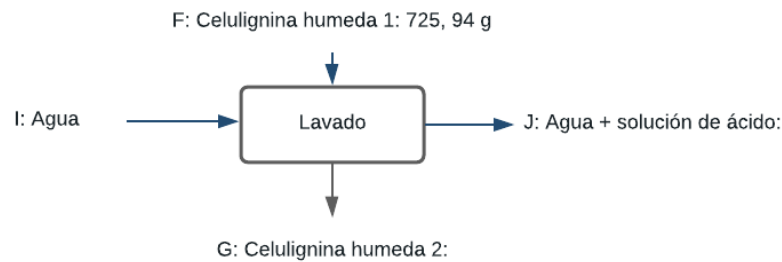


$$A + B = D + F$$

$$1000 \text{ g} + 2819,60 \text{ g} = D + 725,94 \text{ g}$$

$$D = 3093,66 \text{ g}$$

2.2 Balance de masa en el lavado



La masa de agua requerida para el lavado es 5 veces el filtrado obtenido.

$$I = 5 * D$$

$$I = 5 * 3093,66 \text{ g} = 15468,30 \text{ g}$$

La masa en J se calculó de la siguiente forma:

$$J = 0,99 * I + \text{masa}_{\text{solución de ácido remanente}}$$

$$J = 0,99 * 15468,30 \text{ g} + 0,118 * 725,94 \text{ g}$$

$$J = 15399,28 \text{ g}$$

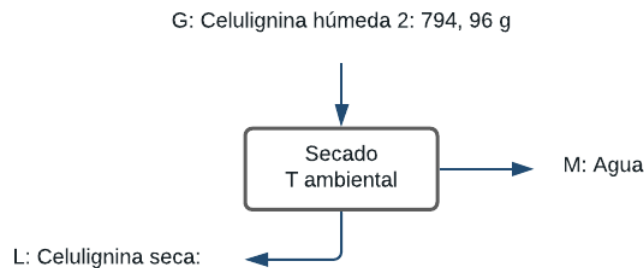
Balance de masa general

$$F + I = J + G$$

$$725,94 \text{ g} + 15468,30 \text{ g} = 15399,28 \text{ g} + G$$

$$G = 794,96 \text{ g}$$

2.3 Balance de masa en el secado



Balance de masa general

$$G = L + M$$

$$794,96 \text{ g} = L + M$$

Balance de masa de agua

$$G * x_G = L * x_L + M * x_M$$

$$794,96 * 0,1945 = L * 0,1 + M$$

$$L = 711,49 \text{ g}; M = 83,47 \text{ g}$$

2.4 Balance de masa en el segundo pretratamiento y filtrado

Cálculo de la masa de la fracción sólida después del filtrado

Se estimó el valor en masa del residuo sólido (celulignina parcialmente designificada) obedeciendo la Ecuación 5.4, dado que la masa de celulosa inicial se mantiene hasta después del segundo filtrado y que el porcentaje másico de celulosa es de 67,1 % en dicho residuo según Méndez et al. (2016, p.2).

$$67,10 = \frac{347 \text{ g}}{P} * 100$$

$$P = 517,14 \text{ g}$$

Cálculo de la solución alcalina

El volumen de la solución alcalina se estimó acorde a la relación sólido - líquido (1: 20) reportada por Méndez et al. (2016, p.2).

$$V_{\text{solución alcalina}} = 20 * L$$

$$V_{\text{solución alcalina}} = 20 * 711,49 \text{ g} = 14229,8 \text{ mL}$$

La densidad de la solución de hidróxido de sodio al 4 % (p/v), se calculó con la Ecuación 5.6.

$$\delta_{\text{mezcla}} = \frac{m_{\text{NaOH}} + m_{\text{H}_2\text{O}}}{V_{\text{NaOH}} + V_{\text{H}_2\text{O}}}$$

Ecuación 5.6. Densidad de mezcla

$$\delta_{\text{solución NaOH}} = \frac{569,19 \text{ g} + 13962,57 \text{ mL} * \frac{0,998 \text{ g}}{\text{mL}}}{14229,80 \text{ mL}}$$

$$\delta_{\text{solución NaOH}} = 1,019 \text{ g/mL}$$

Mediante la densidad se calculó el valor másico de la solución alcalina de la siguiente forma:

$$H = \delta_{\text{solución NaOH}} * V_{\text{solución alcalina}}$$

$$H = 1,019 \text{ g/mL} * 14229,8 \text{ mL} = 14503,83 \text{ g}$$

Balance de masa general en el pretratamiento y filtrado



$$L + H = N + P$$

$$711,49 \text{ g} + 14503,83 \text{ g} = N + 517,14 \text{ g}$$

$$N = 14697,83 \text{ g}$$

2.5 Balance de masa en la hidrólisis

El volumen de trabajo, compuesto por la solución tampón más el volumen de los complejos de celulasas, requerido para el proceso se calculó acorde a la concentración de sustrato (25 g/L) mencionada por Méndez et al. (2016, p.2).

$$\text{Concentración sustrato} = \frac{\text{Masa}_{\text{sustrato}}}{V_{\text{TRABAJO}}}$$

$$25 \text{ g/L} = \frac{517,14 \text{ g}}{V_{\text{TOTAL}}}$$

$$V_{\text{TRABAJO}} = 20,69 \text{ L}$$

Masa de la solución tampón utilizada en la hidrólisis

$$m_V = V_{\text{TRABAJO}} * \delta_{\text{H}_2\text{O}}$$

$$m_V = 20,69 \text{ L} * 1000 * 0,998 \text{ g/mL} = 20648,62 \text{ g}$$

La cantidad de cóctel enzimático requerida para la hidrólisis en términos de proteína se estimó considerando una carga de 10 mg/ g de celulosa.

$$\text{masa cóctel enzimático} = \text{carga enzimática} * \text{celulosa}_V$$

$$\text{masa cóctel enzimático} = 10 \text{ mg/ g celulosa} * 347 \text{ g}$$

$$\text{masa cóctel enzimático} = 3470 \text{ mg} = 3,47 \text{ g}$$

Cálculo de la masa de hidrolizado después del filtrado

La masa de hidrolizado se obtuvo a partir del rendimiento (91 %) reportado por Méndez et al. (2016, p.4) y la concentración de glucosa (17, 27 g/L) relacionadas mediante la Ecuación 2.1.

$$91 = \frac{17,27 \text{ g/L} * V_{\text{hidrolizado}} * 0,9}{347 \text{ g}} * 100$$

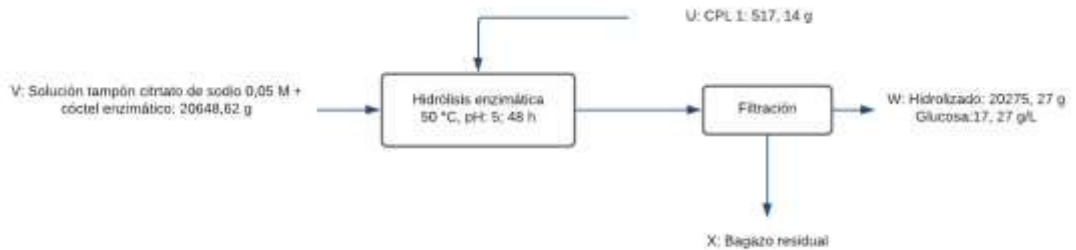
$$V_{\text{hidrolizado}}: 20,32 \text{ L}$$

Considerando la densidad del hidrolizado similar a la densidad del agua, se calculó el valor de la masa.

$$m_{hidrolizado} = V_{hidrolizado} * \delta_{H_2O}$$

$$m_{medio} = 20,32 L * 1000 * 0,998 g/mL = 20275,27 g$$

Balance de masa general



$$U + V = X + W$$

$$517,14 g + 20648,62 g = X + 20275,27 g$$

$$X = 890,49 g$$

Composición del bagazo residual X

El contenido de celulosa en el bagazo residual se calculó al considerar la celulosa en el bagazo antes de hidrólisis y la glucosa en el filtrado.

$$Celulosa = masa_{celulosa en U} - Hidrolizado * x_{glucosa} * 0,9$$

$$Celulosa = 347 g - 20,32 L * 17,27 g/L * 0,9$$

$$Celulosa = 31,17 g$$

El contenido de hemicelulosa es similar al presente en el CPL.

$$Hemicelulosa = X_{hemicelulosa en U} * U$$

$$Hemicelulosa = 0,125 * 517,14 g = 64,64 g$$

El contenido de lignina también es similar al presente en el CPL.

$$Lignina = X_{lignina en U} * U$$

$$Lignina = 0,055 * 517,14 g = 28,44 g$$

La masa restante del bagazo residual en X estuvo constituida por el hidrolizado que se perdió en el filtrado.

$$m_{hidrolizado\ perdido} = X - m_{celulosa} - m_{hemicelulosa} - m_{lignina} - m_{proteinas}$$

$$m_{hidrolizado\ perdido} = 890,49\ g - 31,17\ g - 64,64\ g - 28,44\ g - 3,47\ g$$

$$m_{hidrolizado\ perdido} = 764,77\ g$$

3. Cálculos en la producción de celulasas

3.1 Producción de celulasas por el microorganismo *T. harzianum*

Con base a la metodología indicada en el apartado 2 se realizaron los siguientes cálculos previos.

Volumen del filtrado

Dada la pérdida del 10% del medio inicial durante la filtración se obtiene un filtrado igual a:

$$V_{filtrado} = 0,9 * V_{medio\ inicial}$$

$$V_{filtrado} = 0,9 * 8\ L = 7,2\ L$$

Volumen del complejo de celulasa

El volumen del complejo de celulasa se calculó considerando la reducción de 48 veces el filtrado.

$$v_{complejo\ de\ celulasa} * 48 = v_{filtrado}$$

$$v_{complejo\ de\ celulasa} = \frac{7,2\ L}{48} = 0,15\ L$$

Méndez et al. (2016) demostraron que *T. harzianum* tuvo una alta producción de CMCCase (endoglucanasas) con una actividad enzimática específica de 36,4 U/ mg (pp. 3- 2). Bajo las mismas condiciones operativas Rocha et al. (2013) indicaron una concentración enzimática de 27,017 U/ mL (p.6). Para estimar si el complejo de celulasas presentó al menos la cantidad necesaria de endoglucanasas para la hidrólisis de CPL se aplicó la Ecuación 5.7. y Ecuación 5.8.

$$Actividad\ específica\ (U/mg) = \frac{Concentración\ enzimática\ (U/mL)}{Concentración_{proteinas}\ (mg/mL)}$$

Ecuación 5.7. Actividad enzimática específica

$$\text{Masa de proteína (mg)} = \text{Concentración}_{\text{proteínas}} (\text{mg/mL}) * v_{\text{complejo de celulasa}} (\text{mL})$$

Ecuación 5.8. Cálculo de la cantidad de proteína en el complejo de celulasa

Cantidad de proteína en el complejo de celulasa

$$36,4 \text{ U/mg} = \frac{27,017 \text{ U/mL}}{\text{Concentración}_{\text{proteínas}} (\text{mg/mL})}$$

$$\text{Concentración}_{\text{proteínas}} = 0,74 \text{ mg/mL}$$

$$\text{Masa de proteína} = 0,74 \text{ mg/mL} * 0,15 \text{ L} * 1000 = 111,33 \text{ mg}$$

El cóctel enzimático analizado por Méndez et al. (2016) contenía un 15% de proteínas de *T. harzianum*, 50% de *P. funiculosum* y 35% de *A. niger*. Por ende, para hidrolizar 517, 21 g de CPL se necesitan 510 mg de proteína de *T. harzianum*. Con el volumen de medio y preinóculo descritos en el apartado 2 no se logra la cantidad de proteína requerida en el proceso, siendo necesario estimar un nuevo volumen de medio con la Ecuación 5.9.

$$v_2 = \frac{\text{masa}_{\text{proteína requerida}} * v_1}{\text{masa}_{\text{proteína en } v_1}}$$

Ecuación 5.9. Volumen de complejo de celulasa para 517, 21 g de CPL

Donde:

v_2 : Volumen de complejo de celulasa necesario para hidrolizar 517, 21 g de CPL

v_1 : Volumen de complejo de celulasa a partir de 8 L de medio.

$$v_2 = \frac{510 \text{ mg} * 150 \text{ mL}}{111,33 \text{ mg}}$$

$$v_2 = 687,15 \text{ mL} \approx 687 \text{ mL}$$

El volumen del complejo de celulasa fue 48 veces el volumen del filtrado.

$$v_{\text{nuevo filtrado}} = 48 * v_2$$

$$v_{\text{nuevo filtrado}} = 48 * \frac{687 \text{ mL}}{1000} = 32,98 \text{ L}$$

El volumen del filtrado representó el 90% del medio inicial.

$$v_{\text{nuevo filtrado}} = 0,9 * v_{\text{medio inicial}}$$

$$v_{\text{medio inicial}} = \frac{32,98 \text{ L}}{0,9} = 36,64 \text{ L}$$

El volumen del preinóculo fue el 10% del volumen inicial de medio.

$$v_{preinóculo} = 0,1 * v_{medio\ inicial}$$

$$v_{preinóculo} = 0,1 * 36,64\ L = 3,66\ L$$

La cantidad de glicerol se estimó en base a su porcentaje volumétrico (5%).

$$v_{glicerol} = \%_{volumétrico} * v_2$$

$$v_{glicerol} = \frac{5\ mL\ glicerol}{100\ mL\ complejo\ celulasa} * 687\ mL$$

$$v_{glicerol} = 34,35\ mL$$

3.2 Producción de celulasas por el microorganismo *P. funiculosum*

Como se indica en el apartado 2 la generación de celulasas de *P. funiculosum* en términos de volúmenes de medio y preinóculo es similar al caso de *T. harzianum*, la diferencia se da en la concentración del medio filtrado que es de 36 veces. La actividad enzimática específica es de 16, 2 U / mg y 3, 9 U / mg para endoglucanasas y β - glucosidasas respectivamente. Mientras que la concentración de enzimas es de 6, 917 U/mL para endoglucanasas y 1, 375 U/ mL para β - glucosidasas (Méndez et al., 2016, p.2; Maeda et al., 2010, p. 421). Con los datos mencionados se estimó si el complejo de celulasas contenía la cantidad de proteínas necesarias para hidrolizar 517, 21 g de CPL.

Primero se calculó el volumen de complejo de celulasas después de la filtración.

$$v_{complejo\ de\ celulasa} * 36 = v_{filtrado}$$

$$v_{complejo\ de\ celulasa} = \frac{7,2\ L}{36}$$

$$v_{complejo\ de\ celulasa} = 0,2\ L$$

La cantidad de proteínas se estimó mediante la Ecuación 5.7. y Ecuación 5.8.

Cantidad de endoglucanasas

$$16,2\ U/mg = \frac{6,917\ U/mL}{Concentración_{proteínas}\ (mg/mL)}$$

$$Concentración_{proteínas} = 0,43\ mg/mL$$

$$\text{Masa de proteína} = 0,43 \text{ mg/mL} * 0,2 \text{ L} * 1000 = 86 \text{ mg}$$

Cantidad de β - glucosidasas

$$3,9 \text{ U/mg} = \frac{1,375 \text{ U/mL}}{\text{Concentración}_{\text{proteínas}} (\text{mg/mL})}$$

$$\text{Concentración}_{\text{proteínas}} = 0,35 \text{ mg/mL}$$

$$\text{Masa de proteína} = 0,35 \text{ mg/mL} * 0,2 \text{ L} * 1000 = 70 \text{ mg}$$

Cantidad de proteína total

$$\text{Proteína total} = \text{masa}_{\text{endoglucanasas}} + \text{masa}_{\beta\text{-glucosidasas}}$$

$$\text{Proteína total} = 86 \text{ mg} + 70 \text{ mg} = 156 \text{ mg}$$

Para 517, 21 g de CPL se necesitan 1735 mg de proteínas producidas por *P. funiculosum*. Por ende, la metodología del apartado 2 no logró la cantidad requerida y se debió realizar un nuevo cálculo empezando con la Ecuación 5.9.

$$v_2 = \frac{1735 \text{ mg} * 200 \text{ mL}}{156 \text{ mg}}$$

$$v_2 = 2224,36 \text{ mL} \approx 2224 \text{ mL}$$

El volumen del complejo de celulasa fue 36 veces el volumen del filtrado.

$$v_{\text{nuevo filtrado}} = 36 * v_2$$

$$v_{\text{nuevo filtrado}} = 36 * \frac{2224 \text{ mL}}{1000} = 80 \text{ L}$$

El volumen del filtrado representó el 90% del medio inicial.

$$v_{\text{nuevo filtrado}} = 0,9 * v_{\text{medio inicial}}$$

$$v_{\text{medio inicial}} = \frac{80 \text{ L}}{0,9} = 88,88 \text{ L}$$

El volumen del preinóculo fue el 10% del volumen inicial de medio.

$$v_{\text{preinóculo}} = 0,1 * v_{\text{medio inicial}}$$

$$v_{\text{preinóculo}} = 0,1 * 88,88 \text{ L} = 8,88 \text{ L}$$

La cantidad de glicerol se estimó en base a su porcentaje volumétrico (5%).

$$v_{\text{glicerol}} = \%_{\text{volumétrico}} * v_2$$

$$v_{\text{glicerol}} = \frac{5 \text{ mL glicerol}}{100 \text{ mL complejo celulasa}} * 2224 \text{ mL}$$

$$v_{\text{glicerol}} = 111,2 \text{ mL}$$

3.3 Producción de celulasas por el microorganismo *A. niger*

El volumen de medio y preinóculo para la producción de celulasas de *A. niger* suficientes para hidrolizar 517, 21 g de CPL, se calculó de forma similar que en el caso de *T. harzianum* y *P. funiculosum*. La actividad enzimática específica de β - glucosidasas es de 39, 8 U/ mg y de endoglucanasas es de 1, 8 U/ mg, mientras que la concentración de proteínas es de 4, 75 U /mL y 0,068 U / mL para β - glucosidasas y endoglucanasas respectivamente (Dias, 2011, p. 57; Maeda et al., 2010, p. 2). Con los valores indicados se determinó si el complejo de celulasas contenía la cantidad de proteínas necesarias para el proceso.

El volumen de complejo de celulasas después de la filtración fue el siguiente:

$$v_{\text{complejo de celulasa}} * 6 = v_{\text{filtrado}}$$

$$v_{\text{complejo de celulasa}} = \frac{7,2 \text{ L}}{6}$$

$$v_{\text{complejo de celulasa}} = 1,2 \text{ L}$$

La cantidad de proteínas se estimó empleando la Ecuación 5.7. y Ecuación 5.8.

Cantidad de β - glucosidasas

$$39,8 \text{ U/mg} = \frac{4,75 \text{ U/mL}}{\text{Concentración}_{\text{proteínas}} (\text{mg/mL})}$$

$$\text{Concentración}_{\text{proteínas}} = 0,119 \text{ mg/mL}$$

$$\text{Masa de proteína} = 0,119 \text{ mg/mL} * 1,2 \text{ L} * 1000 = 142,8 \text{ mg}$$

Cantidad de endoglucanasas

$$1,8 \text{ U/mg} = \frac{0,068 \text{ U/mL}}{\text{Concentración}_{\text{proteínas}} (\text{mg/mL})}$$

$$\text{Concentración}_{\text{proteínas}} = 0,037 \text{ mg/mL}$$

$$\text{Masa de proteína} = 0,037 \text{ mg/mL} * 1,2 \text{ L} * 1000 = 44,4 \text{ mg}$$

Cantidad de proteína total

$$\text{Proteína total} = \text{masa}_{\text{endoglucanasas}} + \text{masa}_{\beta\text{-glucosidasas}}$$

$$\text{Proteína total} = 44,4 \text{ mg} + 142,8 \text{ mg} = 187,2 \text{ mg}$$

Para 517, 21 g de CPL se necesitan 1214,5 mg de proteínas producidas por *A. niger*. Por ende, la metodología del apartado 2 no logró la cantidad requerida y se debió realizar un nuevo cálculo empezando con la Ecuación 5.9.

$$v_2 = \frac{1214,5 \text{ mg} * 450 \text{ mL}}{187,2 \text{ mg}}$$

$$v_2 = 2919,47 \text{ mL} \approx 2919 \text{ mL}$$

El volumen del complejo de celulasa fue 6 veces el volumen del filtrado.

$$v_{\text{nuevo filtrado}} = 6 * v_2$$

$$v_{\text{nuevo filtrado}} = 6 * \frac{2919 \text{ mL}}{1000} = 17,51 \text{ L}$$

El volumen del filtrado representó el 90% del medio inicial.

$$v_{\text{nuevo filtrado}} = 0,9 * v_{\text{medio inicial}}$$

$$v_{\text{medio inicial}} = \frac{17,51 \text{ L}}{0,9} = 19,46 \text{ L}$$

El volumen del preinóculo fue el 10% del volumen inicial de medio.

$$v_{\text{preinóculo}} = 0,1 * v_{\text{medio inicial}}$$

$$v_{\text{preinóculo}} = 0,1 * 19,46 \text{ L} = 1,95 \text{ L}$$

La cantidad de glicerol se estimó en base a su porcentaje volumétrico (5%).

$$v_{\text{glicerol}} = \%_{\text{volumétrico}} * v_2$$

$$v_{\text{glicerol}} = \frac{5 \text{ mL glicerol}}{100 \text{ mL complejo celulasa}} * 2919 \text{ mL}$$

$$v_{\text{glicerol}} = 145,95 \text{ mL}$$

3.4 Consumo de citrato de sodio para la solución tampón

Para determinar la cantidad de citrato de sodio requerido en el proceso se calculó el volumen de solución tampón que compone el volumen de trabajo de la hidrólisis.

$$v_{TRABAJO} = v_{celulasas T.harzianum} + v_{celulasas P.funiculosum} + v_{celulasas A.niger} \\ + v_{solución\ tampón}$$

$$v_{solución\ tampón} = 20,69\ L - 0,687\ L - 2,22\ L - 2,92\ L$$

$$v_{solución\ tampón} = 14,86\ L$$

La masa de citrato de sodio se estimó conociendo que su concentración fue 0,05 M.

$$m_{citrato\ de\ sodio} = \frac{0,05\ mol_{citrato\ de\ sodio}}{L_{solución\ tampón}} * \frac{258,06\ g_{citrato\ de\ sodio}}{1\ mol_{citrato\ de\ sodio}} * 14,86\ L$$

$$m_{citrato\ de\ sodio} = 191,74\ g$$

3.5 Consumo de bagazo de caña para la producción de celulasas

La cantidad de bagazo de caña necesario para obtener el CPL como sustrato en la producción de celulasas se calculó sumando los sustratos adicionados en cada proceso y considerando que de 1000 g de bagazo de caña se recupera el 51,72% como CPL. Este último dato se estimó en el punto 2 del presente ANEXO.

Masa de CPL total

$$PCL_{total} = PCL_{T.harzianum} + PCL_{P.funiculosum} + PCL_{A.niger}$$

$$PCL_{total} = 549,67\ g + 1333,2\ g + 292\ g$$

$$PCL_{total} = 2174,87\ g$$

Masa de bagazo de caña total

$$PCL_{total} = \%PCL_{recuperado} * masa_{bagazo\ caña}$$

$$masa_{bagazo\ caña} = \frac{2174,87\ g}{51,72} * 100 = 4205,09\ g$$

4. Consumo energético

4.1 Pretratamiento ácido

El consumo energético del pretratamiento ácido se obtuvo con la Ecuación 5.2, y el calor específico de mezcla de la solución ácida con la Ecuación 5.3.

$$C_{p\text{ mezcla}} = 1,42 \text{ kJ/ kg } ^\circ\text{C} * \frac{30,52 \text{ mL} * \frac{1,83 \text{ g}}{\text{mL}}}{2819,60 \text{ g}} + 4,18 \text{ kJ/ kg } ^\circ\text{C} * \frac{2769,48 \text{ mL} * \frac{0,998 \text{ g}}{\text{mL}}}{2819,60 \text{ g}}$$
$$C_{p\text{ mezcla}} = 4,13 \text{ kJ/ kg } ^\circ\text{C}$$

Cálculo del consumo energético

El calor específico del bagazo de caña se calculó acorde a su contenido de humedad.

$$Q_1 = 1 \text{ kg} * (0,19 * 4,18 \text{ kJ/ kg } ^\circ\text{C} + 0,81 * 1,33 \text{ kJ/ kg } ^\circ\text{C}) * (121 - 25) + 2,8 * 4,13 \text{ kJ/ kg } ^\circ\text{C} * (121 - 25)$$
$$Q_1 = 1289,81 \text{ kJ}$$

4.2 Pretratamiento alcalino

Para la solución de hidróxido de sodio el calor específico se calculó con base a la Ecuación 5.3., sabiendo que el calor específico y la densidad del hidróxido de sodio es igual a 1,46 kJ/ kg °C y 2,13 g/mL respectivamente.

$$C_{p\text{ solución}} = 1,46 \text{ kJ/ kg } ^\circ\text{C} * \frac{569,19 \text{ g}}{14503,83 \text{ g}} + 4,18 \text{ kJ/ kg } ^\circ\text{C} * \frac{13962,57 \text{ mL} * \frac{0,998 \text{ g}}{\text{mL}}}{14503,83 \text{ g}}$$
$$C_{p\text{ solución}} = 4,07 \text{ kJ/ kg } ^\circ\text{C}$$

El consumo energético del pretratamiento alcalino se estimó en función de la Ecuación 5.2. El calor específico de la celulignina se calculó considerando la humedad.

$$Q_2 = 0,71 \text{ kg} * (0,10 * 4,18 \text{ kJ/ kg } ^\circ\text{C} + 0,90 * 4,18 \text{ kJ/ kg } ^\circ\text{C}) * (121 - 25) + 14,50 * 4,07 \text{ kJ/ kg } ^\circ\text{C} * (121 - 25)$$
$$Q_2 = 5775,86 \text{ kJ}$$

4.3 Hidrólisis enzimática

El consumo energético se determinó usando la Ecuación 5.2. El calor específico se calculó basándose en la humedad del CPL.

$$Q_3 = 0,52 \text{ kg} * (1,33 \text{ kJ/ kg } ^\circ\text{C} * 0,851 + 4,18 \text{ kJ/ kg } ^\circ\text{C} * 0,149) * (50 - 25) + 20,65 * 4,18 \text{ kJ/ kg } ^\circ\text{C} * (50 - 25)$$

$$Q_3 = 2180,68 \text{ kJ}$$

4.4 Producción de celulasas

- Esterilización

El consumo energético en esta etapa se estimó empleando la Ecuación 5.2. y las condiciones mencionadas en el apartado 2.

$$Q_4 = 159,47 \text{ L} * 0,998 * 4,18 \text{ kJ/ kg } ^\circ\text{C} * (121 - 25)$$

$$Q_4 = 63864,14 \text{ kJ}$$

- *T. harzianum*

El consumo energético para generar el preinóculo y producir las celulasas se estimó con base a la Ecuación 5.2.

Consumo energético durante la agitación del preinóculo

$$Q_5 = 3,66 \text{ L} * 0,998 * 4,18 \text{ kJ/ kg } ^\circ\text{C} * (30 - 25)$$

$$Q_5 = 76,34 \text{ kJ}$$

Consumo energético durante la producción de celulasas

El calor específico del CPL se calculó en el punto 4.3 y fue igual a 1,75 kJ/ kg °C

$$Q_6 = m_{\text{medio} + \text{preinóculo}} * C_{pH_2O} * \Delta T + m_{\text{CPL}} * C_{p\text{CPL}} * \Delta T$$

$$Q_6 = (3,66 + 36,64) \text{ L} * 0,998 * 4,18 \text{ kJ/ kg } ^\circ\text{C} * (30 - 25) + 0,55 \text{ kg} * 1,75 \text{ kJ/ kg } ^\circ\text{C} * (30 - 25)$$

$$Q_6 = 845,39 \text{ kJ/ kg } ^\circ\text{C}$$

- *P. funiculosum*

Los cálculos fueron similares a los realizados para *T. harzianum*.

Consumo energético durante la agitación del preinóculo

$$Q_7 = 8,88 \text{ L} * 0,998 * 4,18 \text{ kJ/ kg } ^\circ\text{C} * (30 - 25)$$

$$Q_7 = 185,22 \text{ kJ}$$

Consumo energético durante la producción de celulasas

$$Q_8 = m_{\text{medio} + \text{preinóculo}} * C_{pH_2O} * \Delta T + m_{CPL} * C_{pCPL} * \Delta T$$

$$Q_8 = (8,88 + 88,88)L * 0,998 * 4,18 \text{ kJ}/\text{kg}^\circ\text{C} * (30 - 25) + 1,33 \text{ kg} * 1,75 \text{ kJ}/\text{kg}^\circ\text{C} * (30 - 25)$$

$$Q_8 = 2050,74 \text{ kJ}/\text{kg}^\circ\text{C}$$

- *A. niger*

Los cálculos fueron similares a los realizados para *T. harzianum*.

Consumo energético durante la agitación del preinóculo

$$Q_9 = 1,95 \text{ L} * 0,998 * 4,18 \text{ kJ}/\text{kg}^\circ\text{C} * (30 - 25)$$

$$Q_9 = 40,67 \text{ kJ}$$

Consumo energético durante la producción de celulasas

$$Q_{10} = m_{\text{medio} + \text{preinóculo}} * C_{pH_2O} * \Delta T + m_{CPL} * C_{pCPL} * \Delta T$$

$$Q_{10} = (1,95 + 19,46)L * 0,998 * 4,18 \text{ kJ}/\text{kg}^\circ\text{C} * (30 - 25) + 0,29 \text{ kg} * 1,75 \text{ kJ}/\text{kg}^\circ\text{C} * (30 - 25)$$

$$Q_{10} = 449,11 \text{ kJ}/\text{kg}^\circ\text{C}$$

4.5 Consumo energético total

$$Q_T = Q_1 + Q_2 + \dots + Q_{10}$$

$$Q_T = 1289,81 + 5775,86 + 2180,68 + 63864,14 + 76,34 + 845,39 + 185,22 + 2050,74 + 40,67 + 449,11$$

$$Q_T = 76757,96 \text{ kJ}$$