

ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL

**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y
AGROINDUSTRIA**

**ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE ENZIMA AMILASA MEDIANTE
ASPERGILLUS NIGER POR FERMENTACIÓN SÓLIDA, CON EL
USO DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES**

**PROYECTO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA
QUÍMICA**

ADRIANA PATRICIA ARGUERO TAYUPANTA
adry24_jab@hotmail.com

DIRECTORA: ING. NEYDA ESPÍN MSc.
neyda.espin@epn.edu.ec

Quito, abril 2014

© Escuela Politécnica Nacional (2014)
Reservados todos los derechos de reproducción

DECLARACIÓN

Yo, Adriana Patricia Arguero Tayupanta, declaro que el trabajo 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.

La Escuela Politécnica Nacional puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normativa institucional vigente.

Adriana Patricia Arguero Tayupanta

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por Adriana Patricia Arguero Tayupanta, bajo mi supervisión.

Ing. Neyda Espín
DIRECTORA DEL PROYECTO

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios y a la Virgencita por ser mi apoyo espiritual y bendecirme cada día.

A mis padres Patricio y Anita por haber estado junto a mí durante toda esta etapa, su apoyo y confianza fueron mi motivación en todo momento. Gracias por darme la educación y espero retribuirles de alguna manera todo el esfuerzo que han hecho por mí.

A mi hermano César y mi sobrinita Estefy por formar parte de mi vida, su presencia y cariño han sido muy importantes.

A toda mi familia de manera especial a mi abuelita María, mi tía Mónica, mi tío José Luis y mi prima Fernanda que han sido las personas más cercanas a mí y me han brindado mucho amor.

A Eduardo por ser la persona que me acompañó durante esta etapa, gracias por todo lo que hiciste por mí, lo llevaré siempre en mi corazón. Te agradezco por estar en los momentos más difíciles y haber confiado en mí. Fuiste una de mis mayores fortalezas; tu amor, apoyo y comprensión me hicieron muy feliz.

A las personas que compartieron conmigo y me ofrecieron su cariño sincero Jenny, Raúl, Carlitos, Jorge, Leo, Martín, Andre, Gaby, Anita, Vero, Danny y a todos los compañeros que me brindaron su ayuda.

A la Ingeniera Neyda Espín por su tiempo, paciencia y guía durante el desarrollo de este proyecto.

A Carlita, Lore, Katty, Fernando, Don Rodri, Don Camilo y Don Germán que me ayudaron durante el desarrollo de la parte experimental.

DEDICATORIA

A mi mami Anita, por ser una mujer íntegra y fuerte frente a los problemas, por apoyarme cada día y ser mi fortaleza para alcanzar las metas. Siempre vamos a superar todo juntas.

A mi papi Patricio, por ser un hombre trabajador y luchador, su perseverancia y honradez son valores muy valiosos que siempre serán un ejemplo para mí.

A mi hermano César, por ser un hombre fuerte y brindarme apoyo y compañía en los momentos más difíciles.

A Eduardo, por haberme entregado su apoyo, paciencia, tiempo, comprensión y especialmente su amor día a día.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	PÁGINA
RESUMEN	xii
INTRODUCCIÓN	xiii
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	1
1.1 Enzimas amilasas	1
1.1.1 Definición	1
1.1.2 Clasificación	1
1.1.2.1 α -amilasa	1
1.1.2.2 β -amilasa	4
1.1.2.3 Glucoamilasa	4
1.1.2.4 Pululanasa	5
1.1.3 Aplicaciones	5
1.1.3.1 Conversión del almidón	6
1.1.3.2 Industria de los detergentes	9
1.1.3.3 Producción de alcohol combustible	10
1.1.3.4 Industria de la alimentación	10
1.1.3.5 Industria textil	11
1.2 Producción de enzimas amilasas por fermentación sólida	11
1.2.1 Aspectos generales	11
1.2.2 Tipos de reactores en FMS	13
1.2.2.1 Reactores de lecho fijo	13
1.2.2.2 Reactores de bandeja	15
1.2.2.3 Reactores de tambor rotatorio	15
1.2.2.4 Reactores agitados	16
1.2.3 Variables del proceso	16
1.2.3.1 Temperatura	17
1.2.3.2 Aireación	18
1.2.3.3 Humedad	18
1.2.3.4 Tamaño de partícula	19
1.2.3.5 pH	19
1.2.3.6 Agitación	21
1.3 Residuos agroindustriales en el Ecuador	21
1.3.1 Cáscara de arroz	22
1.3.1.1 Características	22
1.3.1.2 Producción	23
1.3.2 Cáscara de papa	25
1.3.2.1 Características	25
1.3.2.2 Producción	26
1.3.3 Cáscara de trigo	27
1.3.3.1 Características	27
1.3.3.2 Producción	28

2.	PARTE EXPERIMENTAL	30
2.1	Materiales	30
2.2	Obtención del inóculo	33
2.3	Caracterización de las materias primas	34
2.4	Determinación del sustrato más adecuado para la producción de enzima amilasa por fermentación sólida	34
2.4.1	Determinación cualitativa de la producción de amilasa	34
2.4.2	Diseño experimental	35
2.4.3	Preparación del sustrato e inoculación	35
2.4.4	Determinación de la actividad amilásica	36
2.4.5	Determinación de la concentración de proteínas	37
2.5	Determinación de la influencia de la temperatura para la producción de enzima amilasa por fermentación sólida	38
2.6	Diseño de la planta de producción de enzima amilasa por fermentación sólida	38
2.6.1	Selección de la configuración de la planta piloto	38
2.6.2	Diseño de la planta a escala piloto	39
2.6.3	Control automático de la planta a escala piloto	40
2.7	Evaluación de la viabilidad técnico-económica de la producción de enzima amilasa a partir de residuos agroindustriales	41
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
3.1	Caracterización de las materias primas	45
3.2	Determinación del sustrato más adecuado y la influencia de la temperatura para la producción de amilasa por fermentación sólida	48
3.2.1	Determinación cualitativa de la producción de amilasa	48
3.2.2	Determinación de la actividad enzimática y la concentración de proteínas	49
3.2.2.1	Cáscara de arroz	51
3.2.2.2	Cáscara de papa	54
3.2.2.3	Cáscara de trigo	58
3.2.3	Determinación de las mejores condiciones para la producción de amilasa	62
3.2.3.1	Actividad enzimática	62
3.2.3.2	Concentración de proteínas	71
3.2.4	Evaluación del equipo y parámetros de fermentación	76
3.3	Diseño de la planta de producción de enzima amilasa por fermentación sólida	77
3.3.1	Selección de la configuración de la planta piloto	77
3.3.2	Diseño de la planta a escala piloto	79
3.3.3	Control automático de la planta a escala piloto	81

3.4	Evaluación de la viabilidad técnico-económica de la producción de enzima amilasa a partir de residuos agroindustriales	83
4.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	95
4.1	Conclusiones	95
4.2	Recomendaciones	96
	BIBLIOGRAFÍA	98
	ANEXOS	111

ÍNDICE DE TABLAS

		PÁGINA
Tabla 1.1.	Composición química de la cascarilla de arroz	23
Tabla 1.2.	Producción anual de la cascarilla de arroz en el Ecuador	24
Tabla 1.3.	Composición química de la cáscara de papa seca	25
Tabla 1.4.	Producción anual de cáscara de papa en el Ecuador	27
Tabla 1.5.	Composición química del salvado de trigo en base seca	28
Tabla 1.6.	Producción anual de salvado de trigo en el Ecuador	29
Tabla 2.1.	Reactivos empleados para el desarrollo del proyecto	30
Tabla 2.2.	Equipos empleados para la ejecución del proyecto	31
Tabla 2.3.	Normas para la caracterización química de las materias primas	34
Tabla 2.4.	Volumen de suspensión de esporas por cantidad de material seco	36
Tabla 2.5.	Factores directos que intervienen en la inversión fija de una planta que procesa material sólido	41
Tabla 2.6.	Factores indirectos que intervienen en la inversión fija de una planta que procesa material sólido	42
Tabla 2.7.	Factores que influyen en los costos anuales proporcionales a la inversión fija	43
Tabla 3.1.	Resultados de la caracterización química de las materias primas utilizadas como sustratos en la fermentación sólida	45
Tabla 3.2.	Análisis granulométrico de la cáscara de arroz utilizada como sustrato	46
Tabla 3.3.	Análisis granulométrico de la cáscara de papa empleada como sustrato	47
Tabla 3.4.	Análisis granulométrico del salvado de trigo usado como sustrato	47
Tabla 3.5.	Actividad enzimática con el tiempo en cáscara de arroz a 13 °C	51
Tabla 3.6.	Actividad enzimática con el tiempo en cáscara de arroz a 30 °C	51

Tabla 3.7.	Concentración de proteínas con el tiempo en cáscara de arroz a 13 °C	53
Tabla 3.8.	Concentración de proteínas con el tiempo en cáscara de arroz a 30 °C	53
Tabla 3.9.	Actividad enzimática con el tiempo en cáscara de papa a 13 °C	55
Tabla 3.10.	Actividad enzimática con el tiempo en cáscara de papa a 30 °C	55
Tabla 3.11.	Concentración de proteínas con el tiempo en cáscara de papa a 13 °C	57
Tabla 3.12.	Concentración de proteínas con el tiempo en cáscara de papa a 30 °C	57
Tabla 3.13.	Actividad enzimática con el tiempo en salvado de trigo a 13 °C	59
Tabla 3.14.	Actividad enzimática con el tiempo en salvado de trigo a 30 °C	59
Tabla 3.15.	Concentración de proteínas con el tiempo en salvado de trigo a 13 °C	61
Tabla 3.16.	Concentración de proteínas con el tiempo en salvado de trigo a 30 °C	61
Tabla 3.17.	Resultados de la producción enzimática con tres sustratos y dos temperaturas diferentes luego de 48 h de fermentación	67
Tabla 3.18.	Análisis de varianza del diseño experimental para la actividad enzimática	69
Tabla 3.19.	Resultados del estudio de la producción de α -amilasa en residuos agroindustriales	70
Tabla 3.20.	Resultados de la concentración de proteínas con tres sustratos y dos temperaturas diferentes luego de 48 h de fermentación	74
Tabla 3.21.	Análisis de varianza del diseño experimental para la concentración de proteínas	75
Tabla 3.22.	Resultados de la producción de proteínas en residuos agroindustriales	76
Tabla 3.23.	Condiciones de fermentación de la planta de producción de amilasa a escala piloto	79
Tabla 3.24.	Especificaciones del humidificador de la planta de producción de amilasa a escala piloto	80

Tabla 3.25.	Especificaciones del fermentador de la planta de producción de amilasa a escala piloto	80
Tabla 3.26.	Medidas de los reactores utilizados experimentalmente y el fermentador a escala piloto	81
Tabla 3.27.	Costo de los equipos principales para el proceso de fermentación (I _E) a escala piloto	84
Tabla 3.28.	Etapas para la extracción y purificación de amilasa	84
Tabla 3.29.	Requerimientos de materia prima para el proceso de fermentación a escala piloto	85
Tabla 3.30.	Precio de servicios industriales a escala piloto	85
Tabla 3.31.	Costo anual de la fuerza de trabajo requerida a escala piloto	85
Tabla 3.32.	Producción de amilasa y precio de venta a escala piloto	86
Tabla 3.33.	Inversión fija y capital de trabajo de la producción de amilasa a escala piloto	86
Tabla 3.34.	Costo total de la producción de amilasa a escala piloto	87
Tabla 3.35.	Datos generales empleados para el análisis económico de la planta a escala piloto	87
Tabla 3.36.	Flujo de caja del proyecto a escala piloto	88
Tabla 3.37.	Parámetros financieros del análisis económico del proyecto a escala piloto	89
Tabla 3.38.	Costo de los equipos principales para la producción de amilasa a escala industrial	90
Tabla 3.39.	Producción de amilasa y precio de venta a escala industrial	90
Tabla 3.40.	Costo anual de la fuerza de trabajo requerida a escala industrial	90
Tabla 3.41.	Inversión fija y capital de trabajo de la producción de amilasa a escala industrial	91
Tabla 3.42.	Costo total de la producción de amilasa a escala industrial	91
Tabla 3.43.	Datos generales empleados para el análisis económico de la planta a escala industrial	91
Tabla 3.44.	Flujo de caja del proyecto a escala industrial	92

Tabla 3.45.	Parámetros financieros del análisis económico del proyecto a escala industrial	93
Tabla AVI.1.	Datos de la variación de absorbancia con el tiempo para la determinación de la actividad amilásica en cáscara de arroz a 13 °C	121
Tabla AVI.2.	Datos de la variación de absorbancia con el tiempo para la determinación de la actividad amilásica en cáscara de arroz a 30 °C	122
Tabla AVI.3.	Datos de la variación de absorbancia con el tiempo para la determinación de la actividad amilásica en cáscara de papa a 13 °C	122
Tabla AVI.4.	Datos de la variación de absorbancia con el tiempo para la determinación de la actividad amilásica en cáscara de papa a 30 °C	123
Tabla AVI.5.	Datos de la variación de absorbancia con el tiempo para la determinación de la actividad amilásica en cáscara de trigo a 13 °C	123
Tabla AVI.6.	Datos de la variación de absorbancia con el tiempo para la determinación de la actividad amilásica en cáscara de trigo a 30 °C	124
Tabla AVII.1.	Datos de la variación de absorbancia con el tiempo para la determinación de la concentración de proteínas en cáscara de arroz a 13 °C	125
Tabla AVII.2.	Datos de la variación de absorbancia con el tiempo para la determinación de la concentración de proteínas en cáscara de arroz a 30 °C	126
Tabla AVII.3.	Datos de la variación de absorbancia con el tiempo para la determinación de la concentración de proteínas en cáscara de papa a 13 °C	126
Tabla AVII.4.	Datos de la variación de absorbancia con el tiempo para la determinación de la concentración de proteínas en cáscara de papa a 30 °C	127
Tabla AVII.5.	Datos de la variación de absorbancia con el tiempo para la determinación de la concentración de proteínas en cáscara de trigo a 13 °C	127
Tabla AVII.6.	Datos de la variación de absorbancia con el tiempo para la determinación de la concentración de proteínas en cáscara de trigo a 30 °C	128
Tabla AVIII.1.	Curva de calibración de la glucosa para calcular la actividad enzimática a $\lambda=490$ nm	129

Tabla AIX.1.	Curva de calibración para calcular la concentración de proteínas a $\lambda=555$ nm	131
Tabla AXI.1.	Tabla de amortización de crédito para la planta de producción de amilasa a escala piloto	137

ÍNDICE DE FIGURAS

		PÁGINA
Figura 1.1.	Estructura de la α -amilasa. El dominio A se muestra en rojo, el dominio B en amarillo y el dominio C, en color morado; el ion calcio se muestra en la esfera azul en el centro catalítico	3
Figura 1.2.	Enlaces glucosídicos α -1,4 de la amilosa	6
Figura 1.3.	Ramificaciones α -1,6 de la amilopectina	7
Figura 1.4.	Sistema de biorreactores en columna a escala laboratorio desarrollado y patentado por IRD	14
Figura 1.5.	Hectáreas sembradas en las provincias de mayor producción de arroz en el Ecuador	24
Figura 1.6.	Hectáreas sembradas en las provincias de mayor producción de papa en el Ecuador	26
Figura 1.7.	Hectáreas sembradas en las provincias de mayor producción de trigo en el Ecuador	29
Figura 2.1.	Esquema y dimensiones del reactor de lecho empacado	32
Figura 2.2.	Esquema del sistema de biorreactores empelados para la fermentación	33
Figura 2.3.	Diagrama de las dimensiones de un tanque	39
Figura 3.1.	Desarrollo del microorganismo <i>Aspergillus niger</i> 22343 en el medio de cultivo agar-almidón	48
Figura 3.2.	Prueba de lugol para la determinación cualitativa de la producción de enzima amilasa	49
Figura 3.3.	Curva de calibración de D-glucosa para determinar la actividad amilásica a $\lambda=490$ nm	50
Figura 3.4.	Curva de calibración de proteínas su concentración a $\lambda=555$ nm	50
Figura 3.5.	Actividad amilásica en función del tiempo en cáscara de arroz a 13 y 30 °C	52
Figura 3.6.	Concentración de proteínas en función del tiempo en cáscara de arroz a 13 y 30 °C	54

Figura 3.7.	Actividad amilásica en función del tiempo en cáscara de papa a 13 y 30 °C	56
Figura 3.8.	Concentración de proteínas en función del tiempo en cáscara de papa a 13 y 30 °C	58
Figura 3.9.	Actividad amilásica en función del tiempo en salvado de trigo a 13 y 30 °C	60
Figura 3.10.	Concentración de proteínas en función del tiempo en salvado de trigo a 13 y 30 °C	62
Figura 3.11.	Actividad amilásica en función del tiempo en los tres sustratos de fermentación a 13 °C	63
Figura 3.12.	Actividad amilásica en función del tiempo en los tres sustratos de fermentación a 30 °C	64
Figura 3.13.	Actividad amilásica en función del tiempo en los tres sustratos de fermentación a 13 y 30 °C	65
Figura 3.14.	Gráfica de medias del análisis estadístico de la actividad enzimática de los tratamientos realizados	68
Figura 3.15.	Concentración de proteínas en función del tiempo en los tres sustratos de fermentación a 13 °C	71
Figura 3.16.	Concentración de proteínas en función del tiempo en los tres sustratos de fermentación a 30 °C	72
Figura 3.17.	Concentración de proteínas en función del tiempo en los tres sustratos de fermentación a 13 y 30 °C	73
Figura 3.18.	Gráfica de medias del análisis estadístico de la concentración de proteínas de los tratamientos realizados	75
Figura 3.19.	Esquema del sistema de producción de amilasa por fermentación sólida a escala piloto	78
Figura 3.20.	Esquema del control automático de la planta de producción de amilasa a escala piloto	82
Figura AV.1.	Desarrollo del hongo en la cáscara de papa a 30 °C a las 48 h de fermentación	119
Figura AV.2.	Desarrollo del hongo en el salvado de trigo a 30 °C a las 48 h de fermentación	120

ÍNDICE DE ANEXOS

	PÁGINA
ANEXO I Determinación de resinas, ceras y grasas	112
ANEXO II Determinación de celulosa	114
ANEXO III Determinación de lignina	116
ANEXO IV Informe de resultados de la caracterización química de las materias primas	118
ANEXO V Desarrollo del microorganismo <i>Aspergillus niger</i> en los reactores de lecho empacado	119
ANEXO VI Datos de la variación de la absorbancia y humedad en la producción enzimática	121
ANEXO VII Datos de la variación de la absorbancia para la determinación de la concentración de proteínas	125
ANEXO VIII Cálculo de la actividad amilásica	129
ANEXO IX Cálculo de la concentración de proteínas	131
ANEXO X Diseño de la planta de producción de amilasa a escala piloto	133
ANEXO XI Análisis económico de la planta de producción de amilasa a escala piloto	136

RESUMEN

El objetivo del presente proyecto fue estudiar la producción de amilasa mediante el desarrollo del microorganismo *Aspergillus niger* en fermentación sólida con el uso de residuos agroindustriales, como la cáscara de arroz, papa y trigo; además se determinó la influencia de la temperatura en la generación del producto deseado, se trabajó a 13 y 30 °C. Se realizó el diseño de la planta a escala piloto y se estableció la factibilidad técnico-económica de la ejecución del proyecto.

Para el proceso fermentativo se inoculó el hongo en un sistema de biorreactores de lecho empacado, a cada uno de ellos ingresó un flujo de aire húmedo de 4 L/h. La actividad enzimática de la amilasa se midió con el método DNS y la determinación de proteínas se realizó mediante la reacción de Biuret.

El salvado de trigo presentó los mejores resultados de producción con un valor de 83,498 UI a 30 °C, seguido por la cáscara de papa con una actividad de 52,092 UI a la misma temperatura a las 48 h de fermentación. La cáscara de arroz mostró los resultados más bajos con una actividad enzimática de 12,471 UI a 30 °C, para este sustrato el incremento de temperatura no generó mejores resultados en la producción. La cáscara de trigo alcanzó la mayor concentración de proteínas con un valor de 0,146 gp/gss, seguido por la cáscara de papa con 0,085 gp/gss a 30 °C al finalizar el proceso de fermentación, lo cual coincidió con los resultados de la actividad enzimática.

Se realizó el diseño de la planta que incluyó un humidificador y un reactor, su configuración permite la recolección de muestras y el control de temperatura del lecho, que es uno de los factores más críticos en este tipo de fermentación. La planta de producción de amilasa con una capacidad de procesamiento de 165 250 kg de salvado de trigo al año presentó un VAN de 806 528 081, por lo que la inversión en el proyecto generaría un margen de utilidad; el TIR fue de 11 %, lo cual ofrece al inversionista una tasa de interés mayor a la que puede acceder en el mercado. Por esta razón el desarrollo de la planta a escala industrial fue técnico y económicamente factible.

INTRODUCCIÓN

La biotecnología es un campo que se encuentra en gran desarrollo y presenta una extensa aplicación, debido a que convierte residuos en productos de alto valor agregado. Los desechos agroindustriales son considerados como los mejores sustratos para los procesos de fermentación sólida, porque contienen cantidades apreciables de almidón y los nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos. El almidón debido a su variedad, disponibilidad y abundancia es un material de gran interés tecnológico (Costa, Torres, Magariños y Reyes, 2010, p. 164; Monteiro, de Oliveira y Magalhães, 2010, p. 850).

La actividad agroindustrial del Ecuador genera anualmente gran cantidad de residuos, convirtiéndose en un problema tanto ambiental como económico, debido al alto costo de su disposición final. Por esta razón, estos desechos pueden transformarse en materias primas baratas para la obtención de productos de interés. En este proyecto se emplearon como sustratos para la fermentación sólida, cáscara de arroz, papa y trigo porque son desechos asequibles, se generan en cantidad elevada dentro del Ecuador y presentan los mejores resultados en estudios similares realizados (Sánchez, Gutiérrez, Muñoz y Rivera, 2010, p. 61). La producción de cáscara de arroz fue de 344 418 TM, de cáscara de papa 57 020 TM y de cáscara de trigo 1 043 TM en el año 2012 (MAGAP, 2013).

Las amilasas son de gran importancia para la biotecnología, constituyen aproximadamente el 25 % del mercado mundial. Su función es degradar el almidón, por lo que tienen una aplicación potencial en un amplio número de procesos en la industria alimenticia, papelera, textil, farmacéutica y de fermentación (Monteiro et al., 2010, p. 850; Sharanappa, Wani y Patil, 2011, p. 473).

Para la producción de enzima amilasa, se emplean hongos especialmente del género *Aspergillus* en fermentación sólida o sumergida. La fermentación sólida se asemeja al hábitat natural del microorganismo, por lo que otorga mayor facilidad

de crecimiento; además es simple, de alta productividad, requiere menor capital, los volúmenes de fermentación son inferiores a los sumergidos, no necesita de un control riguroso de los parámetros de fermentación y el tratamiento del efluente es reducido (Anto, Trivedi y Patel, 2006, p. 1 161; Ruíz, Rodríguez Jasso, Rodríguez Herrera, Contreras y Aguilar, 2007, p. 34).

Una de las aplicaciones de las amilasas se encuentra en la producción de los biocombustibles a partir de almidón, cuyo proceso implica la transformación de la materia prima en azúcares, mediante hidrólisis enzimática que genera altos costos de producción (Castaño y Mejía, 2008, p. 252). En el Ecuador las industrias que emplean estas enzimas son Codana, Soderal y Producargo, las cuales están obligadas a pagar gastos de importación, aranceles y demás impuestos.

La gran cantidad de residuos agroindustriales que se generan en el Ecuador, el bajo costo y el escaso aprovechamiento industrial, hacen posible su utilización como sustrato para la producción de enzima amilasa, que plantea una alternativa de obtención a través de un proceso competitivo y rentable dentro del país.

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 ENZIMAS AMILASAS

1.1.1 DEFINICIÓN

Las amilasas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, pueden obtenerse de plantas (malta), animales (saliva y páncreas) y microorganismos (bacterias y mohos) (Suganthi et al., 2011, p. 1 756). Sin embargo, las enzimas procedentes de fuentes fúngicas y bacterianas por ser más estables tienen mayores aplicaciones en los sectores industriales. Las ventajas de la utilización de microorganismos para la producción de amilasas son la disponibilidad, alta productividad y facilidad de manipular los microorganismos para obtener enzimas de características deseadas (Monteiro et al., 2010, p. 850; Varalakshmi et al., 2008, p. 29).

Las amilasas son empleadas en el procesamiento del almidón, para hidrolizar los enlaces y obtener productos de bajo peso molecular como glucosa, maltosa y unidades de maltotriosa. Son de gran importancia para la biotecnología porque constituyen aproximadamente el 25 % del mercado de enzimas industriales (Monteiro et al., 2010, p. 850).

1.1.2 CLASIFICACIÓN

Las amilasas se clasifican de acuerdo con el tipo de hidrólisis que realizan sobre la molécula de almidón y son:

1.1.2.1 α -amilasa

La α -amilasa es la más popular e importante forma de amilasa industrial. Es una endoenzima que hidroliza al azar los enlaces α -1,4 glucosídicos de las moléculas

de amilosa y amilopectina para obtener maltosa, maltotriosa y oligosacáridos de varios tamaños. Las unidades terminales de glucosa y los enlaces α -1,6 no pueden ser fragmentados por esta enzima. Otras enzimas amilolíticas participan en el proceso de degradación de almidón, pero la contribución de la α -amilasa es la más importante para el inicio de este proceso (Espinel y López, 2009, p. 193; Ifan, Nadeem y Syed, 2012, p. 56).

Tiene un peso molecular de 40 a 50 kDa y presenta la máxima actividad enzimática en un rango de pH de 4,6 a 5,1. Las α -amilasas contienen calcio y su actividad depende de este ión, además dicho elemento estabiliza la conformación global de la enzima (Guadarrama, Orozco y Morales, 2007; Espinel y López, 2009, p. 206).

Esta enzima es conocida como licuante, debido a que disminuye rápidamente la viscosidad de las soluciones de almidón. Las propiedades y mecanismos de acción que presentan estas enzimas sobre la molécula de almidón dependen de su procedencia (Yubero, 2013, p. 16).

La α -amilasa se compone de una cadena polipeptídica plegada en tres dominios A, B y C, como se muestra en la Figura 1.3. El dominio catalítico A, es el más grande y presenta una forma de barril típica conformado por una superestructura $(\beta/\alpha)_8$. El dominio B está insertado entre los dominios A y C y está unido al dominio A por un enlace disulfuro. El dominio C tiene una β estructura de lámina ligada al dominio A por una cadena simple de polipéptidos y parece ser un dominio independiente con función desconocida (Monteiro et al., 2010, p. 851).

El sitio activo (unión al sustrato) de la α -amilasa se encuentra en una larga hendidura situada entre el extremo carboxilo de los dominios A y B. El calcio (Ca^{2+}) ubicado en la interfase que forma un puente iónico entre los dominios A y B estabiliza la hendidura del sitio activo (Monteiro et al., 2010, p. 851; Peña, Molina y Torres, 2009, p. 3).



Figura 1.1. Estructura de la α -amilasa. El dominio A se muestra en rojo, el dominio B, en amarillo y el dominio C, en color morado; el ion calcio se muestra en la esfera azul en el centro catalítico

(Monteiro et al., 2010, p. 851)

Existen amilasas de uso industrial, tanto de origen bacteriano como fúngico. La α -amilasa bacteriana es producida principalmente a partir del género *Bacillus* como *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis* y *B. amyloliquefaciens* que son conocidas por ser buenas productoras y tener un amplio uso en procesos industriales, debido a su rango de temperatura óptimo (25 - 90 °C) y resistencia a valores de pH extremos (1,0 - 11,5); la mayoría de las amilasas termoestables son de origen bacteriano (Quintero, Montoya y Gutiérrez, 2010, p. 32).

También los hongos filamentosos, tales como *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae*, producen en gran cantidad estas enzimas. En los países en desarrollo, los estudios se han concentrado especialmente en el microorganismo *Aspergillus*

niger, debido a su naturaleza ubicua, requerimiento nutricional no fastidioso y tolerancia a la acidez, lo cual evita la contaminación bacteriana. Se han encontrado amilasas de origen fúngico más estables que las enzimas bacterianas en una escala comercial. Las enzimas termolábiles son principalmente provenientes de hongos y actúan sin perder su actividad entre 20 y 55 °C (Gupta, A., Gupta, V., Modi y Yadava, 2008, p. 551; Monteiro et al., 2010, p. 855; Rinku, Liji, Rajila y Suganyadevi, 2012, p. 175; Suganthi et al., 2011, p. 1756).

1.1.2.2 β -amilasa

Es una exoenzima que rompe los enlaces α -1,4 glucosídicos en la parte externa del almidón, separa unidades de maltosa de los extremos no reductores de la cadena por hidrólisis alterna. Su acción es progresiva y se detiene cuando alcanza una ramificación porque no puede hidrolizar los enlaces α -1,6 de la amilopectina y el glucógeno, lo que da lugar a la formación de β -dextrinas limitantes. Estas enzimas atacan la amilosa solo desde un extremo a la vez, por lo que son menos efectivas que las α -amilasas (Anto et al., 2006, p. 161).

Las β -amilasas contienen un grupo sulfhidrilo esencial para la actividad enzimática, que se lleva a cabo de forma óptima en un rango de pH de 4,5 a 7,0, son sensibles a una acidez elevada y se vuelven inactivas a pH 3,3. Requieren de un activador de cloruro de sodio y el límite de temperatura está alrededor de 55 °C (Carrera, 2003, p. 11).

1.1.2.3 Glucoamilasa

Es una enzima de acción externa que hidroliza los enlaces α -1,4 y α -1,6 de los extremos no reductores, para producir como único producto final glucosa, a partir de almidón y polímeros relacionados (Anto et al., 2006, p. 161). Sin embargo, la glucoamilasa es incapaz de hidrolizar el almidón por completo a glucosa, ya que

la ruptura requiere de la participación de una enzima de acción interna (Irfan et al., 2012, p. 56).

Tiene un peso molecular de 60 a 100 kDa y presenta su actividad óptima en un rango de pH de 4 a 5 y temperatura de 50 a 60 °C. La hidrólisis de los enlaces ocurre a diferentes velocidades que depende del tamaño molecular, estructura del sustrato y los enlaces en la secuencia de la cadena, mientras la amilosa es transformada totalmente en maltosa, la cadena ramificada de amilopectina se conserva en un 40 - 45 % sin hidrolizar. El calcio estabiliza a esta enzima frente a la desnaturalización por el calor o el pH y no necesita de un activador para actuar (Carrera, 2003, p. 11; Rico, 1990, p. 61; Sánchez, Mejía, Figueroa, Esquivia, Agudelo y Zapata, 2004, p. 8).

1.1.2.4 Pululanasa

Es una enzima desramificante que actúa sobre los enlaces α -1,6 de la amilopectina, que libera como único producto la maltosa. Son utilizadas para mejorar la sacarificación, ya que elevan el rendimiento de la liberación de glucosa. La temperatura óptima está alrededor de 45 °C y el pH entre 4 y 5 (Carrera, 2003, p. 12).

1.1.3 APLICACIONES

Las amilasas tienen potencial aplicación en un amplio número de procesos de la industria alimenticia, textil, papel, detergente, farmacéutica y de fermentación. Sin embargo, con los avances en la biotecnología estas enzimas tienen expansión en muchos otros campos como la clínica, medicina y química analítica (Rinku et al., 2012, p. 175; Sharanappa et al., 2011, p. 473).

A continuación se detalla el uso de las amilasas en las principales industrias:

1.1.3.1 Conversión del almidón

La aplicación más extendida de α -amilasa está en la industria del almidón, la cual se utiliza para la hidrólisis en el proceso de licuefacción que convierte el almidón en jarabe de glucosa (Quintero et al., 2010, p. 32).

a. Almidón

El almidón es un polímero semicristalino de glucosa unido a otro a través de un enlace glucosídico, está formado por amilosa y amilopectina. Es el principal polisacárido de reserva de los vegetales y proporciona entre el 70 y el 80 % de las calorías consumidas por el ser humano (Peña et al., 2009, p. 2).

La amilosa es un polímero lineal que consta de 250 a 300 unidades de glucosa con enlaces α -1,4 glucosídicos, como se muestra en la Figura 1.2. Tiene un peso molecular de 200 a 800 kDa según la especie de la planta y estado de maduración. El contenido de amilosa es alrededor del 25 % del peso total del almidón; sin embargo, algunas variedades de maíz y arroz no contienen amilosa. La naturaleza lineal y de gran longitud confiere a la amilosa propiedades únicas como su capacidad para formar complejos con yodo, alcoholes o ácidos orgánicos (Martínez y Gragera, 2008, p. 362; Satyanarayana, Noorwez, Kumar, Rao, Ezhilvannan y Kaur, 2004, p. 276).

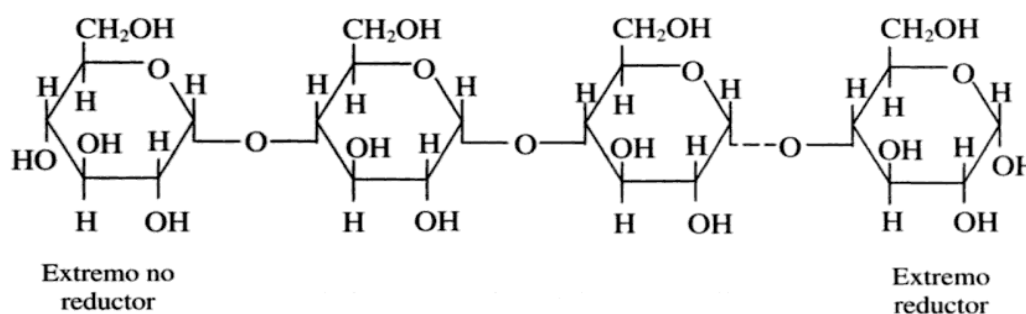


Figura 1.2. Enlaces glucosídicos α -1,4 de la amilosa
(Bello, 2000, p. 85)

La amilopectina es un polímero ramificado constituido por 1 000 a 3 000 unidades de glucosa, consiste en una vinculación de cadenas lineales cortas α -1,4 y ramificaciones esporádicas α -1,6 localizadas cada 15 a 25 unidades de glucosa como se indica en la Figura 1.3. Presenta un peso molecular muy alto en el orden de 10^8 Da, constituye alrededor del 75 % de los almidones más comunes y su tamaño depende del vegetal de procedencia. Algunos almidones están formados exclusivamente por amilopectina y se conocen como almidones céreos (Martínez y Gragera, 2008, p. 362; Namazi, Fathi y Heydari, 2012, p. 150; Satyanarayana et al., 2004, p. 276).

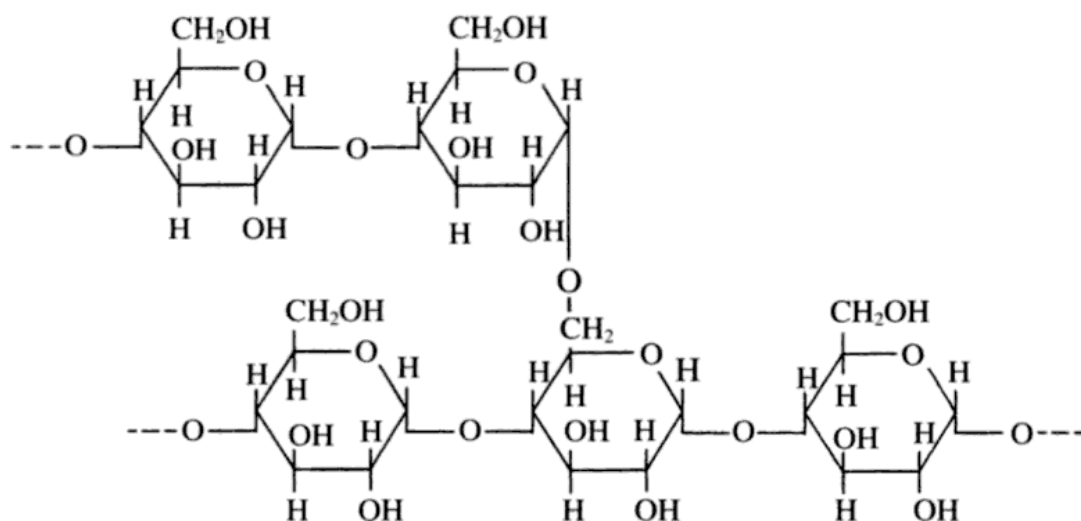


Figura 1.3. Ramificaciones α -1,6 de la amilopectina
(Bello, 2000, p. 86)

Las mayores fuentes industriales de almidón son el maíz, yuca, papa y trigo; pero, limitaciones tales como la baja resistencia al cizallamiento, descomposición térmica y alta tendencia hacia la retrogradación limita su uso en algunas aplicaciones industriales. Entre los polímeros de hidratos de carbono, el almidón actualmente disfruta de mayor atención, debido a que contribuye en gran medida a las propiedades de textura de muchos alimentos y es ampliamente utilizado como espesante, estabilizador coloidal, agente gelificante, agente de hinchamiento y agente de retención de agua (Johnson y Padmaja, 2013, p. 68; Monteiro et al., 2010, p. 852).

El almidón es importante en la dieta humana, se utiliza química y enzimáticamente procesado en una variedad de productos, tales como almidones modificados, maltodextrinas, jarabes de glucosa y fructosa, que se utilizan en la industria alimenticia (Van der Maarel, Van der Veen, Uitdehaag, Leemhuis y Dijkhuizen, 2002, p. 137).

b. Hidrólisis ácida

El almidón puede ser hidrolizado por ácido clorhídrico o sulfúrico para alcanzar una conversión parcial del almidón a D-glucosa, la reacción es endotérmica y de primer orden. El ácido cataliza la hidrólisis de los enlaces glucosídicos e introduce los elementos del agua en los puntos de ruptura. El peso molecular del almidón se reduce pero queda intacta la estructura cristalina del grano, porque el ácido sólo puede penetrar en las regiones amorfas del almidón (Tahezadeh y Karimi, 2007, p. 475).

El rendimiento de la reacción es función de la concentración del ácido, concentración del almidón y temperatura. Esta sacarificación química presenta serios inconvenientes tales como formación de productos no deseables, baja flexibilidad del producto, falta de equipo que resista al ácido y a las temperaturas requeridas del proceso. (Mera y Cataño, 2005, p. 55). Por lo anterior, los métodos enzimáticos se han convertido en una buena alternativa.

c. Hidrólisis enzimática

En la actualidad, un gran número de amilasas microbianas están disponibles a nivel comercial y han reemplazado casi completamente la hidrólisis química en la industria de procesamiento del almidón (Bedón, Nolasco, Santa Cruz y Gutiérrez, 2013, p. 51). El proceso de hidrólisis enzimática comprende las etapas consecutivas de licuefacción y sacarificación.

La licuefacción consiste en la hidrólisis parcial del almidón a dextrinas que disminuye la viscosidad. Este proceso se realiza con α -amilasas que requieren que el almidón se encuentre gelatinizado previamente; es decir, sometido a un proceso térmico en presencia de agua para aumentar la accesibilidad al sustrato. Las enzimas de bacterias termorresistentes como *Bacillus licheniformis* o *Bacillus amyloliquefaciens* son ideales para esta etapa, ya que se realiza a altas temperaturas que se encuentran en un rango de 80 a 110 °C; el pH para esta hidrólisis se debe mantener entre 6 y 7. La segunda etapa consiste en la hidrólisis total del almidón, es decir la conversión de dextrinas a glucosa, en este proceso se usan las glucoamilasas o amilogucosidasas obtenidas de *Aspergillus niger* o *Rhizopus sp.* Esta reacción se produce a temperaturas menores, de 60 a 70 °C y pH entre 4 y 5 (Hernández, 2003, p. 208; Ruíz, Molina, Torres y Sánchez, 2009, p. 2).

Esta técnica presenta ventajas como control de la formación de productos no deseados, mayor flexibilidad del producto y reducción en la demanda energética del proceso, ya que no requiere el uso de grandes presiones ni elevadas temperaturas. La composición de sacáridos obtenida después de hidrolizar el almidón depende, en gran medida, del efecto de la temperatura, las condiciones de hidrólisis y el origen de la enzima (Castaño y Mejía, 2008, p. 252; Mera y Cataño, 2005, p. 55).

1.1.3.2 Industria de los detergentes

Las amilasas son el segundo tipo de enzimas más utilizadas en la formulación de los detergentes, porque mejoran la capacidad para eliminar las manchas difíciles y hacen que el detergente sea ambientalmente seguro. Estas enzimas degradan los residuos de alimentos ricos en almidón tales como papas, salsas, natillas, chocolates para obtener dextrinas y otros oligosacáridos más pequeños (Corrêa, Moutinho, Martins Meire y Martins Marco, 2011, p. 843; Gurung, Ray, Bose y Rai, 2013, p. 6).

1.1.3.3 Producción de alcohol combustible

El almidón es el sustrato más empleado para la producción de etanol, debido a su bajo precio y materias primas fácilmente disponibles en la mayoría de las regiones del mundo. En este proceso el almidón tiene que ser solubilizado y sometido a dos pasos enzimáticos con el fin de obtener azúcares fermentables. Para la bioconversión se produce inicialmente la licuefacción con el uso de la enzima α -amilasa, a continuación se realiza la sacarificación que transforma las dextrinas en azúcar por acción de la glucoamilasa y por último la fermentación que transforma la glucosa en etanol al emplear un microorganismo como la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Cada proceso se realiza a una temperatura diferente y pH óptimo respecto a la máxima velocidad de reacción de la enzima (Azmi, Ngoh, Mel y Hasan, 2012, p. 34).

1.1.3.4 Industria de la alimentación

Las amilasas se emplean en la industria de alimentos procesados tales como pasteles, cerveza, zumos de frutas y jarabes de almidón, además han sido ampliamente utilizadas en la industria de la panificación (Monteiro et al., 2010, p. 857).

Estas enzimas se pueden añadir a la masa de pan para degradar el almidón de la harina en dextrinas más pequeñas, que son posteriormente fermentadas por la levadura; por esta razón las amilasas aceleran la fermentación y reducen la viscosidad de la masa. También generan azúcar adicional lo que mejora el sabor, color de la corteza y cualidades de tostado del pan; tienen un efecto antienviejimiento en la cocción e incrementan la retención de suavidad de los productos horneados, con lo cual aumenta la vida útil de estos productos (Gurung et al., 2013, p. 6; Yubero, 2013, p. 17).

1.1.3.5 Industria textil

Las amilasas se utilizan en la industria textil para el proceso de desengomado, que consiste en la eliminación del almidón que se aplica al hilo de la tela como agente de fortalecimiento, para garantizar un proceso de tejido rápido y seguro. El uso del almidón como agente de apresto es muy atractivo porque es barato, disponible en la mayoría de regiones del mundo y se puede retirar fácilmente (Monteiro et al., 2010, p. 857).

1.2 PRODUCCIÓN DE ENZIMAS AMILASAS POR FERMENTACIÓN SÓLIDA

1.2.1 ASPECTOS GENERALES

Aproximadamente el 90 % de las enzimas industriales son producidas por fermentación líquida mediante el uso de microorganismos manipulados genéticamente, lo cual ofrece ventajas insuperables sobre la fermentación en medio sólido (FMS). Sin embargo, todas estas enzimas pueden ser producidas por FMS con microorganismos sin manipular, lo cual genera interés para su estudio (Hölker, Höfer y Lenz, 2004, p. 176; Irfan et al., 2012, p. 56).

La FMS se basa en el crecimiento de microorganismos sobre la superficie de sólidos húmedos. El sustrato contiene agua que se encuentra retenida en la matriz porosa, la cual permite que se realicen las funciones vitales del microorganismo, dicha capacidad de retención de líquido varía según el tipo de material. En la FMS el agua libre únicamente aparece cuando se supera la capacidad de saturación de la matriz sólida (Prabhakar, Krishnaiah, Janaun y Bono, 2005, p. 10; Bhargav, Panda, Ali y Javed, 2008, p. 49).

La FMS se parece al hábitat natural del microorganismo, por lo que crece fácilmente en este medio y añade un valor agregado a los desechos empleados como sustratos (Espinel y López, 2009, p. 193; Milagres, Santos, Piovan y

Roberto, 2004, p. 1 387). Se trata de un proceso donde el sólido presenta una baja actividad de agua (a_w), que influye en aspectos fisiológicos de los microorganismos como son tipo de crecimiento, esporulación y germinación de esporas, además de la producción de metabolitos y enzimas y la actividad de las mismas (Bhargav et al., 2008, p. 50).

Los microorganismos adecuados para la FMS son hongos y levaduras de acuerdo con el concepto de actividad de agua; mientras que, las bacterias son consideradas inadecuadas; sin embargo, la experiencia ha demostrado que cultivos bacterianos pueden ser bien manejados y manipulados por este tipo de fermentación. Los hongos filamentosos es el grupo de microorganismos más importante usado en los procesos de FMS, porque su morfología permite que colonicen y penetren en el sustrato sólido (Raimbault, 1998, p. 177). La optimización de los parámetros físicos y químicos son importantes en el desarrollo de la fermentación debido a su impacto en la economía y la factibilidad del proceso (Monteiro et al., 2010, p. 853).

Las ventajas que presenta la FMS son productividad superior, técnica más simple, inversión de capital más baja, menor requerimiento de energía, baja cantidad de efluentes contaminantes y mejor recuperación del producto. Por lo que, recientemente se ha establecido que la FMS es el mejor sistema para la producción de enzimas (Anto et al., 2006, p. 1 161; Ali y Zulkali, 2011, p. 255).

Esta técnica de fermentación está principalmente enfocada a la producción de alimentos, enzimas, ácidos orgánicos, biopesticidas, biocombustibles y compuestos aromáticos. Además, en los últimos años, también se han desarrollado nuevas aplicaciones en el control medioambiental como la biorremediación, biodegradación de compuestos contaminantes, transformación biológica de residuos agroindustriales, entre otros (Julián y Ramos, 2007, p. 17).

Generalmente en la FMS se utilizan como sustratos residuos agroindustriales, lo que resulta bastante beneficioso ya que se obtienen productos de interés industrial y además se resuelven problemas ambientales. Los residuos de frutas y

verduras, cortezas de árboles, cáscaras de frutos secos, salvados, bagazo de caña de azúcar, entre otros, son sustratos de bajo costo que son utilizados en este tipo de fermentación. Este método tiene un valor económico para los países que disponen de abundante biomasa y residuos agroindustriales, ya que pueden ser utilizados como materias primas baratas, que constituyen un proceso industrial altamente competitivo (Lagunas, García, Castaño, Regalado y Ávila, 2006, p. 1; Suganthi et al., 2011, p. 1 756).

1.2.2 TIPOS DE REACTORES EN FMS

Los biorreactores son equipos donde se realiza el proceso de fermentación, los cuales deben ser diseñados de manera que aseguren la homogeneidad entre los componentes del sistema, condiciones óptimas para el crecimiento de los microorganismos y obtención del producto deseado (Ruíz et al., 2007, p. 33). De acuerdo con la disposición del medio, tipo de aireación y agitación los biorreactores se clasifican en cuatro grupos:

1.2.2.1 Reactores de lecho fijo

Son los biorreactores sin agitación más utilizados, están constituidos por un lecho estático a través del cual circula aire húmedo, el cual permite controlar las condiciones del reactor, mediante la manipulación de su temperatura y caudal de entrada (Lu, Brooks y Maddox, 1997, p. 392).

Uno de los más interesantes sistemas para la FMS a escala de laboratorio es el desarrollado y patentado por el grupo del Instituto para la Investigación y Desarrollo (IRD) en Francia, que consiste en pequeñas columnas empaquetadas con un medio previamente inoculado, a través del cual circula aire saturado. Estos reactores son colocados en un baño termostático y el equipo es conectado a una columna de cromatografía de gases para monitorear la producción de CO₂, que se origina por la respiración del microorganismo y sus reacciones metabólicas

(Bhargav et al., 2008, p. 54; Ruíz et al., 2007, p. 34). El esquema de este sistema se representa en la Figura 1.4.

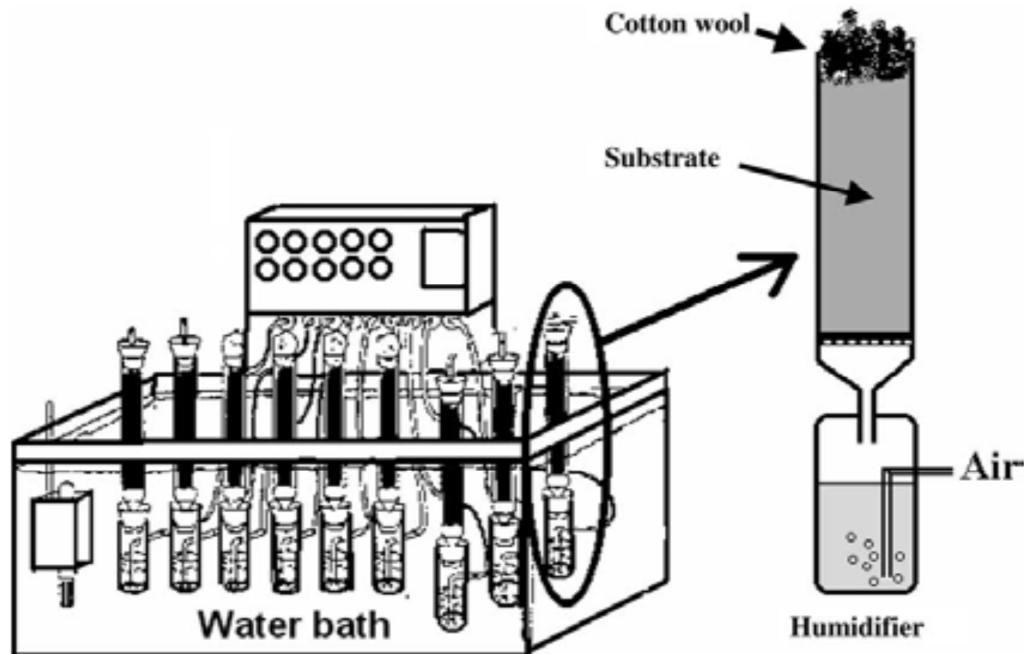


Figura 1.4. Sistema de biorreactores en columna a escala laboratorio desarrollado y patentado por IRD
(Ruíz et al., 2007, p. 35)

Este sistema de biorreactores es conveniente en las primeras etapas del desarrollo de un bioproceso de FMS, porque es de fácil adaptación, barato y requiere de poca cantidad de medio de cultivo. Sin embargo, su diseño no permite tomar muestras por lo que es necesario sacrificar una columna completa, para medir los parámetros cinéticos durante la fermentación (Ruíz et al., 2007, p. 34).

Los reactores de lecho empacado reducen la contaminación bacteriana debido a que son sistemas cerrados, a diferencia de lo que sucede con los fermentadores de bandeja. Además, el mismo reactor puede ser empleado para la extracción del producto final después de la fermentación (Ghildyal, Gowthaman, Raghava y Karanth, 1994, p. 254).

Las principales desventajas que presentan estos biorreactores son la dificultad en el vaciado del producto final del fermentador, el crecimiento no uniforme del

microorganismo, la insuficiente remoción del calor metabólico y los problemas de escalamiento (Couto y Sanromán, 2006, p. 296).

1.2.2.2 Reactores de bandeja

Es uno de los diseños más ampliamente utilizados en la FMS tanto a escala de laboratorio como en plantas industriales, desafortunadamente este tipo de reactores no han presentado avances significativos en la última década. Estos reactores consisten en una cámara con control de temperatura y humedad, en la cual se dispone una serie de bandejas consecutivamente que contienen una capa fina inferior a 2 cm de sustrato inoculado y estas se encuentran separadas algunos centímetros para permitir el paso del flujo de aire (Ali y Zulkali, 2011, p. 255; Pastrana, 1996, p. 9).

Presentan como ventajas elevados rendimientos, facilidad de aireación, manejo de altos volúmenes de material; sin embargo, requieren elevado espacio físico, abundante mano de obra para el manejo de bandejas y no permite un control estricto de la fermentación (Pastrana, 1996, p. 9).

1.2.2.3 Reactores de tambor rotatorio

Son biorreactores que presentan un cilindro horizontal o inclinado que gira alrededor de su eje central, para obtener una agitación continua del sustrato sólido y proveer mayor cantidad de oxígeno al microorganismo. A pesar de que el mezclado es relativamente suave puede ser abrasivo y causar daños al micelio; además el control de temperatura y humedad es muy difícil, ya que a medida que se incrementa el volumen del sistema fermentativo, la remoción del calor por la paredes es más ineficiente y diseñar una chaqueta alrededor del biorreactor resulta técnicamente complejo (Ali y Zulkali, 2011, p. 255; Bhargav et al., 2008, p. 56; Ruíz et al., 2007, p. 36).

1.2.2.4 Reactores agitados

Estos biorreactores pueden tener su eje horizontal o vertical. Los biorreactores agitados horizontales son muy similares a los de tambor rotatorio; pero, su mezcla se realiza por aspas internas más que por la rotación del fermentador. Los biorreactores agitados verticales están sujetos generalmente a aireación forzada, pueden ser continuos o intermitentes. Debido a que estos biorreactores presentan agitación y aireación del medio alcanzan una mayor homogeneidad del sustrato y mejoran la transferencia de calor y masa (Ali y Zulkali, 2011, p. 261).

A este grupo también pertenecen los biorreactores de lecho fluidizado gas-sólido, que constan de una columna relativamente alta y una base perforada por la cual es inyectado el aire. Presentan como ventajas buena aireación, remoción del calor metabólico, mezclado efectivo, mejor control de los parámetros de fermentación y mayor productividad (Couto y Sanromán, 2006, p. 297).

El diseño de biorreactores para la FMS ha avanzado lentamente en la última década debido a problemas de operación, fenómenos de transporte y escalamiento. Los criterios más importantes a considerar son: funcionamiento aséptico del fermentador, sistema adecuado de aireación y agitación, mínimo consumo de energía, entradas para adición de nutrientes y control de pH, mejor transferencia de calor para mantener estable la temperatura deseada y suministro de oxígeno que satisfaga el consumo por parte de los microorganismos. Los biorreactores deben ser optimizados para obtener la máxima concentración de productos en un tiempo mínimo y a menor costo de producción (Ruíz et al., 2007, p. 34).

1.2.3 VARIABLES DEL PROCESO

El estudio de parámetros como la temperatura, aireación, humedad, agitación, tamaño de partícula, diseño del reactor, etc., es fundamental para el éxito de la

FMS debido a que de estos depende tanto el crecimiento del microorganismo como la formación del producto final.

1.2.3.1 Temperatura

La temperatura es uno de los parámetros que más influye en la velocidad de crecimiento de los microorganismos, la producción de amilasa presenta un mayor rendimiento entre 30 y 37 °C, la temperatura óptima reportada en muchos estudios es 30 °C (Suganthi et al., 2011, p. 1 759).

Una gran cantidad de calor se genera durante la FMS que está directamente relacionada con la actividad metabólica de los microorganismos, particularmente con la respiración durante el crecimiento. La producción de calor se puede calcular cuando se conoce la velocidad de producción de CO₂ o la de consumo de O₂ (Prabhakar et al., 2005, p. 12; Raimbault, 1998, p. 185).

Generalmente, los sustratos usados para la FMS tienen bajas conductividades térmicas y junto con el bajo contenido de humedad crean condiciones difíciles para la transferencia de calor. Por esta razón, la eliminación del calor es un proceso muy lento, lo que produce gradientes de temperatura en el interior del sólido. El calor generado debe ser necesariamente disipado porque el crecimiento microbiano es muy sensible al aumento de temperatura, lo que afecta la producción de esporas e incluso la desnaturalización de los productos formados (Bhargav et al., 2008, p. 50; Ghildyal et al., 1994, p. 253).

El control de temperatura representa uno de los principales problemas en los procesos de FMS a gran escala, porque las técnicas y conceptos empleados en la fermentación sumergida no pueden ser aplicados fácilmente a este tipo de reactores. La implementación de sistemas de convección forzada disminuye los gradientes de temperatura, mejora la transferencia de masa y reduce la heterogeneidad del sistema; sin embargo, puede perjudicar el desarrollo del

hongo y aglomerar el sustrato (Ghildyal et al., 1994, p. 254; Saucedo, Gutiérrez, Bacquet, Raimbault y Viniegra, 1990, p. 802).

La temperatura del lecho puede aumentar hasta 20 °C por encima de la temperatura de fermentación, en algunos casos los reactores de lecho estático requieren el uso de un medio de enfriamiento y corrientes de aire forzado para un adecuado funcionamiento (Ashley, Mitchell y Howes, 1999, p. 141; Saucedo et al., 1990, p. 802).

1.2.3.2 Aireación

La aireación es fundamental en este tipo de fermentación debido a que provee el oxígeno requerido en los procesos aerobios e influye en los fenómenos de transporte de calor y masa. Además elimina el CO₂ generado durante la fermentación, distribuye el vapor de agua que regula la humedad, disipa el calor para controlar la temperatura del medio y distribuye los compuestos volátiles producidos durante el metabolismo (Chávez, Rodríguez L., Rodríguez R. y Aguilar, 2009; Morales, Regalado y García, 2006, p. 2).

El flujo óptimo de aire debe considerar la naturaleza del microorganismo, requerimientos de oxígeno para el crecimiento, generación de calor metabólico, espesor de la masa del sólido, entre otros (Chávez et al., 2009). En un sistema de columnas de lecho empacado, un flujo de aire de 1 L/h es suficiente para asegurar un buen crecimiento del microorganismo *Aspergillus niger*, lo que indica una aireación eficiente en este tipo de biorreactores, generalmente se emplean 4 L/h (Raimbault y Alazard, 1980, p. 205).

1.2.3.3 Humedad

La humedad es un factor crítico para los procesos de FMS porque influye sobre el crecimiento, biosíntesis y secreción de diferentes metabolitos. Un bajo contenido

de humedad reduce la difusión de nutrientes y la estabilidad enzimática; sin embargo, proporciona un ambiente selectivo para el crecimiento de los microorganismos, especialmente de los hongos. Por otro lado, altos niveles de humedad frecuentemente provocan que las partículas de sustrato se adhieran entre sí, lo que impide el crecimiento de la cepa e interfiere con la transferencia de oxígeno (Ali y Zulkali, 2011, p. 255; Saxena y Singh, 2011, p. 1 334).

El contenido óptimo de humedad para el crecimiento de hongos sobre sustratos sólidos se encuentra entre el 30 y el 85 %, pero depende del microorganismo y el medio utilizado para el cultivo. Por ejemplo, la humedad óptima para el crecimiento de *Aspergillus niger* en arroz es del 40 %; mientras que, para la pulpa de café es del 80 %, lo que indica que el contenido de humedad no es un parámetro para predecir el crecimiento microbiano (Raimbault, 1998, p. 183).

1.2.3.4 Tamaño de partícula

El tamaño de partícula también es un factor importante a tener en cuenta, los sustratos de partículas pequeñas proveen una mayor área superficial que ayuda al desarrollo del microorganismo; sin embargo, un tamaño demasiado pequeño provoca la aglutinación de las partículas, lo cual interfiere en la aireación y respiración del microorganismo, que afecta su crecimiento. Por otra parte, sustratos de partículas grandes permiten una mayor aireación por el incremento de los espacios interparticulares, pero proporcionan una superficie limitante para el crecimiento del microorganismo. Por esta razón, es necesario encontrar la mejor relación área-volumen para el adecuado desarrollo microbiano (Pandey, Selvakumar, Soccol y Nigam, 1999, p. 152).

1.2.3.5 pH

El pH es otro de los factores importantes para cualquier proceso de fermentación, el rango óptimo para el desarrollo del microorganismo se encuentra próximo a la

neutralidad generalmente entre 5 y 8, aunque la mayor parte de los hongos están adaptados a un rango más amplio de pH. Debido al crecimiento microbiano y las actividades metabólicas se puede producir un cambio en el pH del medio de cultivo, esta variación se debe a la secreción que produce el microorganismo de ácidos orgánicos como ácido cítrico, acético o láctico, los cuales disminuyen el pH del medio. Por otro lado, la asimilación de ácidos orgánicos que pueden estar presentes en ciertos medios provoca un aumento de esta variable (Chávez et al., 2009; Raimbault, 1998, p. 185).

La cinética de variación del pH está muy relacionada con el microorganismo utilizado, generalmente alteraciones bruscas de este parámetro pueden afectar la membrana y el transporte de solutos, que inhiben la actividad enzimática, por esta razón es deseable que el microorganismo empleado se desarrolle en un amplio rango de pH (Raimbault, 1998, p. 185).

Los materiales lignocelulósicos, que generalmente se utilizan en la FMS, tienen efectos tamponantes por su composición compleja, debido a esto la naturaleza del sustrato también tiene una gran influencia en la variación del pH. El control de este parámetro es uno de los problemas que enfrenta la FMS, debido a la falta de equipos apropiados para medir el pH en materiales sólidos; sin embargo, su medida es indispensable para evitar que esta variable alcance valores que puedan producir la muerte del microorganismo; también el control del pH permite reducir los riesgos de contaminación bacteriana (Chávez et al., 2009; Pastrana, 1996, p. 9).

Se ha determinado que el pH óptimo para la producción de glucoamilasa en FMS es de 4,6, mediante la inoculación de *Aspergillus niger* NRRL 3122 en cáscara de arroz. Mientras que un máximo rendimiento de la enzima se obtuvo a un pH de 5,5, en salvado de trigo (Suganthi et al., 2011, p. 1 759).

1.2.3.6 Agitación

La agitación y rotación se utilizan en FMS, normalmente, para mantener condiciones homogéneas dentro del biorreactor y mejorar la transferencia de calor y materia. Sin embargo, pueden producir daños al micelio, aglomeración de sólidos, reducción de la porosidad del sustrato, efectos adversos a la síntesis de metabolitos o posible desnaturalización de la enzima producida. Por esta razón, los sistemas de agitación deben ser diseñados de forma que minimicen sus efectos dañinos, puesto que la mayoría de hongos filamentosos son sensibles a la fuerza de corte. Las variables que se deben controlar en la agitación de reactores son la velocidad y duración (Chen, 2013, p. 131).

1.3 RESIDUOS AGROINDUSTRIALES EN EL ECUADOR

La biotecnología es un campo que se encuentra en gran desarrollo y presenta una extensa aplicación, debido a que permite la conversión de residuos agroindustriales en productos de alto valor agregado, mediante procesos de extracción directos o de transformación química o microbiológica (Barragán, Téllez y Laguna, 2008, p. 45; Costa et al., 2010, p. 164).

Los residuos agroindustriales se generan a partir del consumo directo de productos primarios o de su industrialización en una variedad de empresas, especialmente del sector alimenticio. Representan un gran potencial para ser empleados en procesos de base biotecnológica, debido a su bajo costo, fácil adquisición y composición nutricional, porque son una fuente importante de carbono, nitrógeno y minerales, que pueden ser utilizados como sustrato para el crecimiento de los microorganismos y la producción de compuestos derivados de su metabolismo (Aceves y Castañeda, 2012, p. 246; Barragán et al., 2008, p. 45; Saval, 2012, p. 15).

Las características de los residuos agroindustriales son muy variadas, dependen de la materia prima y del proceso que los generó; sin embargo, comparten una

característica principal que es el contenido de materia orgánica, constituida por diferentes porcentajes de celulosa, lignina, hemicelulosa y pectina, por lo que son considerados como los mejores sustratos para los procesos de fermentación sólida (Anto et al., 2006, p. 162; Khan y Yadav, 2011, p. 100; Saval, 2012, p. 16; Costa et al., 2010, p. 164).

La celulosa es un polímero lineal de D-glucosa, está formada por una estructura cristalina resistente a la hidrólisis y regiones amorfas susceptibles a la degradación. La hemicelulosa es un polímero de heteropolisacáridos que proporciona la unión entre la celulosa y la lignina. La lignina es un heteropolímero amorfo, tridimensional y ramificado formado por alcoholes aromáticos que da soporte estructural, rigidez, impermeabilidad y protección a la celulosa y hemicelulosa (Cuervo, Folch y Quiroz, 2009, p. 12).

Generalmente, estos residuos son vertidos al ambiente, lo que conlleva a la contaminación principalmente de los suelos y cuerpos de agua. También son utilizados como alimento para animales; sin embargo, esta estrategia sólo resuelve de manera parcial el problema, ya que el volumen en que son generados es mayor que el de su demanda como alimento (Aceves y Castañeda, 2012, p. 246; Barragán et al., 2008, p. 45).

1.3.1 CÁSCARA DE ARROZ

1.3.1.1 Características

La cascarilla de arroz es un subproducto del proceso agroindustrial que corresponde del 20 al 23 % del peso total del arroz en cáscara. Presenta forma ovalada, color amarillento, superficie rugosa y su tamaño fluctúa alrededor de 4 a 14 mm de longitud, 2 a 4 mm de ancho y un espesor promedio de 50 μm . Su peso oscila entre 2,5 y 4,8 mg en base seca, lo cual depende del tipo de arroz (Frimpong, Obodai, Dzomeku y Apertorgbor, 2011, p. 249; Kumar A., Mohanta, Kumar, D. y Parkash, 2012, p. 86).

Es un sustrato orgánico liviano que se descompone lentamente, tiene buena aireación, baja capacidad de retención de humedad y presenta un alto contenido de SiO₂ (Calderón, 2002).

En la Tabla 1.1 se indica la composición química de la cascarilla de arroz.

Tabla 1.1. Composición química de la cascarilla de arroz

Parámetros	Valor promedio
% Humedad	7,41
% Ceniza	19,39
% Fibra (Celulosa)	45,38
% Proteínas	3,59
% Extracción con éter (Grasa)	0,40
% Carbohidratos Totales	69,23

(Echeverría y López, 2010, p. 67)

1.3.1.2 Producción

El cultivo de arroz en el Ecuador constituye una de las principales actividades agrícolas, según el III Censo Nacional Agropecuario realizado en el año 2002, se cultiva alrededor de 331 000 hectáreas de arroz en el litoral, que representa el 96 % del total de la superficie cultivada en el país. La mayor proporción de área cultivada se concentra principalmente en las provincias del Guayas y Los Ríos (Aguilar, 2010, p. 1).

En la Figura 1.5 se presentan las provincias de mayor producción de arroz a nivel nacional.

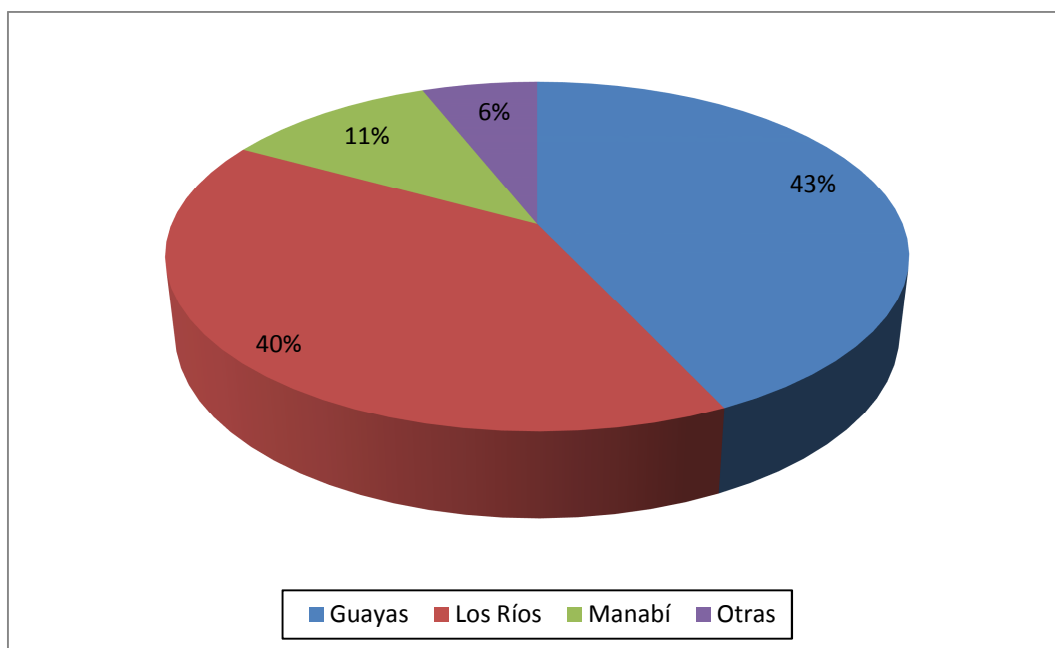


Figura 1.5. Hectáreas sembradas en las provincias de mayor producción de arroz en el Ecuador
(Aguilar, 2010, p. 1)

Ecuador ha sido tradicionalmente un exportador de arroz a países andinos, especialmente Colombia, Perú y ocasionalmente Venezuela. Para obtener la disponibilidad de la cascarilla de arroz se realiza un análisis de la producción de arroz con cáscara al considerar que esta representa el 22 % del grano y se indica en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2. Producción anual de cascarilla de arroz en el Ecuador

Año	Producción de arroz en cáscara (TM)	Cascarilla de arroz (TM)
2005	1 109 508	244 092
2006	1 254 269	275 939
2007	1 134 633	249 619
2008	1 054 787	232 053
2009	1 098 516	241 674
2010	1 706 193	375 362
2011	1 477 941	325 147
2012	1 565 535	344 418

(MAGAP, 2013)

Aproximadamente el 35 % de la cascarilla de arroz se utiliza en la industria florícola y criaderos de animales, mientras que el restante es quemado en piladoras, tirada al borde de las carreteras y arrojada a los ríos, lo cual constituye un gran problema ambiental. Debido a su resistencia al fuego es altamente contaminante por los gases que emana hacia la atmósfera, además la combustión es muy lenta porque tarda días o semanas en su incineración total, lo cual genera riesgos en la salud de las personas (Acero y Rodríguez, 2012, p. 2; Assureira, 2002, p. 35).

1.3.2 CÁSCARA DE PAPA

1.3.2.1 Características

La cáscara de papa es un desecho de la industria de procesamiento, posee un abundante contenido de almidón, fibra alimentaria y antioxidantes. Tiene una elevada cantidad de carbohidratos y proteínas, por lo que es una buena fuente de energía (Devinder, Mona y Hradesh, 2012, p. 25).

En la Tabla 1.3 se presenta la composición química de la cáscara de papa.

Tabla 1.3. Composición química de la cáscara de papa seca

Parámetros	Valor promedio
% Humedad	7,85
% Proteína	14,04
% Grasa	1,17
% Cenizas	5,31
% Fibra	76,40

(Devinder et al., 2012, p. 25)

1.3.2.2 Producción

El 90 % de la papa a nivel nacional se consume en estado fresco y es la principal fuente de alimento para los habitantes de las zonas altas del país. Según el III Censo Nacional Agropecuario un total de 0,4 % del territorio de uso agrario se dedica a la producción de papa, lo que corresponde aproximadamente a 49 000 hectáreas. El cultivo se realiza en la región Sierra, las provincias de Carchi, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua y Chimborazo aportan el 79,5 % de la producción (Suquilanda, 2011, p. 1).

En la Figura 1.6 se muestran las provincias de mayor producción de papa a nivel nacional.

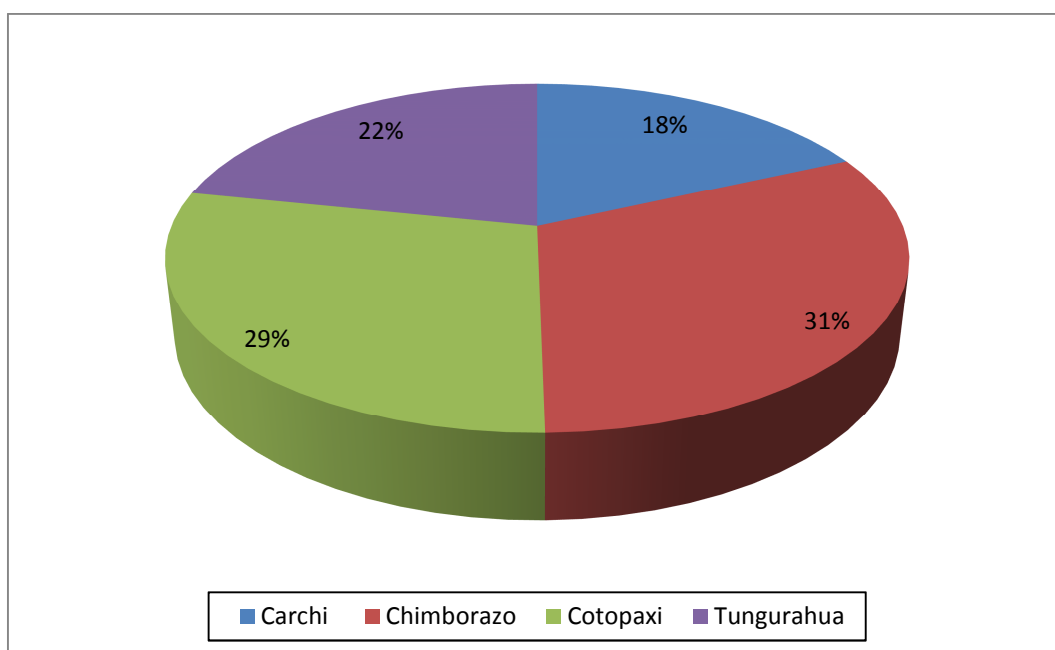


Figura 1.6. Hectáreas sembradas en las provincias de mayor producción de papa en el Ecuador
(Suquilanda, 2011, p. 2)

Para conocer la disponibilidad de esta cáscara se realiza un análisis de la producción de papa al considerar que esta representa el 20 % y se muestra en la Tabla 1.4.

Tabla 1.4. Producción anual de cáscara de papa en el Ecuador

Año	Producción de papa (TM)	Cáscara de papa (TM)
2005	338 965	67 793
2006	360 793	72 159
2007	317 220	63 444
2008	266 722	53 344
2009	286 790	57 358
2010	386 798	77 360
2011	339 038	67 808
2012	285 100	57 020

(MAGAP, 2013)

La cáscara de papa es empleada principalmente como alimento para cerdos; sin embargo, no es adecuada sin un tratamiento previo, debido a que es demasiado fibrosa para ser digerida. La cáscara de papa ha sido reportada como un excelente sustrato para la producción de α -amilasa termoestable en estado sólido, bajo condiciones controladas (Al-Weshahy y Rao, 2012, p. 210).

1.3.3 CÁSCARA DE TRIGO

1.3.3.1 Características

La cáscara de trigo también conocida como salvado es un subproducto de la refinación del trigo y corresponde a la cubierta exterior del grano. Está formada principalmente por celulosa y hemicelulosa, se destaca por su alto aporte de fibra alimentaria que es una fuente de energía muy recomendable, por su capacidad para transformarse en glucosa de manera paulatina. Presenta bajo contenido de grasa, es rica en hidratos de carbono, minerales especialmente calcio, potasio, fósforo, hierro, magnesio y zinc y vitaminas B y E (Javed et al., 2012, p. 725).

En la Tabla 1.5 se muestra la composición química del salvado de trigo.

Tabla 1.5. Composición química del salvado de trigo en base seca

Parámetros	Valor promedio
% Humedad	11,02
% Ceniza	5,70
% Fibra (Celulosa)	11,80
% Proteínas	18,60
% Extracción con éter (Grasa)	5,10
% Carbohidratos no estructurales	24,00
% Extracción libre de nitrógeno	58,80

(Vargas, 2000, p. 30)

1.3.3.2 Producción

El cultivo de trigo ha sufrido un notable descenso, debido a que en la década de los 60 se cultivaba 200 000 hectáreas y en el año 2010 se cultivó solamente 15 000 hectáreas, por esta razón el Ecuador es considerado como el país de más baja productividad a nivel de América Latina; importa el 98 % de los requerimientos internos de trigo y tan solo un 2 % es producido a nivel local. El área de producción está distribuida a lo largo del callejón interandino, las provincias de mayor aporte son Imbabura, Pichincha, Chimborazo y Bolívar (Garófalo, Ponce y Abad, 2011, p. 3).

En la Figura 1.7 se indican las provincias de mayor producción de trigo a nivel nacional.

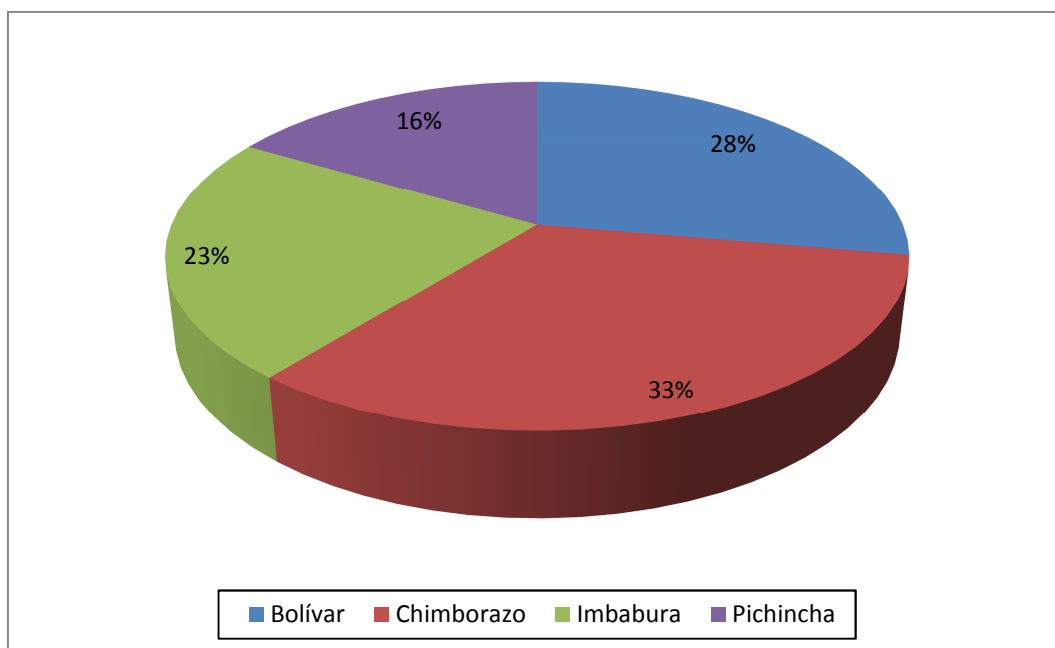


Figura 1.7. Hectáreas sembradas en las provincias de mayor producción de trigo en el Ecuador
(Garófalo et al., 2011, p. 3)

Para obtener la disponibilidad del salvado se realiza un análisis de la producción de trigo al considerar que esta representa el 14 % del grano y se indica en la Tabla 1.6.

Tabla 1.6. Producción anual de salvado de trigo en el Ecuador

Año	Producción de trigo (TM)	Salvado de trigo (TM)
2005	8 429	1 180
2006	7 577	1 061
2007	9 243	1 294
2008	8 144	1 140
2009	11 314	1 584
2010	7 605	1 065
2011	5 938	831
2012	7 450	1 043

(MAGAP, 2013)

El salvado del trigo es utilizado fundamentalmente para consumo porcino, avícola, bovino, cunícola y equino.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 MATERIALES

Se empleó una cepa de *Aspergillus niger* 22343 proporcionada por el Laboratorio de Bioprocesos de la Escuela Politécnica Nacional. La cáscara de arroz utilizada como sustrato fue adquirida en la parroquia de Yaruquí, provincia de Pichincha. La cáscara de trigo fue comprada en un supermercado local y la cáscara de papa fue adquirida en un salón de venta de comida.

Los reactivos utilizados para la ejecución del proyecto se indican en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Reactivos empleados para el desarrollo del proyecto

Equipo	Marca	Pureza
Albúmina	J.T. Baker Inc.	Técnico
Ácido acético	Riel De Haen ag seelza hannover	Analítico-99 %
Ácido cítrico	J.T. Baker Inc.	Tecnico-99 %
Ácido 3,5 dinitrosalicílico	Fluka AG, Chem. Fabric.	Técnico-99 %
Acetato de sodio	Merck	Analítico-99 %
Almidón soluble	Analar	Técnico
Cloruro de amonio	Merck	Técnico
Cloruro de calcio	Merck	Analítico
Cloruro de sodio	Merck	Analítico-99 %
Cloruro de potasio	Merck	Técnico-99 %
Fosfato disódico	Merck	Técnico-99 %
Glucosa	Fisher Chemical	Técnico
Hidróxido de sodio	Merck	Analítico-99 %
Sulfato de cobre	Sigma	Analítico-99 %
Sulfato de hierro II	Merck	Técnico-99 %
Sulfato de magnesio	Merck	Técnico-99 %
Tartrato de sodio y potasio	Riedel de Haën	Analítico-99 %
Tween 80	Fisher Chemical	
Malta Agar	Difco	Analítico

Los equipos utilizados para la ejecución del proyecto se presentan en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Equipos empleados para la ejecución del proyecto

Equipo	Marca	Modelo	Capacidad	Sensibilidad
Autoclave	Boyn Industrial Co. Ltda.	LDZX-75 KBS	75 L	
Agitador de tubos	Thermolyne	M 37615		
Balanza	Ohaus	Scout	200 g	0,001 g
	Ohaus	Trooper	6 kg	0,001 g
Balanza analítica	Boeco Germany		210 g	0,1 mg
Baño María	Cole Parmer Polystat	1200-00 Circulator	90 °C	0,1 °C
Cámara de flujo laminar	IFV Industries	Cabina 85 H Flujo horizontal Clase 100	250 L	
Centrífuga	Thermo	IEC HN SII	9 000 rpm	2 rpm
Cocina	Durex			
Computador	Ari			
Compresor de aire	Ciao Fini 25	OL 185		
Estufa	Boekel Industries INC.	132000	100 °C-10 L	5 °C
Espectrofotómetro	Labomed. Inc. Double Beam	UVD 3500		0,001
Medidor de flujo	Cole Parmer Instrument Company			
Plancha de calentamiento	Thermo Scientific	SP 131325		
pH metro	Hanna	pHep		
Secador	Heraeus	UT 6060		
Termobalanza	Ohaus	MB 25	110 g	0,005
Termostato	Cole Parmer Polystat	1266-30		
Fermentador sólido	Elaboración local			

El equipo empleado para la fermentación sólida fue un sistema de biorreactores en columna, el cual constaba de dos peceras de vidrio que contenían agua a

temperatura controlada, en cada una de ellas se encontraban sumergidos ocho reactores tubulares colocados verticalmente sobre una gradilla, a cada uno ingresaba un flujo de aire con control independiente. Las características de los reactores y sus dimensiones se muestran en el Figura 2.1.

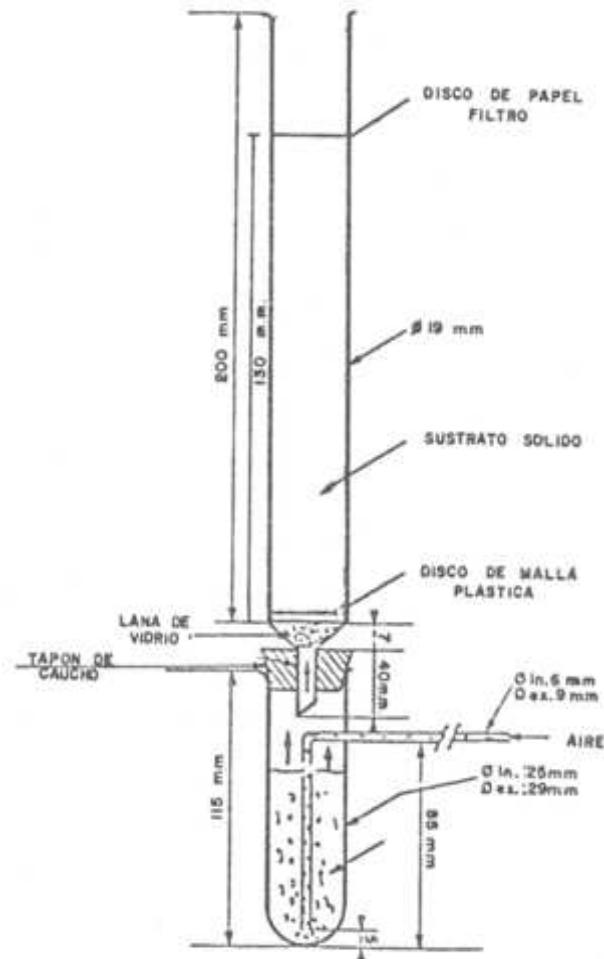


Figura 2.1. Esquema y dimensiones del reactor de lecho empacado
(Avilés, 1991, p. 22)

El flujo de aire requerido fue suministrado por un compresor, el aire fue burbujeadado inicialmente a un recipiente que contenía agua para su humidificación y posteriormente se trasladaba al distribuidor de aire para llegar a cada uno de los reactores. El equipo se esquematiza en la Figura 2.2.



Figura 2.2. Esquema del sistema de biorreactores empleados para la fermentación

Se dispuso de 2 recipientes, debido a que cada muestra tiene su respectiva paralela durante toda la fermentación.

2.2 OBTENCIÓN DEL INÓCULO

La cepa de *Aspergillus niger* 22343 en estado liofilizado, que se reactivó en el laboratorio de microbiología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, se sembró en tubos de ensayo con medio de cultivo malta agar, los cuales se mantuvieron en refrigeración durante el desarrollo del proyecto. Para la ejecución de cada tratamiento se colocó arena estéril en el tubo de ensayo que contenía al microorganismo, se agitó para provocar la salida de esporas y se adicionó 10 mL de agua destilada. A continuación se tomó 1 mL de la suspensión formada, se colocó en 30 mL de malta agar contenidos en un erlenmeyer y se incubó a 30 °C durante 4 días, para su posterior crecimiento en el equipo de fermentación sólida.

2.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS MATERIAS PRIMAS

Se determinó la humedad, contenido de celulosa y lignina de las cáscaras de arroz, trigo y papa utilizadas como sustratos para la fermentación. Las muestras fueron analizadas en el laboratorio de Pulpa y Papel de la Escuela Politécnica Nacional, por medio de los métodos descritos por Grant (1996) en el Manual sobre la Fabricación de Pulpa y Papel. En la Tabla 2.3 se muestra la norma aplicada a cada uno de los análisis.

Tabla 2.3. Normas para la caracterización química de las materias primas

Análisis	Método
Humedad	TAPPI T-412-M (6)
Solubilidad-alcohol	TAPPI T-6-os-59
Celulosa	TAPPI T-17-M-55
Lignina	TAPPI T-13-os-54

Los procedimientos empleados se detallan en los Anexos I, II y III.

2.4 DETERMINACIÓN DEL SUSTRATO MÁS ADECUADO PARA LA PRODUCCIÓN DE ENZIMA AMILASA POR FERMENTACIÓN SÓLIDA

2.4.1 DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE LA PRODUCCIÓN DE AMILASA

Inicialmente se realizó la prueba de lugol para determinar cualitativamente la producción de enzima amilasa mediante la cepa de *Aspergillus niger* 22343. Para esto se preparó el medio de cultivo agar-almidón compuesto por 10 g/L de peptona, 5 g/L de NaCl, 2 g/L de almidón soluble y 20 g/L de agar con un pH de 7,2. Se colocó el medio en un balón de vidrio y se esterilizó en el autoclave a 121 °C, por 20 min. A continuación se colocó el medio en cajas petri estériles, se inoculó el microorganismo en 3 puntos equidistantes de la superficie de las placas

y se incubó a 35 °C, por 48 h. Transcurrido dicho periodo se agregó solución de lugol sobre la superficie, la presencia de un halo transparente alrededor de la colonia indicará que el microorganismo ha producido amilasa que ha hidrolizado el almidón.

2.4.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

Para determinar el mejor sustrato y el efecto de la temperatura en la generación de amilasa se trabajó con un diseño experimental 3x2; con 3 tipos de medios y 2 temperaturas. Se emplearon como sustratos para la fermentación cáscara de arroz, papa y trigo. Se analizó la producción a temperatura ambiente (promedio 13 °C) y 30 °C, con un flujo de aire húmedo de 4 L/h en cada uno de los reactores.

Se tomaron muestras cada 3 h durante el día para evaluar la actividad enzimática, concentración de proteínas y humedad. El periodo de fermentación fue de 48 h, para evitar la esporulación excesiva del microorganismo. Para cada tratamiento se realizó una repetición, por lo que se realizaron 12 tratamientos en total, cada uno con su respectiva paralela.

2.4.3 PREPARACIÓN DEL SUSTRATO E INOCULACIÓN

La cáscara de papa fue secada a 110 °C, por 3 h y posteriormente molida manualmente para su uso. Se colocó el medio en frascos de vidrio y se esterilizó en el autoclave a 121 °C, por 20 min. Dentro de la cámara de flujo laminar se adicionó al sustrato como refuerzo nutritivo una solución compuesta por 0,8 g/L de NaCl; 0,8 g/L de KCl; 0,1 g/L de CaCl₂; 2,0 g/L de Na₂HPO₄; 0,2 g/L de MgSO₄; 0,1 g/L de FeSO₄; 2,0 g/L de NH₄Cl y 8 g/L de glucosa con un pH de 5,0 y se ajustó la humedad al 50 %.

Se colocó arena estéril en el erlenmeyer que contenía al microorganismo, se agitó para provocar la salida de esporas, se adicionaron 40 mL de agua destilada y 3 gotas de Tween 80. A continuación se inoculó el medio con la suspensión de esporas formada, en una relación que depende del tipo de sustrato como se muestra en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4. Volumen de suspensión de esporas por cantidad de material seco

Sustrato	Suspensión de esporas (mL)	Cantidad de sustrato (g)
Cáscara de arroz	1	4
Cáscara de trigo	1	7
Cáscara de papa	1	13

La cantidad de sustrato corresponde a los gramos de medio que se adicionaron en un reactor para alcanzar una altura de 13 cm, lo cual depende del material seco. Es decir, se inoculó cada reactor con 1 mL de suspensión de esporas. Se colocó lana de vidrio para filtrar el aire en la base del reactor y sobre esta, papel filtro, que sirvió como soporte del medio. En la parte superior del lecho se colocó algodón para impedir la salida de esporas. Finalmente, los reactores se colocaron dentro del baño termostático.

2.4.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD AMILÁSICA

La actividad enzimática se midió mediante el método DNS, presentado por Olmos (1987) y modificado por Avilés (1991); para lo cual, se tomó a las horas establecidas una columna del sistema de biorreactores con su respectiva paralela. Se pesaron 2 g del sustrato fermentado, se adicionaron 50 mL de agua destilada, se homogenizó la muestra durante 30 s y centrifugó a 3 000 rpm por 10 min (p. 63).

En un tubo de ensayo, se colocaron 2,5 mL de solución de almidón soluble 1,5 % y 2 mL de buffer citrato-fosfato de pH 5. Se colocó en un baño termostático a

60 °C y se adicionaron 0,5 mL de extracto enzimático. Se dejó por 15 minutos exactos. Se colocó en otro tubo de ensayo 1 mL de DNS y 1 mL de la muestra incubada, se hirvió durante 10 min y colocó posteriormente en un baño de hielo. Se adicionaron 18 mL de agua destilada para diluir la muestra. Se midió la absorbancia en el espectrofotómetro UV-VIS 3500 del Laboratorio de Bioprocesos, a una longitud de onda de 490 nm.

Para calcular la actividad amilásica se realizó la curva de calibración con una solución de glucosa 0,1 %. Una vez obtenida la ecuación de la curva se determinó la concentración de la muestra de fermentación y posteriormente se realizó la transformación de unidades, como se muestra en el Anexo VIII.

La actividad enzimática se expresó en Unidades Internacionales (UI), las cuales se definen como la cantidad de enzima que transforma un μmol de sustrato por minuto y por gramo de sustrato seco en condiciones establecidas, los valores fueron determinados a partir de los datos de la variación de absorbancia con respecto al tiempo de fermentación (Braverman, 1990, p. 32).

2.4.5 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

La determinación de la concentración de proteínas se realizó mediante la reacción de Biuret, se utilizó el método presentado por Mitchell (1989) y empleado por Loaiza (1992); para lo cual, se pesó 1 g de sustrato fermentado, se adicionaron 50 mL de agua destilada y se homogenizó la muestra durante 30 s (p. 69).

Se colocaron en un tubo de ensayo 4 mL de la muestra, 2 mL de hidróxido de sodio 3 M, se hirvió por 5 min y se colocó en un baño de hielo. Se adicionaron 2 mL de solución de sulfato de cobre 2,5 %, se agitó durante 3 min y se centrifugó durante 5 min. Finalmente, se midió la absorbancia en el espectrofotómetro UV-VIS 3500 del Laboratorio de Bioprocesos, a una longitud de onda de 555 nm.

Para calcular la concentración de proteínas se realizó la curva de calibración con una solución de albúmina de huevo de 0,01 %. Una vez obtenida la ecuación de la curva se determinó la concentración de la muestra de fermentación como se muestra en el Anexo IX. La concentración de proteínas se estableció en gramos de proteína por gramos de sustrato seco (gp/gss).

2.5 DETERMINACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA PARA LA PRODUCCIÓN DE ENZIMA AMILASA POR FERMENTACIÓN SÓLIDA

El efecto de la temperatura se determinó simultáneamente con el sustrato que presentó las mejores condiciones para la producción enzimática. Se empleó el diseño experimental detallado en el acápite 2.4.2, donde se analizó la generación de amilasa y concentración de proteínas a temperatura ambiente y 30 °C en cáscara de arroz, papa y trigo.

Se realizó un análisis estadístico ANOVA para establecer el efecto tanto del sustrato como de la temperatura en la producción de amilasa y en la concentración de proteínas; además se efectuó la prueba de comparación múltiple de Duncan en el programa STATGRAPHICS.

2.6 DISEÑO DE LA PLANTA DE PRODUCCIÓN DE ENZIMA AMILASA POR FERMENTACIÓN SÓLIDA

2.6.1 SELECCIÓN DE LA CONFIGURACIÓN DE LA PLANTA PILOTO

Se eligió una configuración del reactor, que permita el control de la temperatura del lecho y la toma de muestras durante la fermentación. En el sistema de biorreactores empleado en la parte experimental, fue necesario retirar una columna para medir la actividad enzimática y la concentración de proteínas

2.6.2 DISEÑO DE LA PLANTA A ESCALA PILOTO

Se realizó el diseño de la planta con base en fuentes bibliográficas. El tamaño de la planta piloto se determinó con la cantidad de sustrato procesada en cada fermentación, que tuvo una duración de 48 h y se consideró un funcionamiento de 300 días al año; además se estimó un día para la preparación del equipo.

La configuración seleccionada constó fundamentalmente de un humidificador y un fermentador. Para el cálculo de las dimensiones del humidificador se empleó la Figura 2.3 y se utilizaron las ecuaciones presentadas por León (2001) en el diseño de recipientes a presión (p. 10).

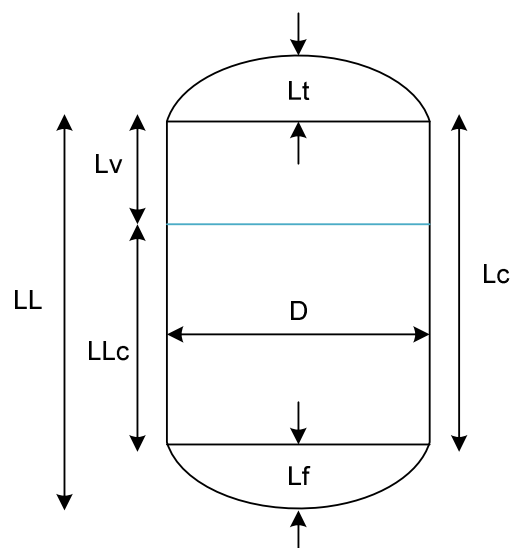


Figura 2.3. Diagrama de las dimensiones de un tanque

Se escogió una tapa bridada y cóncava estándar por ser la más utilizada en este tipo de recipientes. Para el cálculo de su altura se empleó la Ecuación 2.1.

$$L_f = 0,139 \times D \quad [2.1]$$

La presión hidrostática se determinó con la Ecuación 2.2, con la cual se obtuvo la presión de diseño.

$$P_h = \gamma \times h \quad [2.2]$$

$$P_d = 1,2 P_h \quad [2.3]$$

El espesor del humidificador y reactor se calculó con la Ecuación 2.4.

$$e = \frac{P_d D}{2 k E - p} + c \quad [2.4]$$

Donde:

- p : Presión aplicada en el interior del recipiente
- D : Diámetro interior del recipiente
- e : Espesor de la pared del recipiente
- k : Resistencia de trabajo del material del recipiente
- E : Eficiencia de la junta o soldadura

Para la ecuación anterior se tuvo como datos la resistencia del acero inoxidable de 545 MPa y la densidad aparente del salvado de trigo empaquetado igual a 320 kg/m³ (Singh y Heldman, 2013, p. 13).

2.6.3 CONTROL AUTOMÁTICO DE LA PLANTA A ESCALA PILOTO

Para definir el control automático de la planta se establecieron los parámetros más importantes que se requieren controlar en el proceso de fermentación. Se colocó un control avanzado para mantener la temperatura del lecho a 30 °C y evitar su incremento como consecuencia de la actividad metabólica del microorganismo. Además, se estableció un control por retroalimentación para aumentar la seguridad del proceso y evitar posibles daños en los equipos de la planta.

2.7 EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD TÉCNICO-ECONÓMICA DE LA PRODUCCIÓN DE ENZIMA AMILASA A PARTIR DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES

El análisis económico de la planta a escala piloto se realizó con las ecuaciones presentadas por Zugarramurdi y Parin (1995) en la ingeniería económica aplicada a la industria.

Se calculó la inversión fija (I_F) con la Ecuación 2.5, que considera los costos directos e indirectos.

$$I_F = I_E + \sum fd(I_E) + \sum fi(I_E) \quad [2.5]$$

Donde:

I_E : Costo de los equipos principales

Los factores directos (fd) e indirectos (fi) para una planta que procesa material sólido se presentan en las Tablas 2.5 y 2.6.

Tabla 2.5. Factores directos que intervienen en la inversión fija de una planta que procesa material sólido

Costos directos	Factor
Instalación de equipos	0,45
Instalación de instrumentación y control	0,18
Instalación de tuberías	0,16
Instalación de sistemas eléctricos	0,10
Servicios	0,25
Mejoras	0,15
Instalaciones de servicio	0,40
Total	1,69

(Sinnott, 2005, p. 252)

Tabla 2.6. Factores indirectos que intervienen en la inversión fija de una planta que procesa material sólido

Costos indirectos	Factor
Ingeniería y supervisión	0,33
Gastos de construcción	0,39
Gastos legales	0,04
Cargo del contratista	0,17
Contingencia	0,35
Total	1,28
Capital de trabajo	0,7

(Sinnott, 2005, p. 252)

La inversión en equipos auxiliares ($I_{F'}$) fue estimada según la Ecuación 2.6.

$$I_{F'} = 0,25 \times I_F \quad [2.6]$$

El costo de producción (C_{Total}) se determinó por el método de los factores y se empleó la Ecuación 2.7.

$$C_{Total} = C_{IF} + C_Q + C_L \quad [2.7]$$

Los costos anuales proporcionales a la inversión fija (C_{IF}) se calcularon con la Ecuación 2.8.

$$C_{IF} = I_F \times \sum fa \quad [2.8]$$

En la Tabla 2.7 se presentan los factores utilizados para establecer los costos anuales relacionados con la inversión fija.

Tabla 2.7. Factores que influyen en los costos anuales proporcionales a la inversión fija

Parámetro	fa
Mantenimiento y reparación	0,10
Depreciación	0,10
Impuestos	0,01
Seguros	0,03
Suministros complementarios	0,05
TOTAL	0,29

(Sinnott, 2005, p. 252)

Los costos anuales proporcionales a la cantidad anual de producción (C_Q) se determinaron con la Ecuación 2.8.

$$C_Q = Q (m + n + o + p) \quad [2.9]$$

Donde:

Q : Cantidad anual de producción (L)

m : Materia prima (USD/L enzima)

n : Agua (USD/L enzima)

o : Energía eléctrica (USD/L enzima)

p : Combustible (USD/L enzima)

Los costos anuales proporcionales a la mano de obra directa (C_L) se establecieron con la Ecuación 2.9.

$$C_L = L \times [1 + (2 \text{ a } 4)] \quad [2.10]$$

Donde:

L : Costo de la mano de obra al año

Se calcularon los parámetros financieros VAN y TIR para establecer la factibilidad económica de la producción de amilasa a escala piloto.

A continuación se determinó el tamaño mínimo de planta para obtener rentabilidad en la producción de amilasa, para lo cual se utilizó la hoja de Excel generada para el análisis económico a escala piloto. Se incrementó la cantidad de reactores, los cuales trabajan bajo las mismas condiciones que el establecido en el acápite 2.7, hasta obtener un TIR mayor al que se puede acceder en los bancos nacionales que es alrededor del 6 %. Se determinó la capacidad mínima de la planta al multiplicar el número de reactores obtenido por la cantidad que produce cada uno de ellos anualmente.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS MATERIAS PRIMAS

Los resultados de la caracterización química de las materias primas empleadas en la fermentación sólida se presentan en la Tabla 3.1, los cuales se obtuvieron en el laboratorio de Pulpa y Papel de la Escuela Politécnica Nacional y se presentan en el Anexo IV.

Tabla 3.1. Resultados de la caracterización química de las materias primas utilizadas como sustratos en la fermentación sólida

Muestra	Humedad (%)	Celulosa (%)	Lignina (%)	Resinas, grasas y ceras (%)	Otros (%)
Cáscara de arroz	7,84	35,80	24,05	1,28	38,87
Cáscara de papa	6,49	15,52	4,77	3,21	76,50
Cáscara de trigo	5,28	13,14	10,05	3,52	73,29

* Los contenidos de celulosa, lignina, resinas, ceras y grasas están reportados en base seca

Como se indica en la Tabla 3.1 la cáscara de arroz presentó 35,80 % de celulosa y 24,05 % de lignina, que son los valores más altos de los tres sustratos que se emplearon en la fermentación sólida. Los rangos encontrados del análisis químico de la cascarilla de arroz corresponden a 25,89 - 35,50 % de celulosa, 18,10 - 21,35 % de hemicelulosa y 18,20 - 24,60 % de lignina (Valverde, Sarria y Monteagudo, 2007, p. 257). Por lo que la cáscara de arroz empleada presentó un contenido de celulosa mayor al establecido, pero el porcentaje de lignina se encontró dentro del rango.

Según los resultados obtenidos por Gordón y Chao (2013) en la caracterización del salvado de trigo el contenido de celulosa y lignina son respectivamente 8,30 y 3,20 %; los valores obtenidos en el presente estudio fueron mayores y en el caso del porcentaje de lignina fue equivalente al triple (p. 528). Esto puede atribuirse a los diversos factores que influyen en la composición y porcentaje de estos

polímeros como la especie, la edad y la etapa de crecimiento de la planta (Cuervo et al., 2009, p. 12).

No se disponen de estudios que reporten el contenido de celulosa y lignina de la cáscara de papa; sin embargo, Devinder, Mona y Hradesh (2012) realizaron una publicación acerca de las características físico-químicas de la fibra dietética de la cáscara de papa, donde se presentó el porcentaje de la fibra insoluble que corresponde a la suma del contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina con un valor de 73,35 % (p. 27). En este caso si se suman los porcentajes de celulosa y lignina de la Tabla 3.1 se obtiene un valor de 20,29 %, por lo que se podría determinar que la cantidad restante 53,06 % corresponde a la hemicelulosa que es un polisacárido que interacciona con la celulosa y lignina para proporcionar rigidez a la pared celular del residuo (Saval, 2012, p. 22).

La humedad se encontró en un rango de 5 a 8 %, por lo que se adicionó agua para alcanzar un valor de 50 %, que favorece el crecimiento y desarrollo del microorganismo para obtener los mejores resultados.

El análisis granulométrico de las materias primas se presenta en las Tablas 3.2, 3.3 y 3.4.

Tabla 3.2. Análisis granulométrico de la cáscara de arroz utilizada como sustrato

Malla No.	Tamaño de partícula (mm)	Porcentaje retenido (%)
8	2,38	3,44
12	1,68	14,19
16	1,19	13,98
20	0,84	55,10
Fondo	<0,84	13,29

Tabla 3.3. Análisis granulométrico de la cáscara de papa empleada como sustrato

Malla No.	Tamaño de partícula (mm)	Porcentaje retenido (%)
6	3,36	4,68
8	2,38	19,29
12	1,68	21,29
16	1,19	43,12
Fondo	<1,19	10,95

Tabla 3.4. Análisis granulométrico del salvado de trigo usado como sustrato

Malla No.	Tamaño de partícula (mm)	Porcentaje retenido (%)
8	2,38	2,51
12	1,68	17,78
16	1,19	54,33
20	0,84	15,23
Fondo	<0,84	10,15

Se observa que la cáscara de arroz presentó, principalmente, un tamaño de partícula de 0,84 mm; mientras que, la cáscara de papa y salvado de trigo 1,19 mm. Según los resultados obtenidos por Sharanappa, Wani y Patil (2011) en la producción de α -amilasa con el uso de residuos de la industria alimenticia, la mayor actividad enzimática se obtuvo con un tamaño de partícula de 0,85 mm (p. 475).

Mientras que para Balkan y Ertan (2007) los tamaños de partícula mayores e iguales a 1 mm favorecieron la producción de α -amilasa, porque proporcionaron una mejor eficiencia en la relación respiración/aireación (p. 441). Por lo tanto, los tamaños de los sustratos que se emplearon para la fermentación sólida se encuentran dentro del rango que proporcionaría las mejores condiciones para el desarrollo del microorganismo y generación de la enzima.

3.2 DETERMINACIÓN DEL SUSTRATO MÁS ADECUADO Y LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA PARA LA PRODUCCIÓN DE AMILASA POR FERMENTACIÓN SÓLIDA

3.2.1 DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE LA PRODUCCIÓN DE AMILASA

Se comprobó la producción de amilasa por parte de la cepa de *Aspergillus niger* 22343 en un medio de cultivo agar-almidón, porque al colocar la solución de lugol sobre la superficie de la placa a las 48 h, se formó un halo transparente alrededor del sitio donde se inoculó el microorganismo, lo cual se puede observar en las Figuras 3.1 y 3.2.

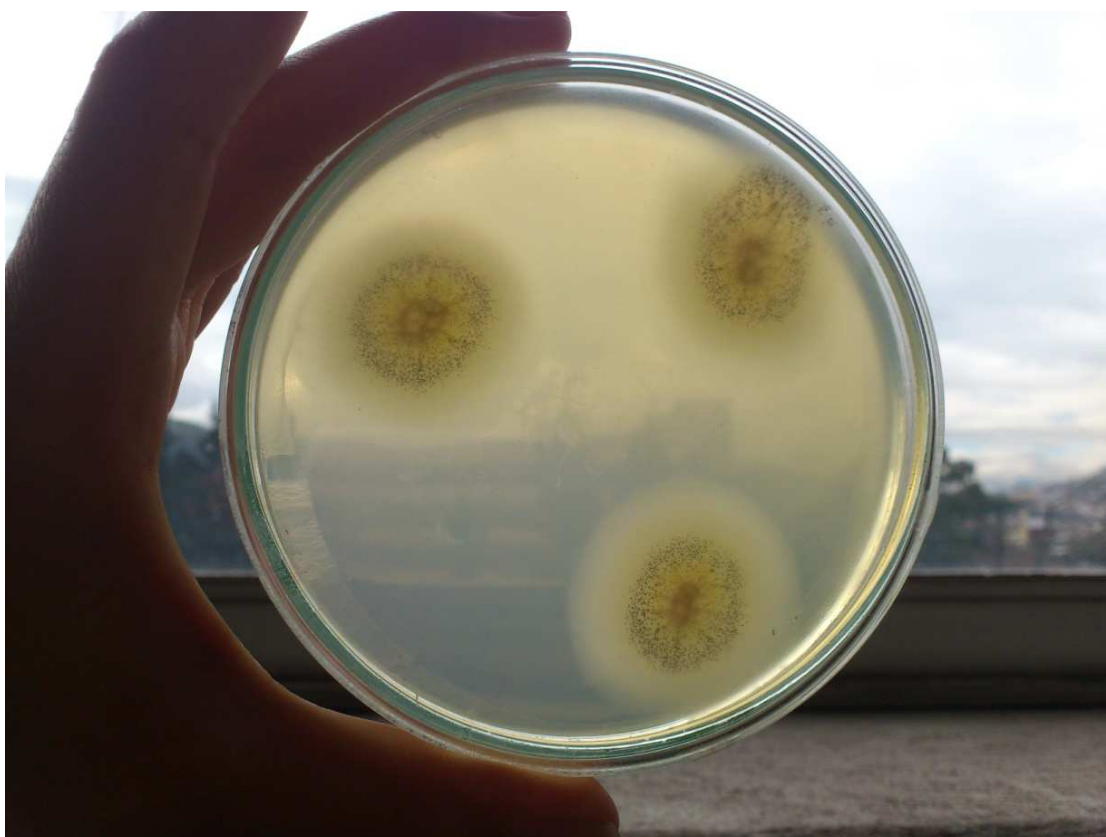


Figura 3.1. Desarrollo del microorganismo *Aspergillus niger* 22343 en el medio de cultivo agar-almidón



Figura 3.2. Prueba de lugol para la determinación cualitativa de la producción de enzima amilasa

3.2.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

Para cada sustrato se realizó una curva de calibración, la Figura 3.3. corresponde a la curva que se empleó para determinar la actividad amilásica producida en la cáscara de papa.

La Figura 3.4 corresponde a la curva de calibración que se utilizó para establecer la concentración de proteínas en la cáscara de arroz, durante el proceso de fermentación.

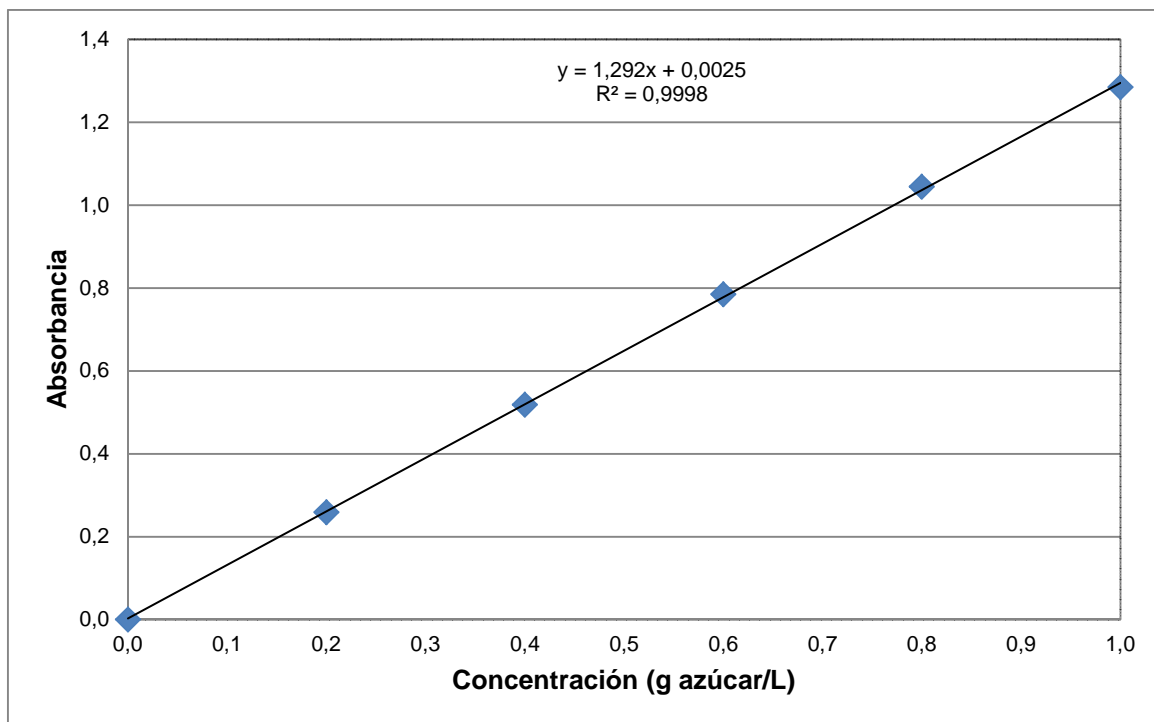


Figura 3.3. Curva de calibración de D-glucosa para determinar la actividad amilásica a $\lambda=490$ nm

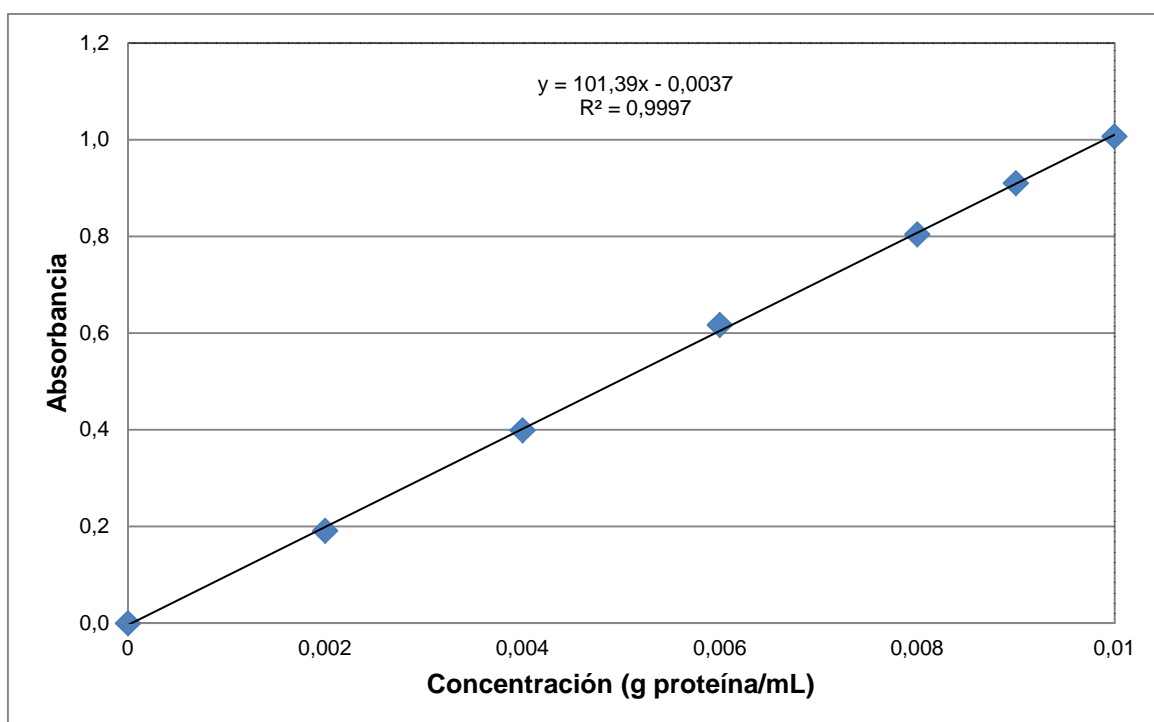


Figura 3.4. Curva de calibración de proteínas para determinar su concentración a $\lambda=555$ nm

3.2.2.1 Cáscara de arroz

En la Tabla 3.5 y 3.6 se presentan los valores de la actividad amilásica obtenidos por el desarrollo del microorganismo *Aspergillus niger* en la cáscara de arroz a 13 y 30 °C, durante 48 h de fermentación.

Tabla 3.5. Actividad enzimática con el tiempo en cáscara de arroz a 13 °C

Tiempo (h)	Actividad enzimática (umol/g sustrato seco.min)		
	T1	T1'	Promedio
0	0,000	0,000	0,000
3	0,926	0,347	0,636
6	1,158	0,751	0,954
21	1,808	2,228	2,018
24	2,053	2,681	2,367
27	3,459	4,321	3,890
30	4,728	5,154	4,941
45	6,411	6,129	6,270
48	7,116	6,687	6,902

Tabla 3.6. Actividad enzimática con el tiempo en cáscara de arroz a 30 °C

Tiempo (h)	Actividad enzimática (umol/g sustrato seco.min)		
	T2	T2'	Promedio
0	0,000	0,000	0,000
3	1,204	0,874	1,039
6	0,734	2,117	1,426
21	5,520	5,723	5,622
24	6,408	7,497	6,952
27	7,045	8,192	7,619
30	8,579	9,860	9,219
45	9,871	11,975	10,923
48	11,568	13,373	12,471

En la Figura 3.5 se presenta la actividad enzimática producida en la cáscara de arroz a 13 y 30 °C.

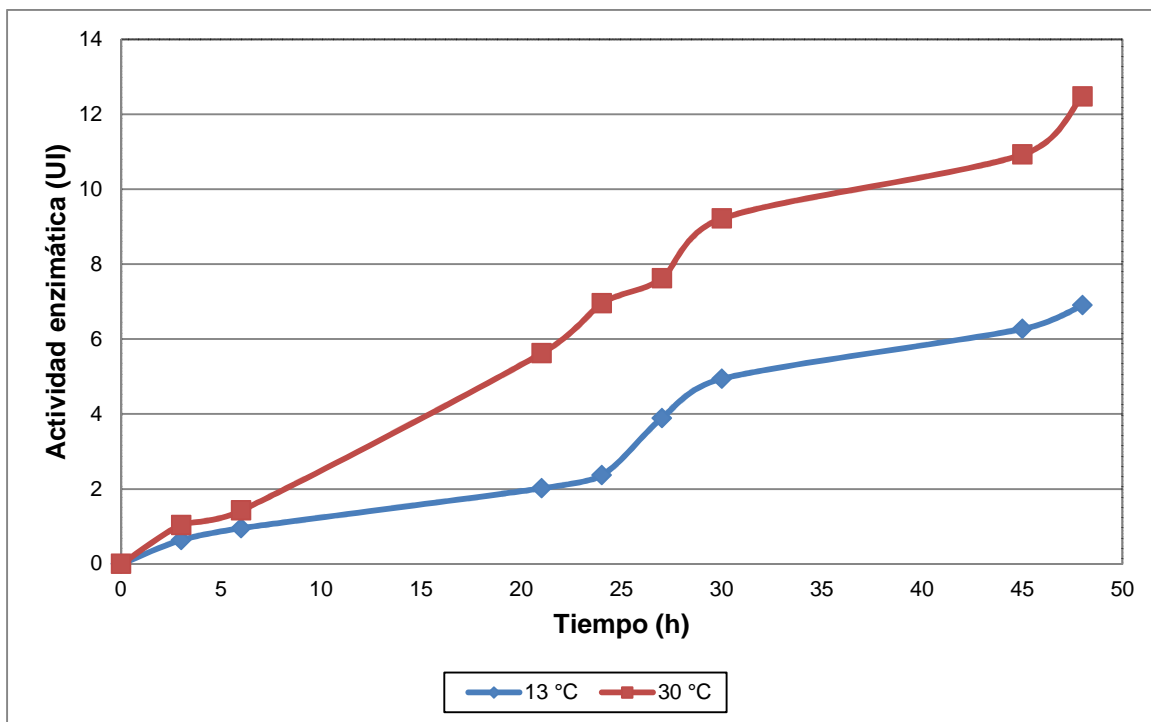


Figura 3.5. Actividad amilásica en función del tiempo en cáscara de arroz a 13 y 30 °C

Como se observa en la Figura 3.5, la actividad amilásica se incrementó con el tiempo de fermentación y presentó una tendencia semejante a 13 y 30 °C. La actividad tuvo una diferencia de 0,472 UI a las 6 h, con el transcurso del tiempo se evidenció cómo la temperatura influye en la producción, ya que a las 21 h los valores difieren en 3,604 UI, a las dos temperaturas empleadas.

La actividad enzimática fue de 6,902 UI a 13 °C; mientras que, el valor se incrementó a 12,471 UI a 30 °C a las 48 h, por lo que la producción de amilasa aumentó 1,81 veces a la mayor temperatura.

Durante el proceso de fermentación tanto a 13 como 30 °C, no se observó crecimiento apreciable del microorganismo.

En la Tabla 3.7 y 3.8 se presentan los resultados de la concentración de proteínas en función del tiempo, al emplear como sustrato cáscara de arroz.

Tabla 3.7. Concentración de proteínas con el tiempo en cáscara de arroz a 13 °C

Tiempo (h)	Concentración (g proteína/g sustrato seco)		
	T1	T1'	Promedio
0	0,000	0,000	0,000
3	0,001	0,002	0,002
6	0,003	0,003	0,003
21	0,009	0,010	0,009
24	0,009	0,011	0,010
27	0,010	0,013	0,012
30	0,010	0,013	0,011
45	0,013	0,014	0,014
48	0,014	0,015	0,014

Tabla 3.8. Concentración de proteínas con el tiempo en cáscara de arroz a 30 °C

Tiempo (h)	Concentración (g proteína/ g sustrato seco)		
	T2	T2'	Promedio
0	0,000	0,000	0,000
3	0,004	0,001	0,002
6	0,003	0,004	0,004
21	0,014	0,015	0,015
24	0,015	0,017	0,016
27	0,015	0,019	0,017
30	0,017	0,020	0,019
45	0,023	0,027	0,025
48	0,028	0,029	0,029

En la Figura 3.6 se presenta la concentración de proteínas en la cáscara de arroz a 13 y 30 °C.

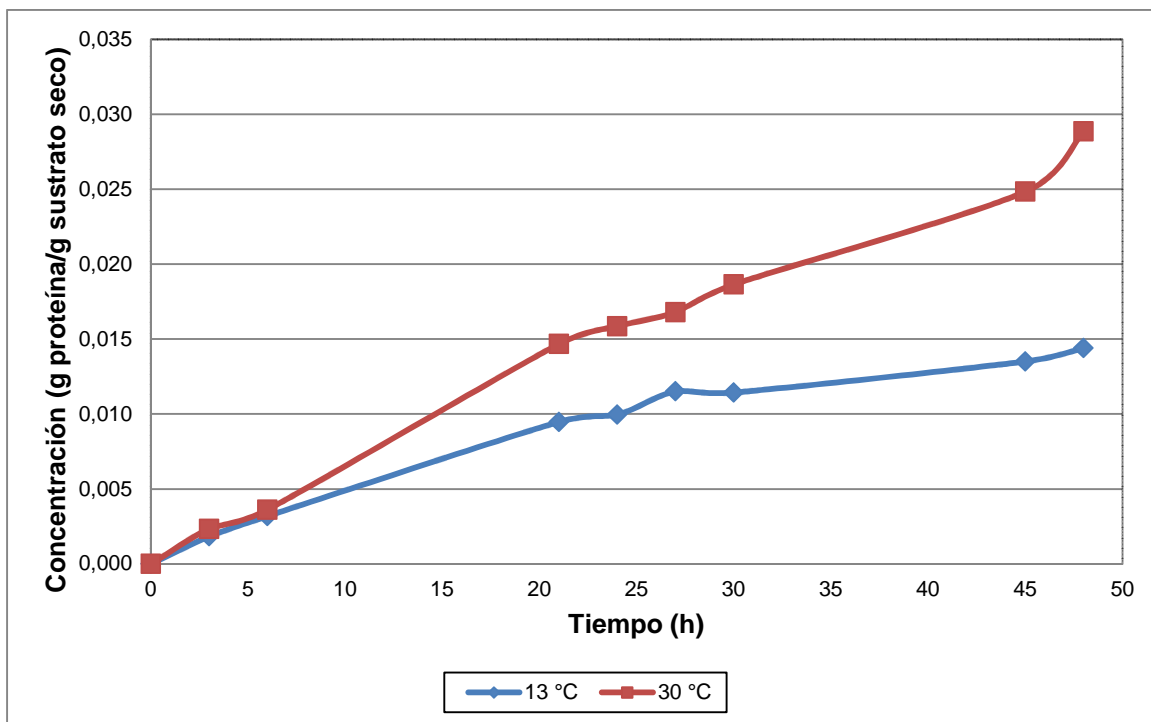


Figura 3.6. Concentración de proteínas en función del tiempo en cáscara de arroz a 13 y 30 °C

Como se observa en la Figura 3.6 la concentración de proteínas se incrementó con el tiempo, la concentración difiere 0,001 gp/gss a las 6 h; mientras que, la diferencia se incrementó a 0,006 gp/gss a las 21 h, a las dos temperaturas analizadas.

La concentración alcanzó un valor de 0,014 gp/gss a 13 °C y 0,029 gp/gss a 30 °C a las 48 h de fermentación, por lo que aumentó 2,07 veces. En concordancia con la actividad enzimática, la concentración de proteínas alcanzó mayores valores cuando la fermentación se realizó a 30 °C, ya que a esta temperatura se favorece el crecimiento del microorganismo.

3.2.2.2 Cáscara de papa

En la Tabla 3.9 y 3.10 se resumen los resultados de la actividad amilásica alcanzados por el desarrollo del microorganismo en la cáscara de papa a 13 y 30 °C, durante 48 h de fermentación.

Tabla 3.9. Actividad enzimática con el tiempo en cáscara de papa a 13 °C

Tiempo (h)	Actividad enzimática (umol/g sustrato seco.min)		
	T3	T3'	Promedio
0	0,000	0,000	0,000
3	2,835	1,224	2,030
6	2,168	1,542	1,855
21	5,218	4,105	4,662
24	11,479	9,614	10,547
27	14,542	13,372	13,957
30	13,202	14,222	13,712
45	13,647	15,996	14,821
48	18,248	23,002	20,625

Tabla 3.10. Actividad de enzimática con el tiempo en cáscara de papa a 30 °C

Tiempo (h)	Actividad enzimática (umol/g sustrato seco.min)		
	T4	T4'	Promedio
0	0,000	0,000	0,000
3	2,540	5,761	4,151
6	7,224	10,892	9,058
21	17,324	16,724	17,024
24	22,225	18,497	20,361
27	29,705	29,598	29,652
30	27,727	31,834	29,780
45	44,133	47,907	46,020
48	48,341	55,843	52,092

En la Figura 3.7 se representa la actividad amilásica encontrada en la cáscara de papa a 13 y 30 °C.

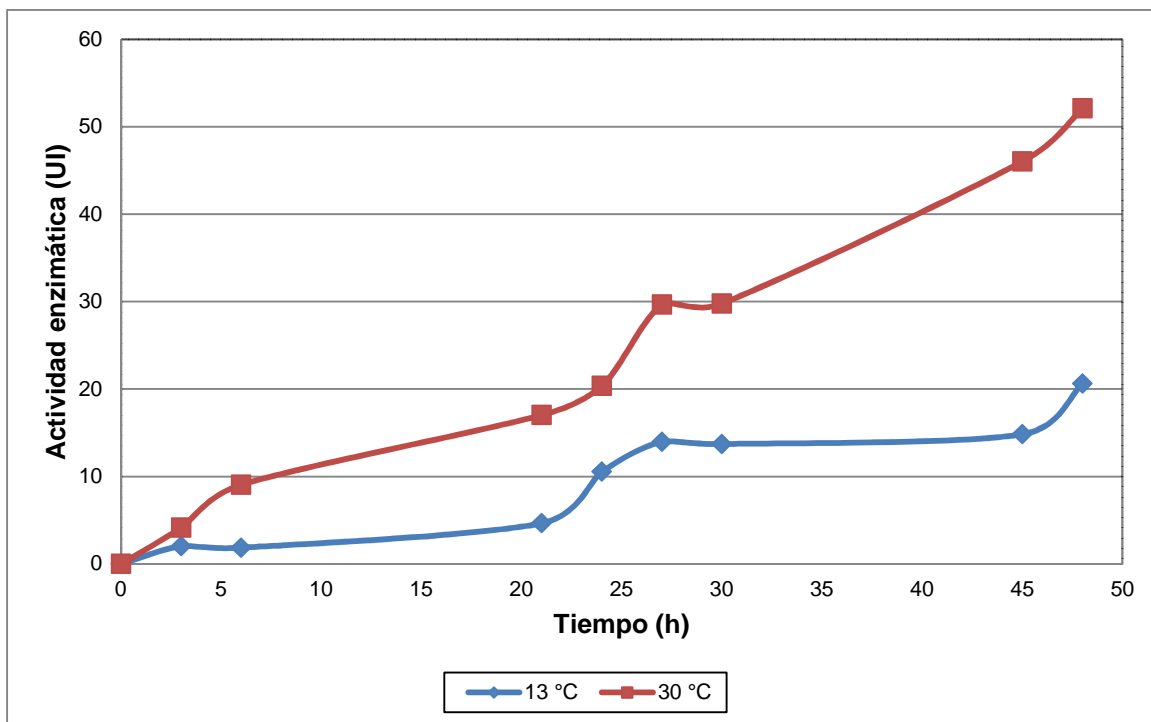


Figura 3.7. Actividad amilásica en función del tiempo en cáscara de papa a 13 y 30 °C

En la Figura 3.7 se observa que la actividad amilásica detectada aumentó con el tiempo de fermentación. El valor de la producción difiere 7,203 UI a las 6 h; mientras que, la diferencia se incrementó a 12,362 UI a las 21 h de fermentación, a las dos temperaturas empleadas.

La actividad enzimática alcanzó un valor de 20,625 UI a 13 °C y se incrementó a 52,092 UI a 30 °C a las 48 h; con lo cual se evidenció que el aumento de temperatura provoca que la producción de enzima se incremente 2,53 veces al final del proceso de fermentación.

A partir de las 21 h de fermentación se evidenció el desarrollo del microorganismo dentro del reactor de lecho empacado, que formó una capa blanquecina sobre el sustrato y presentó esporulación de color negro a las 48 h, lo cual se muestra en el Anexo V.

En la Tabla 3.11 y 3.12 se presentan los resultados de la concentración de proteínas en función del tiempo, al utilizar como sustrato cáscara de papa.

Tabla 3.11. Concentración de proteínas con el tiempo en cáscara de papa a 13 °C

Tiempo (h)	Concentración (g proteína/g sustrato seco)		
	T3	T3'	Promedio
0	0,000	0,000	0,000
3	0,003	0,002	0,002
6	0,005	0,006	0,005
21	0,021	0,020	0,020
24	0,023	0,021	0,022
27	0,027	0,025	0,026
30	0,027	0,028	0,028
45	0,031	0,035	0,033
48	0,034	0,039	0,036

Tabla 3.12. Concentración de proteínas con el tiempo en cáscara de papa a 30 °C

Tiempo (h)	Concentración (g proteína/ g sustrato seco)		
	T4	T4'	Promedio
0	0,000	0,000	0,000
3	0,004	0,011	0,007
6	0,011	0,022	0,016
21	0,025	0,033	0,029
24	0,033	0,030	0,031
27	0,046	0,045	0,046
30	0,048	0,051	0,049
45	0,058	0,086	0,072
48	0,073	0,097	0,085

En la Figura 3.8 se presenta la concentración de proteínas en la cáscara de papa a 13 y 30 °C.

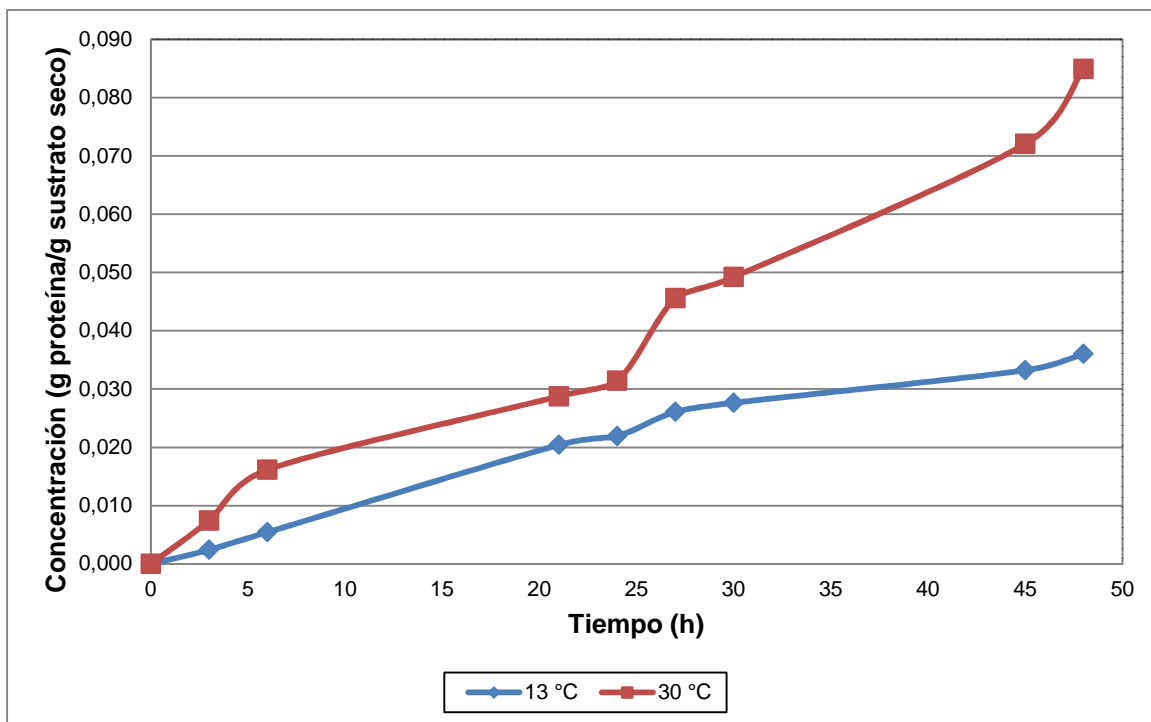


Figura 3.8. Concentración de proteínas en función del tiempo en cáscara de papa a 13 y 30 °C

En la Figura 3.8 se muestra la concentración de proteínas durante el tiempo, los valores difieren 0,005 gp/gss desde las 3 h. Al cabo de las 48 h de fermentación, la concentración a 13 °C fue 2,36 veces menor con un valor de 0,036 gp/gss; mientras que, a 30 °C alcanzó una concentración de 0,085 gp/gss, lo que permite concluir que a mayor temperatura se favorece el crecimiento del microorganismo.

El incremento de la concentración de proteínas tiene relación directa con el desarrollo del microorganismo, por esta razón alcanzó mayores valores a 30 °C.

3.2.2.3 Cáscara de trigo

En la Tabla 3.13 y 3.14 se muestran los datos de la actividad amilásica obtenidos por el desarrollo del microorganismo en el salvado de trigo a 13 y 30 °C, durante 48 h de fermentación.

Tabla 3.13. Actividad enzimática con el tiempo en salvado de trigo a 13 °C

Tiempo (h)	Actividad enzimática (umol/g sustrato seco.min)		
	T5	T5'	Promedio
0	0,000	0,000	0,000
3	0,690	2,186	1,438
6	1,194	1,437	1,315
21	7,646	8,775	8,210
24	9,039	11,948	10,494
27	9,894	13,409	11,652
30	12,362	17,066	14,714
45	17,995	20,934	19,465
48	23,588	30,529	27,059

Tabla 3.14. Actividad enzimática con el tiempo en salvado de trigo a 30 °C

Tiempo (h)	Actividad enzimática (umol/g sustrato seco.min)		
	T6	T6'	Promedio
0	0,000	0,000	0,000
3	0,865	2,744	1,805
6	4,771	2,839	3,805
21	33,860	27,282	30,571
24	36,968	28,014	32,491
27	41,732	31,759	36,746
30	41,692	49,506	45,599
45	69,204	74,855	72,030
48	85,667	81,328	83,498

En la Figura 3.9 se presenta la actividad amilásica encontrada en el salvado de trigo a 13 y 30 °C.

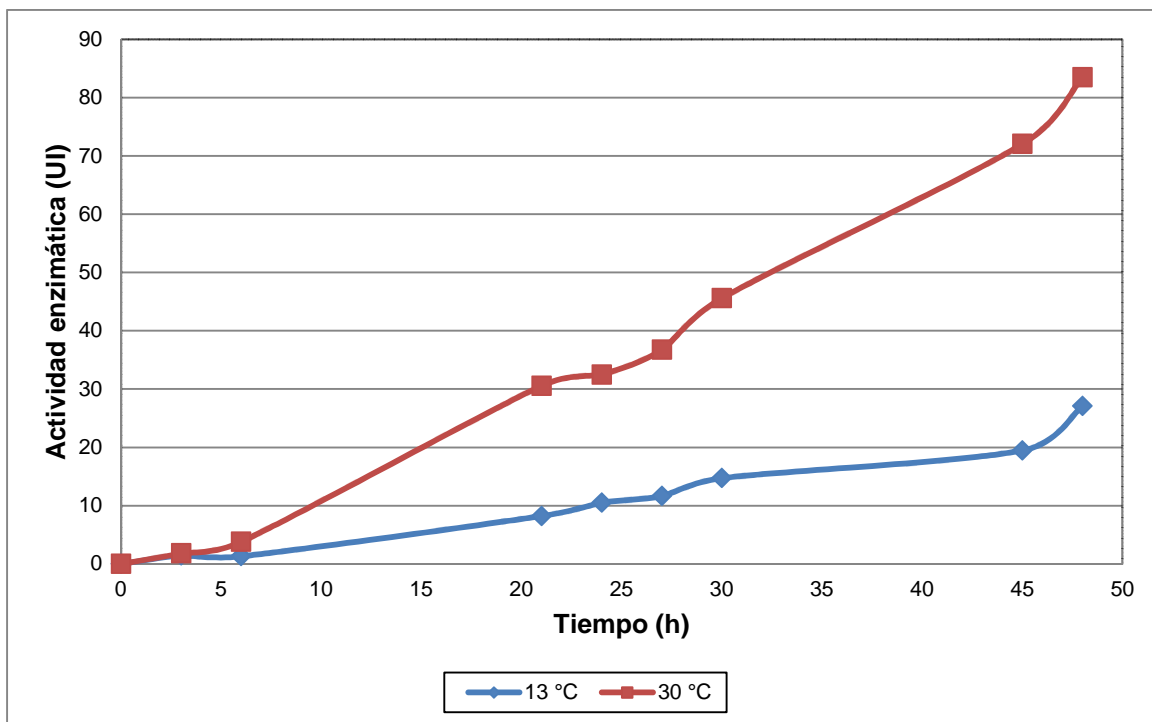


Figura 3.9. Actividad amilásica en función del tiempo en salvado de trigo a 13 y 30 °C

Como se indica en la Figura 3.9, la producción de amilasa se incrementó con el tiempo y tuvo una tendencia semejante a 13 y 30 °C. Las actividades difieren 2,490 UI a las 6 h y su diferencia aumentó a 22,361 UI a las 21 h de fermentación, a las dos temperaturas empleadas.

La actividad enzimática fue de 27,059 UI a 13 °C; mientras que, el valor se incrementó a 83,498 UI a 30 °C a las 48 h; por lo que la generación de la enzima aumentó 3,09 veces a la mayor temperatura.

Al igual que en la cáscara de papa, en este sustrato se evidenció el desarrollo del microorganismo dentro del reactor de lecho empacado a partir de las 21 h, ya que se formó una capa blanquecina sobre el salvado y presentó esporulación de color negro a las 48 h de fermentación, lo que se muestra en el Anexo V.

En la Tabla 3.15 y 3.16 se presentan los resultados de la concentración de proteínas en función del tiempo, al usar como sustrato salvado de trigo.

Tabla 3.15. Concentración de proteínas con el tiempo en salvado de trigo a 13 °C

Tiempo (h)	Concentración (g proteína/g sustrato seco)		
	T5	T5'	Promedio
0	0,000	0,000	0,000
3	0,001	0,010	0,006
6	0,006	0,016	0,011
21	0,015	0,034	0,025
24	0,017	0,036	0,026
27	0,021	0,042	0,031
30	0,026	0,053	0,039
45	0,036	0,057	0,047
48	0,051	0,065	0,058

Tabla 3.16. Concentración de proteínas con el tiempo en salvado de trigo a 30 °C

Tiempo (h)	Concentración (g proteína/g sustrato seco)		
	T6	T6'	Promedio
0	0,000	0,000	0,000
3	0,013	0,009	0,011
6	0,017	0,012	0,014
21	0,046	0,026	0,036
24	0,054	0,035	0,044
27	0,084	0,064	0,074
30	0,084	0,097	0,090
45	0,131	0,137	0,134
48	0,151	0,142	0,146

En la Figura 3.10 se presenta la concentración de proteínas del salvado de trigo a 13 y 30 °C.

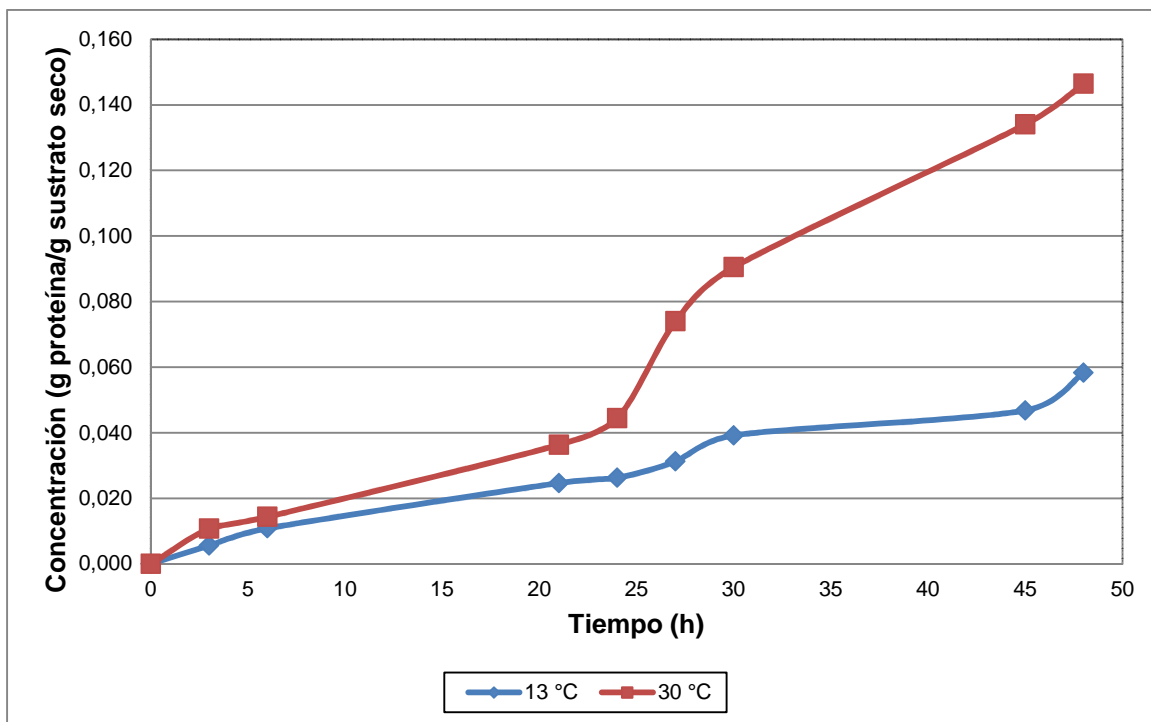


Figura 3.10. Concentración de proteínas en función del tiempo en salvado de trigo a 13 y 30 °C

Como se indica en la Figura 3.10 la concentración de proteínas durante el tiempo de fermentación presentó igual tendencia para ambas temperaturas, a las 6 h los valores difieren en 0,003 gp/gss; mientras que, la diferencia aumentó a 0,043 gp/gss a las 27 h de fermentación.

La concentración alcanzó un valor de 0,058 gp/gss y 0,146 gp/gss a 13 y 30 °C, respectivamente a las 48 h, por lo que se incrementó 2,56 veces la concentración de proteínas a la mayor temperatura.

3.2.3 DETERMINACIÓN DE LAS MEJORES CONDICIONES PARA LA PRODUCCIÓN DE AMILASA

3.2.3.1 Actividad enzimática

En la Figura 3.11 se presenta la actividad amilásica para los tres sustratos empleados a 13 °C.

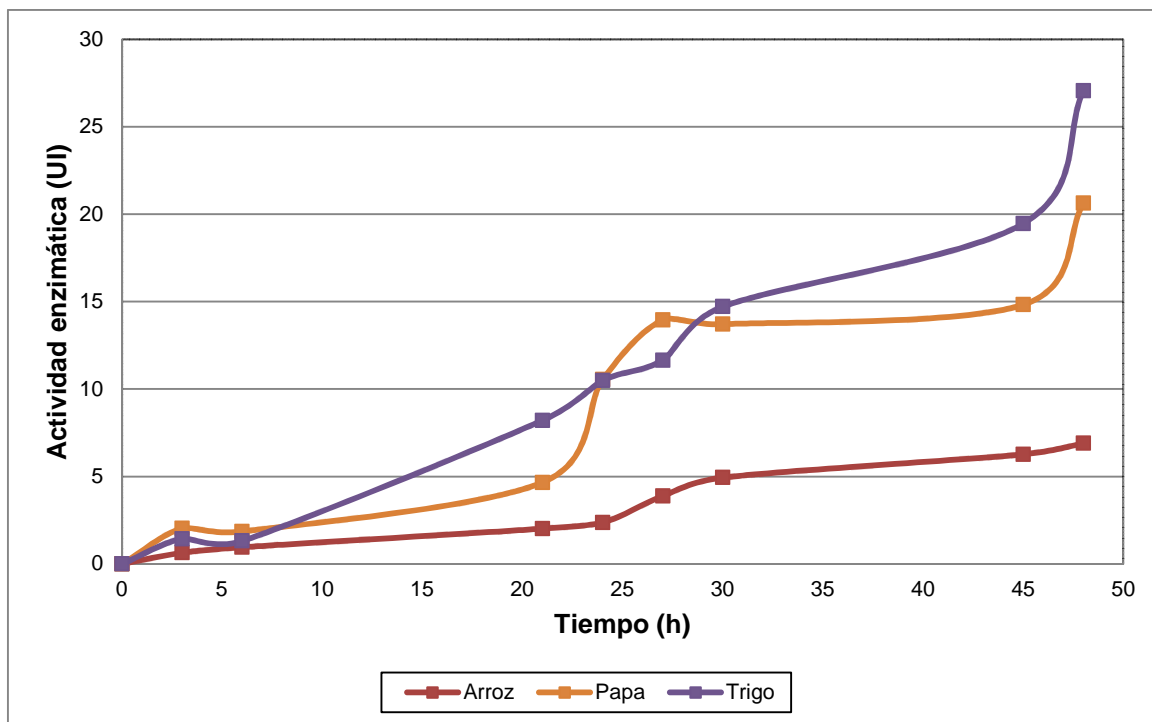


Figura 3.11. Actividad amilásica en función del tiempo en los tres sustratos de fermentación a 13 °C

Como se observa en la Figura 3.11 durante las 6 primeras horas la generación de amilasa fue semejante para los tres sustratos utilizados, en adelante el medio fue fundamental en el desarrollo del microorganismo. En el caso de la cáscara de arroz, la actividad enzimática no se incrementó en gran proporción como sucede con la cáscara de papa y salvado de trigo, este último generó la mayor producción de amilasa.

La cáscara de arroz y salvado de trigo presentaron una tendencia semejante en la generación enzimática; mientras que, la cáscara de papa mostró una distribución diferente ya que alcanzó una actividad mayor a las 27 h, posteriormente disminuyó y se mantuvo por debajo del salvado de trigo hasta finalizar la fermentación.

El salvado de trigo presentó la actividad enzimática más alta que fue 27,059 UI, seguido por la cáscara de papa con 20,625 UI y por último la cáscara de arroz con 6,902 UI.

En la Figura 3.12 se presenta la actividad amilásica para los tres sustratos empleados a 30 °C.

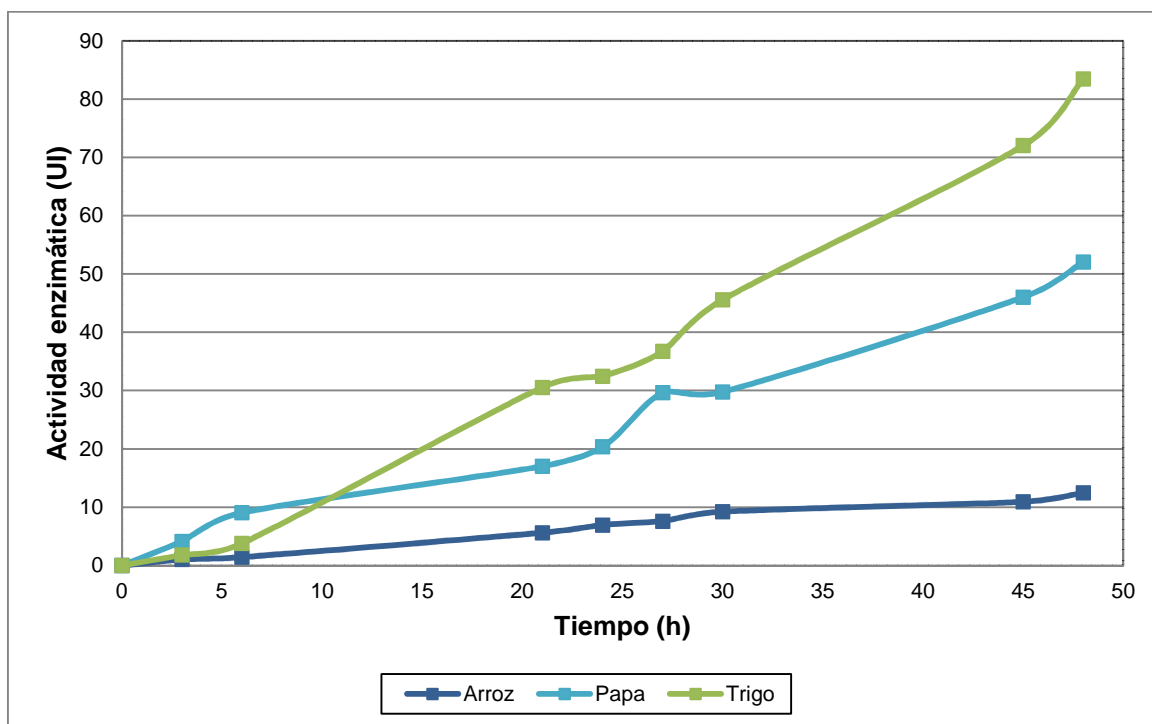


Figura 3.12. Actividad amilásica en función del tiempo en los tres sustratos de fermentación a 30 °C

Como se muestra en la Figura 3.12, el incremento de la actividad enzimática con el tiempo presentó una tendencia semejante para los tres sustratos empleados en la fermentación. Como sucedió a 13 °C, el sustrato que presentó la mayor actividad amilásica fue el salvado de trigo, seguido por la cáscara de papa y finalmente la cáscara de arroz.

También se puede observar que la cáscara de arroz y el salvado de trigo presentaron una actividad enzimática semejante hasta la sexta hora; mientras que, la cáscara de papa mostró valores mayores en las primeras horas de fermentación. El salvado de trigo alcanzó mayor producción de amilasa a partir de las 10 h hasta concluir el proceso.

El salvado de trigo alcanzó la mayor actividad enzimática que fue 83,498 UI, seguido por la cáscara de papa con 52,092 UI y finalmente la cáscara de arroz con 12,471 UI, luego de 48 h de fermentación.

En la Figura 3.13 se presenta la actividad amilásica para los tres sustratos empleados a 13 y 30 °C.

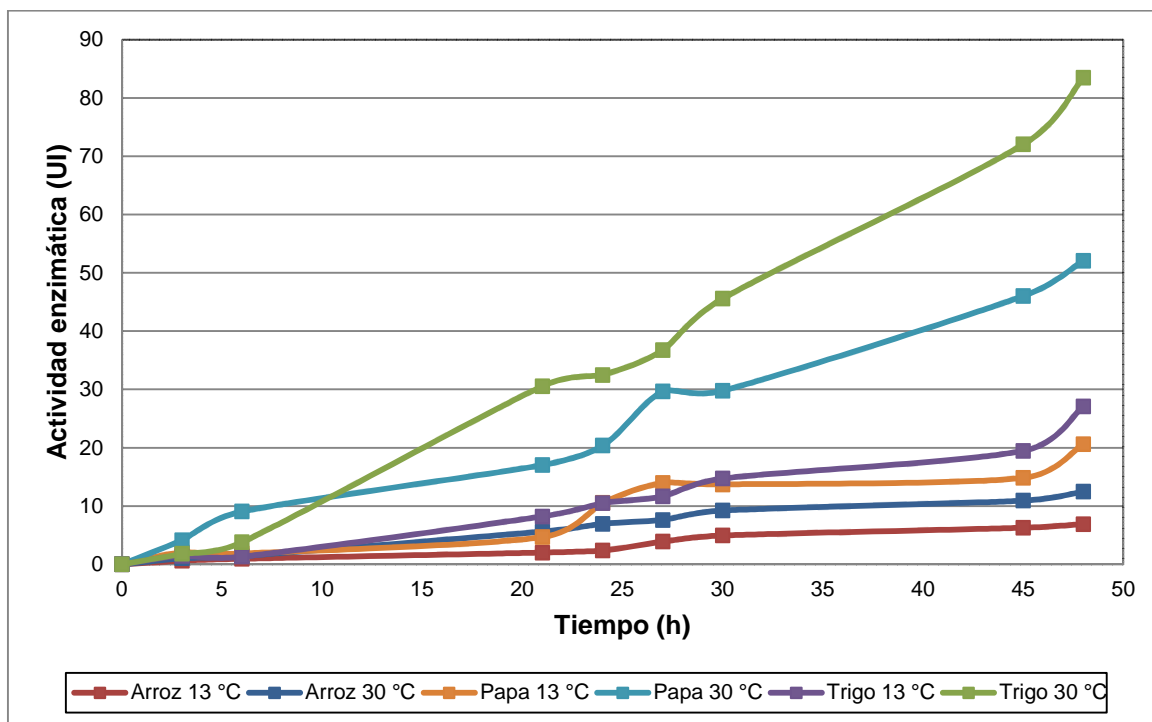


Figura 3.13. Actividad amilásica en función del tiempo en los tres sustratos de fermentación a 13 y 30 °C

En la Figura 3.13 se muestra la actividad enzimática en los tres sustratos a las dos temperaturas empleadas. Durante las 6 primeras horas el microorganismo se encuentra en la fase de latencia, donde se adaptó a las condiciones del medio de cultivo; por lo que no alcanzó valores altos de actividad, siendo el mayor la cáscara de papa con 9,058 UI a 30 °C. Todos los sustratos produjeron una actividad amilásica semejante hasta la sexta hora de fermentación, excepto la cáscara de papa a 30 °C, en la cual la fase de adaptación del microorganismo a las condiciones del medio, fue menor que en los otros casos.

El salvado de trigo presentó los mejores resultados de producción con un valor de 83,498 UI a 30 °C, seguido por la cáscara de papa con una actividad de 52,092 UI a la misma temperatura a las 48 h. Por lo que, estos dos tratamientos fueron los más adecuados para la producción de amilasa por fermentación sólida, en un sistema de biorreactores de lecho empacado.

A continuación se encuentran el salvado de trigo con una actividad enzimática de 27,059 UI y posteriormente la cáscara de papa con una producción de 20,625 UI a 13 °C, es importante destacar que estos dos sustratos a temperatura ambiente generaron mejores resultados que la cáscara de arroz a 30 °C.

Los resultados más bajos se obtuvieron con la cáscara de arroz que fueron 6,902 UI y 12,471 UI a 13 y 30 °C, respectivamente. Por esta razón, este sustrato no presentó condiciones adecuadas para el desarrollo del microorganismo.

Los resultados obtenidos eran los esperados, debido a que el salvado de trigo presenta un contenido de almidón de 20 % (Blas, Mateos y Rebollar, 2010, p. 97), lo cual habría permitido que el microorganismo disponga de los nutrientes necesarios para su crecimiento y metabolismo.

La cáscara de papa tiene un porcentaje de almidón de 17,5 %, cuyo valor depende del proceso de pelado (Akintomide y Antai, 2012, p. 15). Este sustrato presentó buenos resultados de generación de enzima; sin embargo, no fueron los mejores, esto podría atribuirse a que no presentó un tamaño de partícula uniforme, porque la molienda se realizó manualmente y existían fracciones que excedían el tamaño recomendado como se muestra en la Tabla 3.4.

Además, es importante mencionar que la cáscara de papa contiene un pigmento tóxico llamado solanina que pudo afectar el crecimiento del microorganismo. Este compuesto se destruye en gran cantidad cuando se le somete a una temperatura de 170 °C (Ruíz, 2011). Sin embargo, para este trabajo la cáscara de papa fue secada a 110 °C, temperatura sugerida por el trabajo de Suligoy (2012) que es la requerida para realizar el proceso de molienda, pero que no destruiría la solanina.

Las bajas actividades obtenidas en la cáscara de arroz, podría atribuirse a su menor contenido de almidón de 8,7 % (López, García, Karimi, Taherzadeh y Martín, 2010, p. 2 268).

El mayor porcentaje de celulosa presentó la cáscara de arroz con un valor de 35,80 %, seguido por la cáscara de papa con un contenido de 15,52 % y por último el salvado de trigo con 13,14 % de celulosa. Por lo que, con base en este estudio se podría suponer que un mayor contenido de celulosa, disminuye la producción de amilasa.

También, la cáscara de arroz tuvo el mayor contenido de lignina de 24,05 %, lo cual pudo afectar el desarrollo del microorganismo. La cáscara de papa y salvado de trigo presentaron un porcentaje de lignina de 4,77 y 10,05 %, respectivamente; por lo que se podría suponer que el contenido de lignina afecta en menor proporción que el porcentaje de celulosa, en la generación de amilasa.

El análisis estadístico del efecto del sustrato y la temperatura sobre la actividad enzimática (UI) al finalizar el proceso de fermentación, el que se presenta en la Tabla 3.17. Los superíndices fueron colocados con base en los resultados de la prueba de comparación múltiple de Duncan.

Tabla 3.17. Resultados de la producción enzimática* con tres sustratos y dos temperaturas diferentes luego de 48 h de fermentación

Sustrato	Temperatura	
	13 °C ¹	30 °C ²
Cáscara de arroz ^A	6,902 ± 0,303 ^a	12,471 ± 1,276 ^{ab}
Cáscara de papa ^B	20,625 ± 3,362 ^{bc}	52,092 ± 5,305 ^d
Salvado de trigo ^C	27,059 ± 4,908 ^c	83,498 ± 3,068 ^e

*Actividad enzimática promedio de las 4 réplicas ± error estándar
Sustratos y temperaturas con diferentes superíndices son significativamente diferentes
Las medias que poseen en común una letra del superíndice no son estadísticamente diferentes (P>0,05)

Como se observa en la Tabla 3.17, la temperatura influyó significativamente en la producción de amilasa, ya que la actividad se incrementó a 30 °C, especialmente

en el salvado de trigo. Los tratamientos de cáscara de arroz a 13 y 30 °C fueron estadísticamente iguales, por lo que trabajar con este sustrato a una temperatura mayor que la ambiental, no generó mejores resultados en la actividad enzimática.

La naturaleza del sustrato también afectó la generación de amilasa, por lo que se obtuvo distinta actividad en cada medio de fermentación. La cáscara de papa y salvado de trigo a 13 °C no tuvieron diferencia estadísticamente significativa, por lo que en este caso se elegiría el sustrato que sea más asequible y de menor costo para obtener los mismos resultados.

En la Figura 3.14 se muestra la gráfica de medias de la actividad enzimática, los tratamientos que comparten un área en común no tuvieron diferencia estadísticamente significativa, lo cual corresponde a lo reportado en la Tabla 3.17.

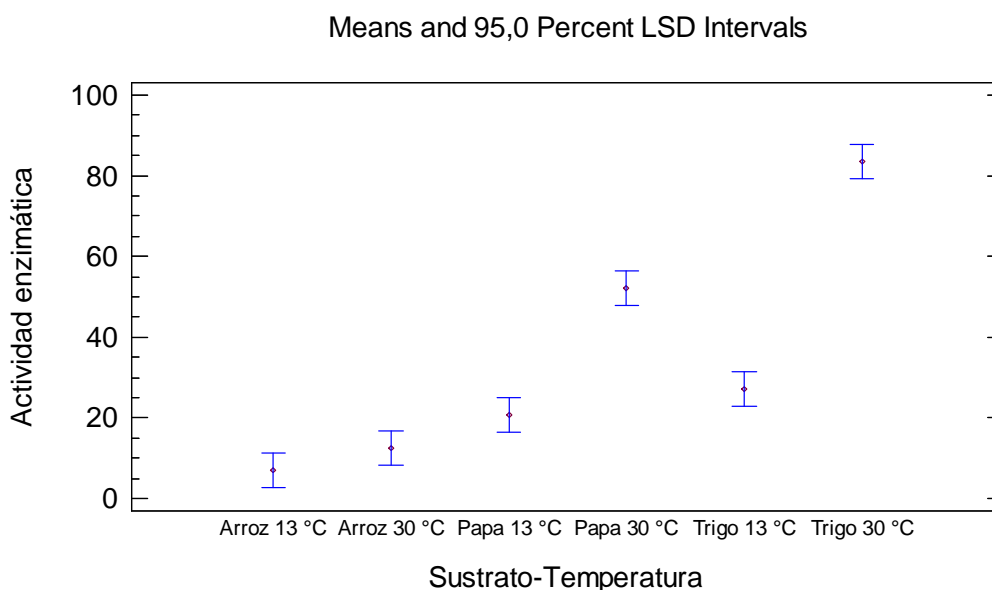


Figura 3.14. Gráfica de medias del análisis estadístico de la actividad enzimática de los tratamientos realizados

El análisis de varianza para la actividad enzimática se muestra en la Tabla 3.18.

Tabla 3.18. Análisis de varianza del diseño experimental para la actividad enzimática

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Razón-F	Valor-P
Sustrato	4 197,33	2	2 098,67	168,65	0,0000
Temperatura	2 912,53	1	2 912,53	234,05	0,0000
Sustrato.Temperatura	1 294,02	2	647,011	51,99	0,0002
Error	74,66	6	12,4439		
Total	8 478,54	11			

En la Tabla 3.18 de acuerdo con el valor de Razón-F se determinó que el efecto de la temperatura fue mayor con respecto al efecto del sustrato sobre la actividad enzimática. De igual forma, la interacción de los factores fue estadísticamente significativa, pero no tuvo la misma incidencia que el efecto independiente de cada factor.

Además, dentro del nivel de confianza del 95 %, se estableció que los factores, así como su interacción, fueron estadísticamente significativos sobre la producción de amilasa ($P < 0,05$).

En todos los tratamientos se incrementó la actividad enzimática con el tiempo, por esta razón sería fundamental extender el proceso y determinar el día de fermentación que alcanza la mayor producción de amilasa; según la publicación de Khan y Yadav (2011) la actividad más alta se obtiene al cuarto y quinto día de fermentación (p. 104).

Los resultados de un estudio similar de producción de α -amilasa en residuos agroindustriales realizado por Khan y Yadav (2011) se presentan en la Tabla 3.19.

Tabla 3.19. Resultados del estudio de la producción de α -amilasa en residuos agroindustriales

Sustrato	Actividad enzimática (U/mL.min)
Cáscara de arroz	0,047
Cáscara de plátano	0,050
Residuos vegetales (Cáscara de papa, tomate y brijal)	0,060
Salvado de trigo	0,080

(Khan y Yadav, 2011, p. 106)

Como se observa en la Tabla 3.19 el salvado de trigo alcanzó una mayor actividad enzimática, seguido por los residuos vegetales entre los que se encuentra la cáscara de papa y por último la cáscara de arroz, lo cual coincide con los resultados que se obtuvieron en el presente estudio.

En otro estudio sobre la producción de α -amilasa por fermentación sólida en cáscara de papaya realizado por Sharanappa et al. (2011), se obtuvo una actividad enzimática óptima de 41,22 UI a un tamaño de partícula de 0,85 mm, temperatura de 37 °C y 48 h de fermentación (p. 479). Al comparar este resultado con los obtenidos en el presente estudio se puede establecer que la cáscara de papa y salvado de trigo presentaron mejores resultados a 30 °C, en el caso del trigo fue 2,03 veces mayor. El uso de estos sustratos genera mejores resultados en la producción de amilasa.

Finalmente, es importante destacar que a pesar de que los residuos agroindustriales son una alternativa bastante atractiva para la producción de enzimas, resulta complicado para los microorganismos degradar la lignocelulosa como se comprobó en el caso de la cáscara de arroz. Por esta razón sería factible realizar un pretratamiento a los desechos, que consta de una humectación química con ácido o base, que aumente la porosidad del material, disminuya la cristalinidad de las fibras de celulosa, remueva la hemicelulosa y reduzca la cantidad de lignina (González, Soto, Rutiaga Quiñones O., Medrano, Rutiaga Quiñones J. y López, 2011, p. 18). En el pretratamiento se romperían las fibras, se provocaría un proceso de despolimerización y se destruiría parcialmente los

enlaces lignina-carbohidrato para obtener un producto fibroso, cuya celulosa sea más accesible al ataque del microorganismo.

3.2.3.2 Concentración de proteínas

En la Figura 3.15 se presenta la concentración de proteínas para los tres sustratos empleados a 13 °C.

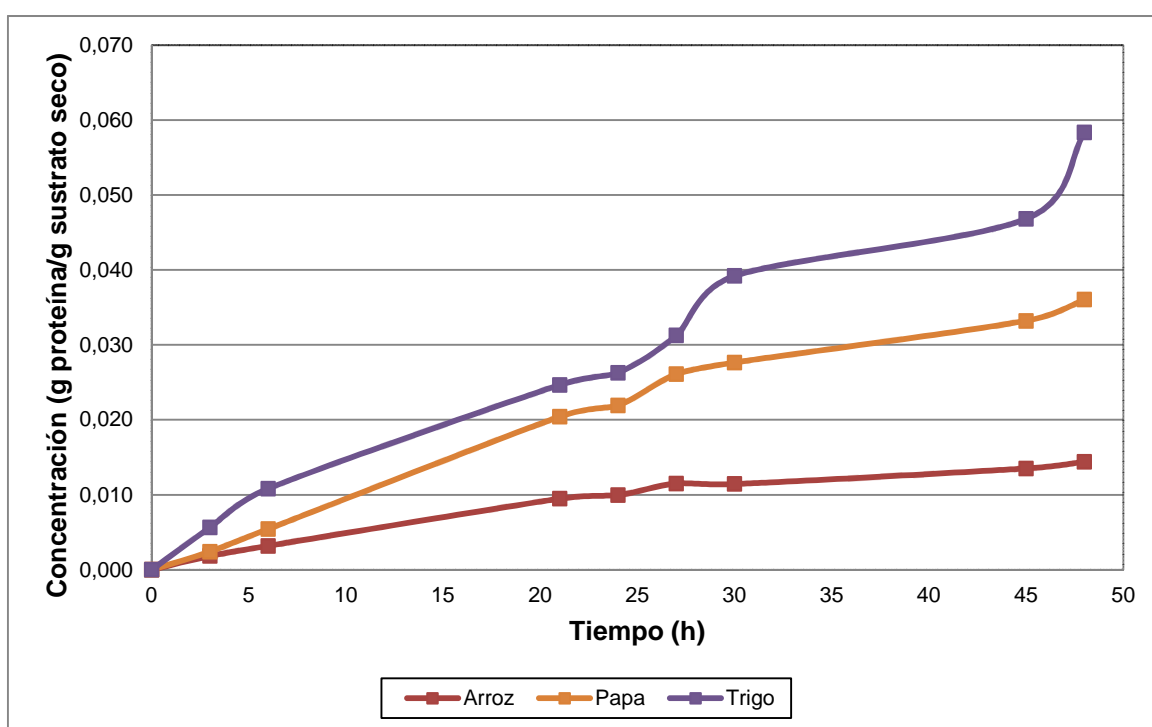


Figura 3.15. Concentración de proteínas en función del tiempo en los tres sustratos de fermentación a 13 °C

Como se observa en la Figura 3.15 la cantidad de proteínas se incrementó con el tiempo y presentó una distribución semejante para los tres sustratos a 13 °C. El salvado de trigo presentó el mayor valor que fue 0,058 gp/gss, seguido por la cáscara de papa con 0,036 gp/gss y por último la cáscara de arroz con 0,014 gp/gss.

En concordancia con la actividad enzimática, el salvado de trigo y la cáscara de papa presentaron un mayor incremento en la cantidad de proteínas, los valores

alcanzados por la cáscara de arroz fueron inferiores en comparación con los otros dos sustratos.

En la Figura 3.16 se presenta la concentración de proteínas para los tres sustratos empleados a 30 °C.

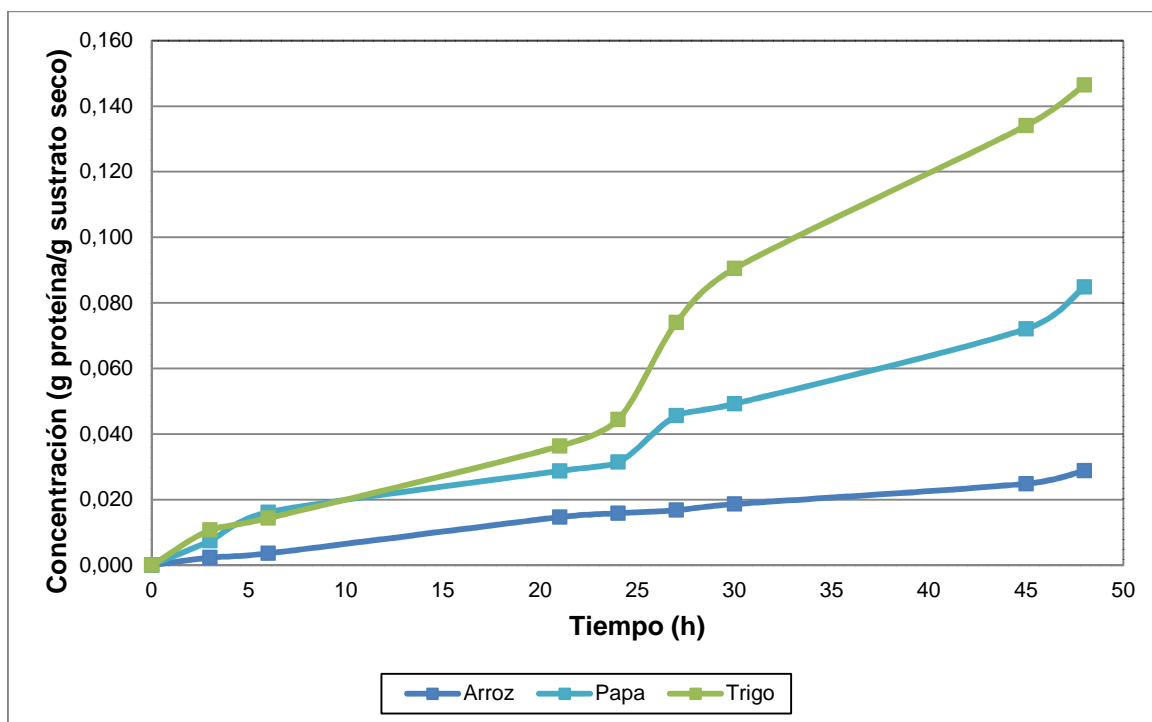


Figura 3.16. Concentración de proteínas en función del tiempo en los tres sustratos de fermentación a 30 °C

Como se indica en la Figura 3.16, la concentración de proteínas aumentó con el tiempo, la tendencia que presentaron los resultados para los tres sustratos fue semejante y coinciden con lo ocurrido a 13 °C.

El salvado de trigo alcanzó el valor más alto que fue 0,146 gp/gss, seguido por la cáscara de papa con 0,085 gp/gss y por último la cáscara de arroz con 0,029 gp/gss. Por esta razón, la concentración de proteínas en la cáscara de arroz fue inferior al alcanzado por los otros dos sustratos, durante todo el proceso de fermentación.

En la Figura 3.17 se presenta la generación de proteínas para los tres sustratos empleados a 13 y 30 °C.

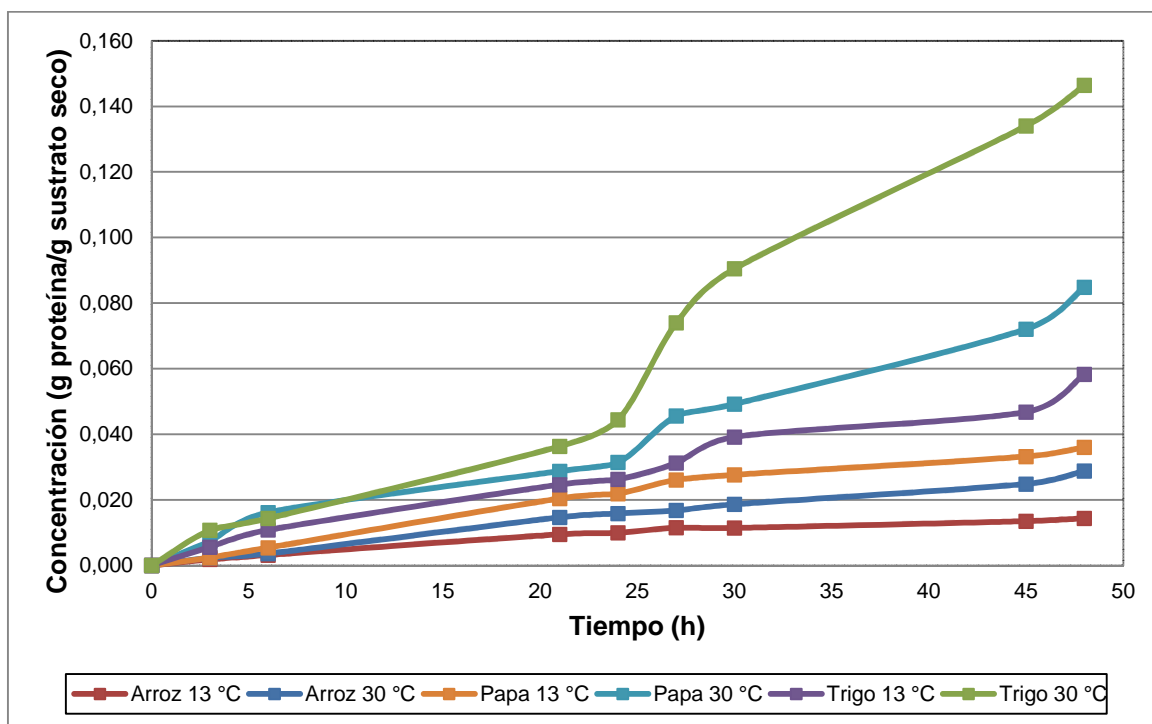


Figura 3.17. Concentración de proteínas en función del tiempo en los tres sustratos de fermentación a 13 y 30 °C

En la Figura 3.17 se muestra la concentración de proteínas con el tiempo, todos los tratamientos presentaron una tendencia semejante y durante las 6 primeras horas los valores no aumentaron en gran proporción en cada uno de los sustratos de fermentación.

El salvado de trigo presentó la mayor concentración de proteínas con un valor de 0,146 gp/gss a 30 °C, seguido por la cáscara de papa con 0,085 gp/gss a la misma temperatura a las 48 h. A continuación se encuentra el salvado de trigo y cáscara de papa a 13 °C con valores de 0,058 gp/gss y 0,036 gp/gss, respectivamente. Por último la cáscara de arroz que tuvo los resultados más bajos de 0,029 gp/gss a 30 °C y 0,014 gp/gss a 13 °C al finalizar el proceso de fermentación.

Al comparar la Figura 3.13 y 3.17 se puede observar que los resultados de los tratamientos presentaron la misma secuencia tanto para la actividad enzimática como para la concentración de proteínas.

El análisis estadístico del efecto del sustrato y la temperatura sobre la concentración de proteínas (g proteína/g sustrato seco) se presenta en la Tabla 3.20. Los superíndices fueron colocados con base en los resultados de la prueba de comparación múltiple de Duncan.

Tabla 3.20. Resultados de la concentración de proteínas* con tres sustratos y dos temperaturas diferentes luego de 48 h de fermentación

Sustrato	Temperatura	
	13 °C ¹	30 °C ²
Cáscara de arroz ^A	0,015 ± 0,001 ^a	0,029 ± 0,001 ^{ab}
Cáscara de papa ^B	0,037 ± 0,004 ^b	0,085 ± 0,017 ^c
Salvado de trigo ^C	0,058 ± 0,010 ^d	0,147 ± 0,006 ^e

*Concentración de proteínas promedio de las 4 réplicas ± error estándar
Sustratos y temperaturas con diferentes superíndices son significativamente diferentes
Las medias que poseen en común una letra del superíndice no son estadísticamente diferentes (P>0,05)

Como se observa en la Tabla 3.20 la temperatura tuvo efecto significativo en la concentración de proteínas, debido a que su valor aumentó a 30 °C. Los tratamientos de cáscara de arroz a 13 y 30 °C fueron estadísticamente iguales, lo cual coincide con lo sucedido en la actividad enzimática.

El tipo de sustrato también influyó en la concentración de proteínas, por lo que se obtuvo distinto valor en cada medio de fermentación. La cáscara de papa y trigo a 13 °C tuvieron una diferencia estadísticamente significativa, lo cual difiere a lo ocurrido en la actividad enzimática.

En la Figura 3.18 se presenta la gráfica de medias de la concentración de proteínas, los tratamientos que comparten un área en común fueron estadísticamente iguales, lo cual corresponde a lo establecido en la Tabla 3.20.

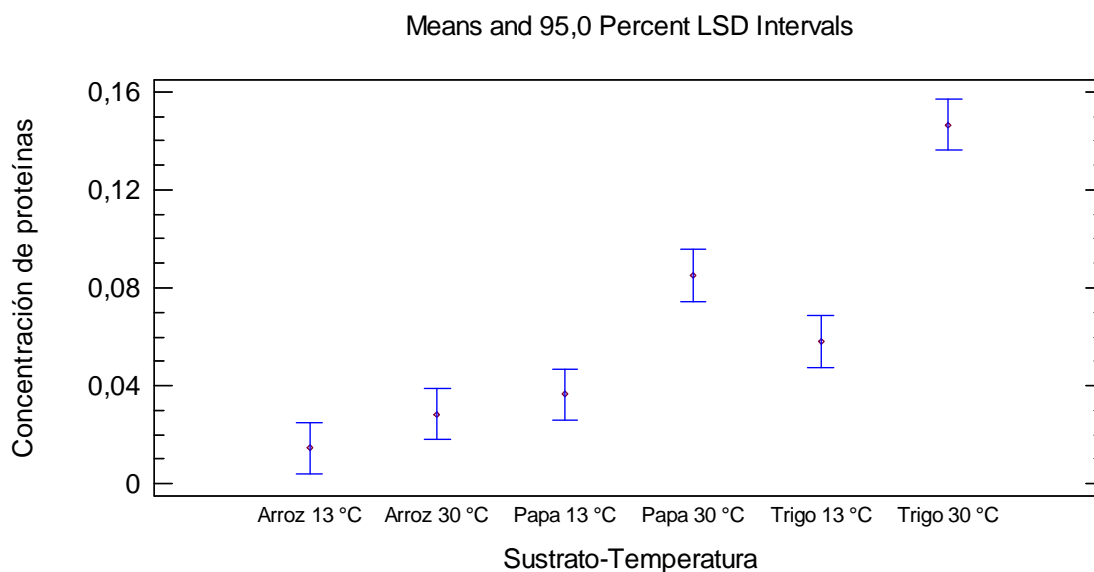


Figura 3.18. Gráfica de medias del análisis estadístico de la concentración de proteínas de los tratamientos realizados

El análisis de varianza para la concentración de proteínas se muestra en la Tabla 3.21.

Tabla 3.21. Análisis de varianza del diseño experimental para la concentración de proteínas

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Razón-F	Valor-P
Sustrato	0,0130	2	0,0065	88,94	0,0000
Temperatura	0,0076	1	0,0076	103,64	0,0001
Sustrato.Temperatura	0,0028	2	0,0014	18,96	0,0026
Error	0,0004	6	0,00007		
Total	0,0239	11			

En la Tabla 3.21 de acuerdo con el valor de Razón-F se estableció que el efecto de la temperatura fue mayor con respecto al efecto del sustrato sobre la concentración de proteínas y la interacción de los dos factores fue estadísticamente significativa, pero causa un efecto menor en comparación con el efecto individual de cada factor.

Además, dentro del nivel de confianza del 95 %, se determinó que los factores, así como su interacción, fueron estadísticamente significativos sobre la concentración de proteínas ($P < 0,05$).

En el estudio realizado por Khan y Yadav (2011) también se presenta la concentración de proteínas, cuyos resultados se muestran en la Tabla 3.22.

Tabla 3.22. Resultados de la producción de proteínas en residuos agroindustriales

Sustrato	Concentración de proteína (mg/mL)
Cáscara de arroz	0,059
Cáscara de plátano	0,070
Residuos vegetales (Cáscara de papa, tomate y brijal)	0,125
Salvado de trigo	0,187

(Khan y Yadav, 2011, p. 106)

Como se indica en la Tabla 3.22, el salvado de trigo presentó la concentración más alta de proteínas, seguido por la cáscara de papa y por último la cáscara de arroz, lo cual coincide con lo que obtenido en el presente estudio.

Debido a que el cultivo de trigo en el Ecuador es deficiente y ha disminuido con el transcurso del tiempo, se podría considerar como una buena opción para la producción de amilasa también la cáscara de papa a 30 °C que tuvo buenos resultados y tiene mayor disponibilidad dentro del país, con una producción de 57 020 TM en el año 2012. Sin embargo, se debería considerar el proceso de secado y molienda que requiere este sustrato para su empleo.

3.2.4 EVALUACIÓN DEL EQUIPO Y PARÁMETROS DE FERMENTACIÓN

En el sistema de biorreactores a pesar de que se controló la temperatura del baño termostático, no se tuvo una medida directa del cambio de temperatura en el lecho, que se incrementa por el metabolismo del microorganismo. Por esta razón, sería recomendable medir la producción de CO₂ para relacionarla con el calor

metabólico generado o diseñar un reactor que permita la inserción de termocuplas dentro del lecho.

Además, es importante destacar que el flujo de aire empleado de 4 L/h fue adecuado, ya que permitió mantener la humedad del sustrato alrededor del 50 % durante las 48 h de fermentación. Este porcentaje favorece el desarrollo del microorganismo en un reactor de lecho empacado, ya que un bajo contenido de humedad reduce la difusión de nutrientes; mientras que un alto nivel de humedad provoca que las partículas de sustrato se adhieran, lo cual impide el crecimiento de la cepa y dificulta la transferencia de oxígeno (Ali y Zulkali, 2011, p. 255; Saxena y Singh, 2011, p. 1 334). Debido a que el aire utilizado es húmedo afecta directamente a este parámetro.

Los valores de humedad de cada una de las muestras de fermentación se pueden observar en el Anexo VI.

3.3 DISEÑO DE LA PLANTA DE PRODUCCIÓN DE ENZIMA AMILASA POR FERMENTACIÓN SÓLIDA

3.3.1 SELECCIÓN DE LA CONFIGURACIÓN DE LA PLANTA PILOTO

La configuración de la planta de producción de amilasa a escala piloto que se muestra en la Figura 3.19 fue la más adecuada, debido a que el aire se calienta y humidifica previamente y el fermentador dispone de los puertos para la toma de muestras y control de temperatura.



Figura 3.19. Esquema del sistema de producción de amilasa por fermentación sólida a escala piloto

Existe una configuración diferente para este tipo de fermentación como el que presenta Milagres et al., (2004) donde utiliza un reactor enchaquetado para la producción de xilanasa a partir del bagazo de caña de azúcar; sin embargo, este presenta como inconveniente que la chaqueta utilizada para el control de la temperatura, dificulta la toma de muestras y la colocación de termocuplas a lo largo del lecho para evitar el calentamiento excesivo debido al metabolismo del microorganismo.

3.3.2 DISEÑO DE LA PLANTA A ESCALA PILOTO

Debido a que en el desarrollo del proyecto no se midió un parámetro que permita el escalamiento del equipo, se tomó como referencia el estudio realizado por Ghildyal et al. (1994), en el que se analiza el efecto de los gradientes de temperatura en un reactor de lecho empacado (p. 253). Se eligió esta publicación como base debido a que los parámetros de fermentación coinciden con los que presentaron los mejores resultados en este proyecto.

En la Tabla 3.23 se presentan las condiciones del estudio realizado por Ghildyal et al. (1994).

Tabla 3.23. Condiciones de fermentación de la planta de producción de amilasa a escala piloto

Parámetro	Descripción
Microorganismo empleado	<i>Aspergillus niger</i>
Producto final	Enzima glucoamilasa
Sustrato	Salvado de trigo
Temperatura	30 °C
Humedad del medio	51 %

(Ghildyal et al., 1994, p. 254)

El tamaño de la planta fue de 75 kg al año; el humidificador dispone de una chaqueta de calentamiento y tuvo como datos $L_v = 0,41$ m, $L_{LC} = 0,75$ m y $V_{\text{humidificador}} = 30$ L (Ghildyal et al., 1994, p. 254).

En la Tabla 3.24 se muestran las especificaciones del humidificador y los cálculos realizados para su determinación se encuentran en el Anexo X.

Tabla 3.24. Especificaciones del humidificador de la planta de producción de amilasa a escala piloto

Parámetro	Valor
Material	Acero inoxidable
Tapa	Cóncava estándar
Longitud	1,20 m
Diámetro	0,2 m
Espesor	2,38 mm

Para tanques pequeños o medianos que trabajan a presión, la relación L/D se encuentra en un intervalo de 4 a 6, por lo que el humidificador diseñado se encontró dentro del rango con un valor de 6.

En la Tabla 3.25 se muestran las especificaciones del fermentador.

Tabla 3.25. Especificaciones del fermentador de la planta de producción de amilasa a escala piloto

Parámetro	Valor
Material	Acero inoxidable
Tapa	Cónica
Longitud	0,35 m
Diámetro	0,15 m
Espesor	2,38 mm

El reactor de lecho empacado presenta una serie de agujeros de 10 mm a lo largo de la columna para insertar las termocuplas y controlar la temperatura durante la fermentación. Además para la toma de muestras dispone de otros orificios de 25 mm en una localización diferente a 33, 170 y 280 mm desde la base de la columna (Ghildyal et al., 1994, p. 254).

En la Tabla 3.26 se presenta las medidas de los reactores empleados en la parte experimental y el fermentador de la planta a escala piloto.

Tabla 3.26. Medidas de los reactores utilizados experimentalmente y el fermentador de la escala piloto

Parámetro	Reactor escala laboratorio (m)	Reactor escala piloto (m)
Longitud	0,20	0,35
Diámetro	0,02	0,15

Al comparar las medidas de los 2 reactores se puede observar que la longitud no se incrementó considerablemente, pero el radio aumentó alrededor de 8 veces en su magnitud. Esto es conveniente, debido a que el aire a medida que sale del humidificador disminuye su temperatura, por lo que a menor longitud del fermentador se reduce el tiempo de contacto del aire con el ambiente y se evita que este parámetro se reduzca en gran proporción respecto al valor inicial y deseado que es 30 °C.

3.3.3 CONTROL AUTOMÁTICO DE LA PLANTA A ESCALA PILOTO

En la Figura 3.20 se muestra el control automático que requiere la planta para un adecuado funcionamiento. Debido a que la temperatura es una de las variables que más influye en la velocidad de crecimiento de los microorganismos y es uno de los factores más difíciles de controlar en este tipo de fermentadores, se presentó una modalidad de control en cascada que emplea un controlador maestro y un controlador esclavo, para evitar el incremento de la temperatura del lecho.

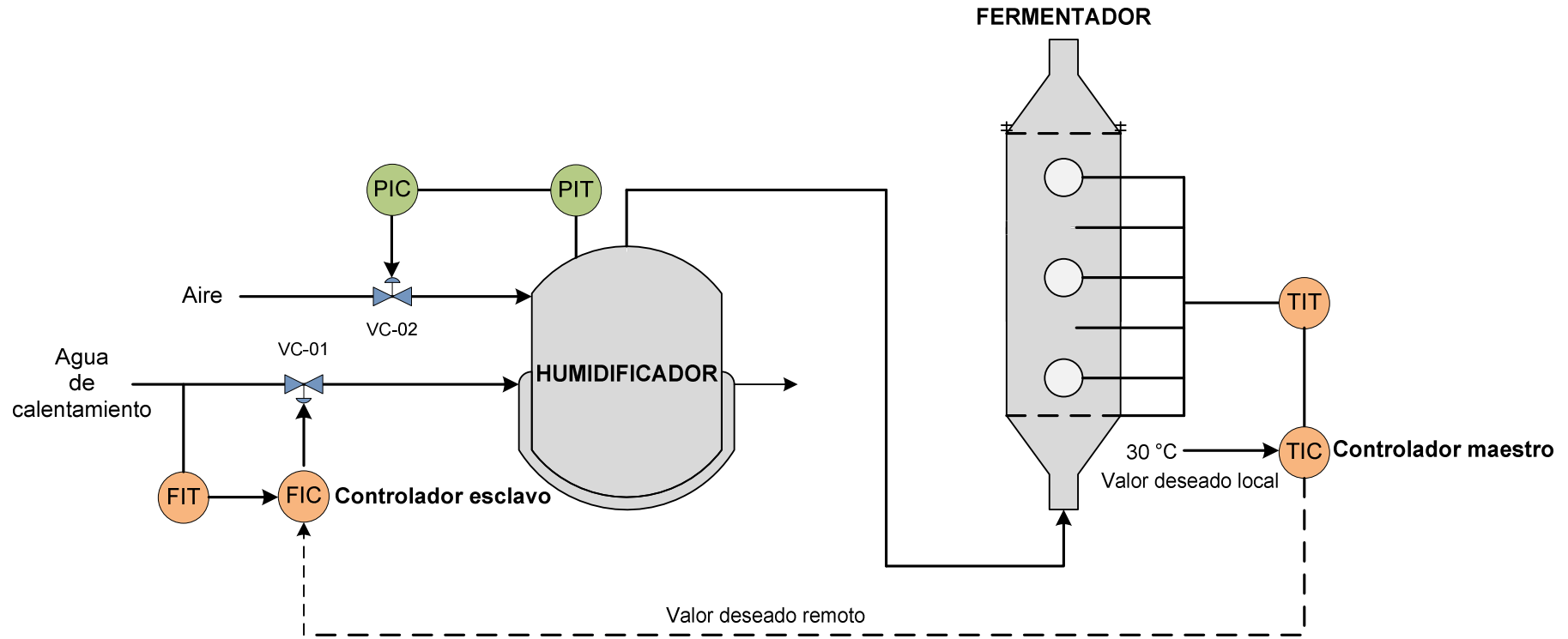


Figura 3.20. Esquema del control automático de la planta de producción de amilasa a escala piloto

Su funcionamiento se basa en el siguiente ciclo: el controlador maestro recibe la medida de la temperatura de cada uno de los puntos del lecho y obtiene un promedio, este valor se compara con el valor deseado local que en este caso es 30 °C y se genera un valor deseado remoto. El controlador esclavo modula la válvula de admisión del agua de calentamiento con base en la medida local del flujo y en el valor deseado remoto del controlador maestro. Esta secuencia modifica el valor de la variable controlada, que se vuelve a transmitir al controlador maestro para repetir el ciclo.

Además, dispone de un control proporcional-integral que consta de un transmisor y control de presión, que modula la válvula de admisión del aire para evitar posibles daños del humidificador por sobrepresión. La válvula tiene un fallo en posición cerrada, debido a que si ocurre algún incidente que inhabilite el sistema de control se evita que el aire ingrese al humidificador para impedir una posible explosión del equipo.

3.4 EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD TÉCNICO-ECONÓMICA DE LA PRODUCCIÓN DE ENZIMA AMILASA A PARTIR DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES

El análisis económico de la planta de producción de enzima amilasa a escala piloto se realizó para una capacidad de procesamiento de 75 kg de salvado de trigo por año.

En la Tabla 3.27 se presenta los costos de los equipos principales para el proceso de fermentación.

Tabla 3.27. Costo de los equipos principales para el proceso de fermentación (I_E) a escala piloto

Equipos	Precio (USD)
Compresor	330,00
Medidor de flujo	96,00
Humidificador	710,00
Fermentador	610,00
TOTAL	1 746,00

El costo del humidificador y fermentador corresponde al valor de la plancha de acero inoxidable de espesor 2,38 mm, que se obtuvo en la empresa DIPAC S.A y el valor de la construcción del equipo.

Para el proceso de extracción y purificación se estimó una inversión de \$ 100 000, las etapas que se requieren se presentan en la Tabla 3.28 (Nouadri, Meraihi, Shahrazed y Leila, 2010, p. 156).

Tabla 3.28. Etapas para la extracción y purificación de amilasa

Etapas	Recuperación (%)
Precipitación $(NH_4)_2SO_4$	50,6
Diálisis	49,5
Filtración	34,6
Cromatografía	23,1

(Nouadri et al., 2010, p. 156)

En la Tabla 3.28 se observa que en cada etapa de purificación el rendimiento disminuye, por esta razón elegir los procesos adecuados es fundamental para la economía del proceso.

Los requerimientos de materia prima para el proceso de fermentación se presentan en la Tabla 3.29, el costo de los reactivos de la solución nutritiva se obtuvieron de Sigma Aldrich.

Tabla 3.29. Requerimientos de materia prima para el proceso de fermentación a escala piloto

Materia prima	Consumo por fermentación (g)	Consumo anual (g)	Precio (USD/g)	USD/L de enzima
Salvado de trigo	750	75 000	2,61E-04	0,04
Cloruro de sodio	0,8	80	0,06	0,01
Cloruro de potasio	0,8	80	0,18	0,03
Cloruro de calcio	0,1	10	0,33	0,01
Fosfato disódico	2,0	200	0,08	0,03
Sulfato de magnesio	2,0	200	0,07	0,03
Sulfato ferroso	0,1	10	8,08	0,16
Cloruro de amonio	2,0	200	0,04	0,02
Glucosa	8,0	800	0,94	1,46
			TOTAL	1,77

Los servicios industriales que se necesitan para el proceso de fermentación se presentan en la Tabla 3.30.

Tabla 3.30. Precio de servicios industriales a escala piloto

Servicios industriales	Consumo por fermentación (kWh)	Consumo anual (kWh)	Precio (USD/kWh)	Costo (USD/L enzima)
Energía eléctrica	36	3 600	0,12	0,84

La fuerza de trabajo requerida para el proceso de fermentación, extracción y purificación se muestra en la Tabla 3.31.

Tabla 3.31. Costo anual de la fuerza de trabajo requerida a escala piloto

Fuerza laboral	Número	Sueldo mensual (USD)	Costo (USD/año)
Operarios	1	340	4 958,32
Ingeniero	1	1 000	14 583,30
Secretaria	1	500	7 291,65

En los salarios se consideraron los beneficios de ley, entre los cuales consta el décimo cuarto, décimo tercero, vacaciones y fondos de reserva.

La producción anual de enzima amilasa y el costo de venta se presentan en la Tabla 3.32.

Tabla 3.32. Producción de amilasa y precio de venta a escala piloto

Producción	Cantidad por fermentación (mL)	Cantidad anual (L)	Precio (USD/mL)	Total (USD/año)
Amilasa	5 156,25	515,63	0,89	457 875,00

La cantidad de enzima que se obtiene en cada fermentación se calculó al considerar un rendimiento del proceso de purificación de 0,275 (Nouadri et al., 2010, p. 156). El precio de venta de la enzima amilasa se obtuvo de Sigma Aldrich.

Según García, Quintero y López (2004) el costo de purificación de una enzima equivale al doble del costo del proceso de fermentación (p. 593), este cálculo se realizó para determinar el precio de producción total y realizar el flujo de caja del proyecto.

La inversión fija que consideró los costos directos e indirectos en una planta de procesamiento de un material sólido y el capital de trabajo se presenta en la Tabla 3.33, los cálculos correspondientes se presentan en el Anexo XI.

Tabla 3.33. Inversión fija y capital de trabajo de la producción de amilasa a escala piloto

Parámetro	Valor (USD)
Inversión fija	403 931,62
Inversión fija con equipos auxiliares	504 914,53
Capital de trabajo	71 222,20

El costo total de producción de amilasa por fermentación sólida se presenta en Tabla 3.34.

Tabla 3.34. Costo total de la producción de amilasa a escala piloto

Parámetro	Valor (USD/año)
C_Q	1 344,11
C_{IF}	115 121,51
C_L	107 333,09
COSTO TOTAL DE PRODUCCIÓN	223 797,71

Los datos generales utilizados para el análisis económico de la producción de enzima amilasa a escala piloto se presentan en la Tabla 3.35.

Tabla 3.35. Datos generales empleados para el análisis económico de la planta a escala piloto

Parámetro	Valor	Unidad
Capacidad de la planta	75	kg/año
Tiempo de vida útil del proyecto	10	años
Días de operación al año	300	días/año
Tasa de interés	10 %	
Tasa de impuestos	0,25	

En la Tabla 3.36 se detalla el flujo de caja del proyecto, que cuenta con un año previo de instalación.

Tabla 3.36. Flujo de caja del proyecto a escala piloto

Final del año	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024
Año de operación	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Año de descuento	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Capital fijo	-504914,53											0,00
Terreno	0,00											0,00
Capital de Trabajo	-71222,20											71222,20
Capital total	-576136,73											
Ingresos por ventas			457875,00	457875,00	457875,00	457875,00	457875,00	457875,00	457875,00	457875,00	457875,00	457875,00
Costo por manufactura			671393,12	671393,12	671393,12	671393,12	671393,12	671393,12	671393,12	671393,12	671393,12	671393,12
Capital total capitalizado		-691364,07										
Capital total descontado	-576136,73											
Ingresos operativos			-213518,12	-213518,12	-213518,12	-213518,12	-213518,12	-213518,12	-213518,12	-213518,12	-213518,12	-213518,12
Intereses en débito			7014,52	6561,93	6062,94	5512,80	4906,28	4237,59	3500,35	2687,55	1791,44	803,48
Depreciación			106032,05	106032,05	106032,05	106032,05	106032,05	106032,05	106032,05	106032,05	106032,05	106032,05
Ingresos antes de impuestos			-319550,17	-319550,17	-319550,17	-319550,17	-319550,17	-319550,17	-319550,17	-319550,17	-319550,17	-319550,17
Impuestos a la renta			-79887,54	-79887,54	-79887,54	-79887,54	-79887,54	-79887,54	-79887,54	-79887,54	-79887,54	-79887,54
Impuestos a la inversión			0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ingresos			-239662,63	-239662,63	-239662,63	-239662,63	-239662,63	-239662,63	-239662,63	-239662,63	-239662,63	-239662,63
Flujo de efectivo	-576136,73		-133630,58	-133630,58	-133630,58	-133630,58	-133630,58	-133630,58	-133630,58	-133630,58	-133630,58	-62408,38
Flujo de efectivos + Interés	-576136,73		-140645,10	-140192,51	-139693,52	-139143,38	-138536,86	-137868,17	-137130,93	-136318,13	-135422,02	-63211,86
Flujo descontados			-97670,21	-81129,92	-67367,63	-55918,60	-46395,71	-38476,47	-31892,27	-26419,37	-21871,41	-8507,56

Se puede observar en la Tabla 3.36 que en los 10 años de funcionamiento el flujo de efectivo fue negativo. En la Tabla 3.37 se presentan los parámetros financieros del proyecto a escala piloto.

Tabla 3.37. Parámetros financieros del análisis económico del proyecto a escala piloto

Parámetro	Valor
VAN	-475 649,16
TIR	---

Como se indica en la Tabla 3.37 el valor presente neto fue negativo, lo cual muestra que la inversión en el proyecto produce pérdidas y no se obtiene ninguna rentabilidad. La tasa interna de retorno no presentó un valor debido a que el VAN es negativo durante todo el tiempo de funcionamiento de la planta.

Los parámetros financieros obtenidos eran los esperados, debido a que la planta piloto no tiene como objetivo la generación de ganancia; su diseño permite establecer los parámetros de operación óptimos para su posterior diseño y construcción a escala industrial. Además muestra los efectos del cambio de las condiciones de operación de manera más rápida y económica que si se realizaran en la planta industrial (Anaya y Pedroza, 2008, p. 32).

A continuación, se determinó que se requiere como mínimo 2 230 reactores con capacidad de procesamiento de 75 kg al año cada uno, para obtener ganancia en el proyecto. Es decir, en total se deberían procesar 165 250 kg de salvado de trigo anualmente.

En la Tabla 3.38 se presentan los costos de los equipos para el proceso de fermentación, extracción y purificación a escala industrial.

Tabla 3.38. Costo de los equipos principales para la producción de amilasa a escala industrial

Equipos	Precio (USD)
Compresor	735 900
Medidor de flujo	214 080
Humidificador	1 583 300
Fermentador	1 360 300
Extracción y purificación	223 000 000
TOTAL	226 893 580

La producción anual de amilasa y el costo de venta para una capacidad de procesamiento de 167 250 kg de sustrato se presenta en la Tabla 3.39.

Tabla 3.39. Producción de amilasa y precio de venta a escala industrial

Producción	Cantidad por fermentación (mL)	Cantidad anual (L)	Precio (USD/mL)	Total (USD/año)
Amilasa	11 498 438	1 149 844	0,89	1 021 061 250

La fuerza de trabajo requerida para el proceso de fermentación, extracción y purificación a escala industrial se muestra en la Tabla 3.40.

Tabla 3.40. Costo anual de la fuerza de trabajo requerida a escala industrial

Fuerza laboral	Número	Sueldo mensual (USD)	Costo (USD/año)
Operarios	100	340	408 878
Ingeniero	3	1 000	38 583
Secretaria	1	500	7 292

En la Tabla 3.41 se presenta la inversión fija y el capital de trabajo, al considerar el tamaño de planta a escala industrial.

Tabla 3.41. Inversión fija y capital de trabajo de la producción de amilasa a escala industrial

Parámetro	Valor (USD)
Inversión fija	900 767 513
Inversión fija con equipos auxiliares	1 125 959 391
Capital de trabajo	158 825 506

El costo total de producción de la enzima amilasa se presenta en la Tabla 3.42.

Tabla 3.42. Costo total de la producción de amilasa a escala industrial

Parámetro	Valor (USD/año)
C_Q	2 997 361
C_{IF}	256 718 741
C_L	1 819 013
COSTO TOTAL DE PRODUCCIÓN	261 535 115

Los datos generales utilizados para el análisis económico de la producción de enzima amilasa a escala industrial se presentan en la Tabla 3.43.

Tabla 3.43. Datos generales empleados para el análisis económico de la planta a escala industrial

Parámetro	Valor	Unidad
Capacidad de la planta	165 250	kg/año
Tiempo de vida útil del proyecto	10	años
Días de operación al año	300	días/año
Tasa de interés	10 %	
Tasa de impuestos	0,25	

En la Tabla 3.44 se detalla el flujo de caja del proyecto, que cuenta con un año previo de instalación.

Tabla 3.44. Flujo de caja del proyecto a escala industrial

Final del año	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024
Año de operación	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Año de descuento	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Capital fijo	-1125959390											0
Terreno	0											0
Capital de Trabajo	-158825506											158825506
Capital total	-1284784896											
Ingresos por ventas			1021061250	1021061250	1021061250	1021061250	1021061250	1021061250	1021061250	1021061250	1021061250	1021061250
Costo por manufactura			784605345	784605345	784605345	784605345	784605345	784605345	784605345	784605345	784605345	784605345
Capital total capitalizado		-1541741876										
Capital total descontado	-1284784896											
Ingresos operativos			236455904	236455904	236455904	236455904	236455904	236455904	236455904	236455904	236455904	236455904
Intereses en débito			15642385	14633093	13520349	12293548	10941000	9449815	7805785	5993241	3994911	1791753
Depreciación			236451472	236451472	236451472	236451472	236451472	236451472	236451472	236451472	236451472	236451472
Ingresos antes de impuestos			4432	4432	4432	4432	4432	4432	4432	4432	4432	4432
Impuestos a la renta			1108	1108	1108	1108	1108	1108	1108	1108	1108	1108
Impuestos a la inversión			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ingresos			3324	3324	3324	3324	3324	3324	3324	3324	3324	3324
Flujo de efectivo	-1284784896		236454796	236454796	236454796	236454796	236454796	236454796	236454796	236454796	236454796	395280302
Flujo de efectivos + Interés	-1284784896		220812410	221821702	222934447	224161248	225513796	227004980	228649011	230461555	232459884	393488549
Flujo descontados			153341951	128369041	107510825	90085378	75524114	63352923	53176452	44664993	37543569	52958831

Se puede observar en la Tabla 3.44 que a partir del primer año de funcionamiento de la planta el flujo de efectivo fue positivo, lo que hace atractiva la inversión para el desarrollo del proyecto.

Se evidenció que el proceso de purificación y extracción representa la mayor parte de la inversión fija por requerir de equipos altamente costosos, por esta razón es de vital importancia elegir correctamente las etapas de purificación de tal manera que su costo se reduzca y el producto obtenido cumpla con los requerimientos del mercado para su comercialización.

En la Tabla 3.45 se presentan los parámetros financieros que permitieron establecer la viabilidad económica del proyecto a escala industrial.

Tabla 3.45. Parámetros financieros del análisis económico del proyecto a escala industrial

Parámetro	Valor
VAN	806 528 081
TIR	11 %

Como se indica en la Tabla 3.45 el valor presente neto fue positivo, lo cual muestra que la inversión en el proyecto proporciona beneficio y genera un margen de utilidad. El tiempo de pago de la inversión es menor a un año, por lo que se obtiene utilidades dentro de este intervalo de tiempo, lo cual llamará la atención de los inversionistas para su ejecución. La tasa interna de retorno fue igual a 11 %, la cual ofrece al inversionista una tasa de interés mayor a la que puede acceder en el mercado.

Por lo establecido anteriormente se determina que la ejecución de la planta a escala industrial con una capacidad de procesamiento de 165 250 kg por año, tendría viabilidad técnico-económica, debido a que la adquisición y construcción de equipos es factible y con base en los parámetros financieros genera utilidades desde el primer año de funcionamiento de la planta.

Debido a la rentabilidad, el potencial uso de residuos agroindustriales y la obtención de un producto de gran interés comercial convierten a esta propuesta atractiva para los inversionistas.

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

- El salvado de trigo produjo la mayor actividad enzimática con un valor de 83,498 UI a 30 °C, a las 48 h de fermentación; esto se podría atribuir a su contenido de almidón de 20 %, que favoreció el desarrollo del microorganismo.
- La cáscara de papa alcanzó una actividad amilásica de 52,092 UI a 30 °C; la cual se podría considerar como una buena opción para la producción de enzima, debido a que el cultivo de trigo en el Ecuador es deficiente.
- Los resultados más bajos se obtuvieron con la cáscara de arroz, que fueron 6,902 UI y 12,471 UI a 13 y 30 °C, respectivamente. Este sustrato no presentó condiciones adecuadas para el crecimiento microbiano, por su bajo porcentaje de almidón de 8,7 %.
- La temperatura desempeñó un papel fundamental especialmente en el salvado de trigo, debido a que la actividad se incrementó de 27,059 UI a 83,498 UI, cuando se realizó la fermentación a 30 °C.
- La producción de amilasa podría ser afectada por un alto contenido de celulosa y lignina en los sustratos, en este estudio el porcentaje de celulosa afectó en mayor proporción.
- El salvado de trigo presentó la mayor concentración de proteínas con un valor de 0,146 gp/gss, seguido por la cáscara de papa con 0,085 gp/gss y por último la cáscara de arroz con 0,029 gp/gss a 30 °C al finalizar el proceso de fermentación.

- El diseño de la planta a escala piloto, permitió establecer una configuración que constó principalmente de un humidificador y reactor, donde el aire se calienta previamente y el fermentador dispone de puertos para la toma de muestras y control de temperatura.
- El control automático de la planta constó de un control cascada, donde la temperatura del lecho controla la válvula de admisión del agua que calienta el flujo de aire, antes de ingresar al fermentador. Además el control por retroalimentación de la válvula de ingreso del aire permitiría disminuir el riesgo de daño del humidificador por sobrepresión.
- La planta de producción de amilasa con una capacidad de procesamiento de 165 250 kg de salvado de trigo al año presentó un VAN de 806 528 081, por lo que la inversión en el proyecto generó un margen de utilidad y el tiempo de pago de la inversión fue menor a un año. El TIR fue de 11 %, lo cual ofrece al inversionista una tasa de interés mayor a la que puede acceder en el mercado. Por esta razón el desarrollo de la planta a escala industrial fue técnico y económicamente factible.

4.2 RECOMENDACIONES

- Realizar un pretratamiento a los sustratos como reducción de tamaño y humectación química con ácido o base, para disminuir la cristalinidad de la celulosa, remover la hemicelulosa y reducir la cantidad de lignina, para obtener un producto cuya celulosa sea más accesible al ataque del microorganismo.
- Analizar la influencia del tamaño de partícula y flujo de aire en la producción de enzima amilasa en el sistema de biorreactores.
- Determinar el día de producción que alcanza la mayor actividad enzimática para extender el tiempo de fermentación y obtener mejores resultados.

- Medir la producción de CO_2 que se produce por la respiración del microorganismo y sus reacciones metabólicas, para tener mejor control sobre la temperatura del lecho.
- Establecer los métodos de extracción y purificación más adecuados para los extractos obtenidos con actividad enzimática.
- Construir la planta a escala piloto, medir el coeficiente de transferencia de masa k_{La} a escala laboratorio y piloto para validar su diseño y escalamiento.

BIBLIOGRAFÍA

1. Acero, H. y Rodríguez, J. (2012). Reemplazar el uso de diesel por cascarilla de arroz empleado para la generación de vapor. Aspectos técnicos y económicos. *Revista Tecnológica ESPOL*, 1, 1-6.
2. Aceves, A. y Castañeda, L. (2012). Producción biotecnológica de lipasas microbianas, una alternativa sostenible para la utilización de residuos agroindustriales. *Vitae*, 19(3), 244-247.
3. Aguilar, M. (2010). *Manejo de nutrientes por sitio específico en el cultivo de arroz (Oriza sativa) en tres zonas de la cuenca baja del río Guayas-Ecuador*. En XII Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo, Santo Domingo, Ecuador. Recuperado de <http://www.secsuelo.org/pnutrixii.html> (Septiembre, 2013).
4. Akintomide, M. y Antai, S. (2012). Protein enrichment of irish potato (*Solanium tuberosium*) peels through solid substrate fermentation by *saccharomyces cerevisiae* and *aspergillus niger*. *Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 1(5), 15-19.
5. Al-Weshahy, A. y Rao, V. (2012). Potato peel as a source of important phytochemical antioxidant nutraceuticals and their role in human health - a review. En Venkereshwer Rao (Ed.). *Phytochemicals as nutraceuticals - global approaches to their role in nutrition and health* (pp. 209-224). doi: 10.5772/2375
6. Ali, H. y Zulkali, M. (2011). Design aspects of bioreactors for solid-state fermentation: a review. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 25(2), 255-266.

7. Anaya, A. y Pedroza, H. (2008). Escalamiento, el arte de la ingeniería química: Plantas piloto, el paso entre el huevo y la gallina. *Tecnología, Ciencia, Educación*, 23(1), 31-39.
8. Anto, H., Trivedi, U. y Patel, K. (2006). Glucoamylase production by solid-state fermentation using rice flake manufacturing waste products as substrate. *Bioresource Technology*, 97(10), 1 161-1 166.
9. Ashley, V., Mitchell, D. y Howes, T. (1999). Evaluating strategies for overcoming overheating problems during solid-state fermentation in packed bed bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, 3, 141-150.
10. Assureira, E. (2002). Rice husk-an alternative fuel in Perú. *Boiling Point*, 48, 35-36.
11. Avilés, J. (1991). *Producción de amilasas y enriquecimiento de harina integral de banano con proteína microbiana por fermentación en medio sólido*. (Tesis previa a la obtención del título de Ingeniero en la Especialización de Ingeniería Química). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.
12. Azmi, A., Ngoh, G., Mel, M. y Hasan, M. (2012). Single-step bioconversion of unhydrolyzed cassava starch in the production of bioethanol and its value-added products. En Pinheiro, M. (Ed.). *Bioethanol* (pp. 33-50). Malasia: InTech.
13. Balkan, B. y Ertan, F. (2007). Production of α -amylase from *Penicillium chrysogenum* under solid-state fermentation by using some agricultural by-products. *Food Technology and Biotechnology*, 45(4), 439-442.
14. Barragán, B., Téllez, Y. y Laguna T. (2008). Utilización de residuos agroindustriales. *Revista de Sistemas Ambientales*, 2(1), 44-50.

15. Bedón, M., Nolasco, O., Santa Cruz, C. y Gutiérrez, A. (2013). Purificación parcial y caracterización de alfa amilasa de granos germinados de *Chenopodium quinoa* (Quinoa). *Revista EIC Perú*, 10(1), 51-57.
16. Bello, J. (2000). *Ciencia Bromatológica: Principios generales de los alimentos*. (1a. ed.). Madrid: Díaz de Santos.
17. Bhargav, S., Panda, B., Ali, M. y Javed, S. (2008). Solid-state fermentation: an overview. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 22(1), 49-70.
18. Blas, C., Mateos, G. y Rebollar, P. (2010). Subproductos de molinería del trigo. En Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal (Ed.). *Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de los alimentos para la fabricación de piensos compuestos* (pp. 97-109). Madrid, España. Recuperado de http://fundacionfedna.org/subproductos_de_cereales (Marzo, 2014).
19. Braverman, J. (1990). Enzimas. En Berk, Z. (Ed.). *Bioquímica de los alimentos*, (pp. 30-45). México D.F., México: Editorial el Manual Moderno S.A.
20. Calderón, F. (2002). La cascarilla de arroz "caolinizada"; una alternativa para mejorar la retención de humedad como sustrato para cultivos hidropónicos. Recuperado de http://www.drcalderonlabs.com/Investigaciones/Cascarilla_Caolinizada/La_Cascarilla_Caolinizada.htm (Septiembre, 2013).
21. Carrera, J. (2003). Producción y aplicación de enzimas industriales. *Revista de la Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 1(1), 9-15.
22. Castaño, H. y Mejía, C. (2008). Producción de etanol a partir de almidón de yuca utilizando la estrategia de proceso sacarificación-licuefacción simultáneas (SSF). *Vitae*, 15(2), 251-258.

23. Chávez, M., Rodríguez, L., Rodríguez, R. y Aguilar, C. (2009). Aspectos básicos de la fermentación en medio sólido. *Cienciacierta*, 20. Recuperado de <http://www.postgradoeinvestigacion.uadec.mx/Ciencia-Cierta/CC20/CC20.html> (Octubre, 2013).
24. Chen, H. (2013). *Modern Solid State Fermentation: Theory and Practice*. (1a. ed.). London: Springer.
25. Corrêa, T., Moutinho, S., Martins, Meire y Martins, Marco. (2011). Simultaneous α -amylase and protease production by the soil bacterium *Bacillus* sp. SMIA-2 under submerged culture using whey protein concentrate and corn steep liquor: compatibility of enzymes with commercial detergents. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 31(4), 843-848.
26. Costa, M., Torres, M., Magariños, H. y Reyes, A. (2010). Producción y purificación de enzimas hidrolíticas de *Aspergillus ficuum* en fermentación sólida sobre residuos agroindustriales. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(2), 163-175.
27. Couto, S. y Sanromán, M. (2006). Application of solid-state fermentation to food industry-A review. *Journal of Food Engineering*, 76, 291-302.
28. Cuervo, L., Folch, J. y Quiroz, R. (2009). Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *Biotecnología*, 13(3), 11-25.
29. Devinder, D., Mona, M. y Hradesh, R. (2012). Physico-chemical characteristics of dietary fibre from potato peel and its effect on organoleptic characteristics of biscuits. *Journal of Agricultural Engineering*, 49(4), 25-32.
30. Echeverría, M. y López, O. (2010). *Caracterización energética de la cascarilla de arroz para su aplicación en la generación de energía termoeléctrica*.

(Proyecto previo a la obtención del título de Ingeniero Mecánico).
Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.

31. Espinel, E. y López, E. (2009). Purificación y caracterización de α -amilasa de *Penicillium commune* producida mediante fermentación en fase sólida. *Revista Colombiana de Química*, 38(2), 191-208.
32. Frimpong, J., Obodai, M., Dzomeku, M. y Apertorgbor, M. (2011). Influence of rice husk on biological efficiency and nutrient content of *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Ex. Fr.) Kummer. *International Food Research Journal*, 18, 249-254.
33. García, M., Quintero, R. y López, A. (2004). *Biotecnología alimentaria*. México: Limusa.
34. Garófalo, J., Ponce, L. y Abad, S. (2011). Guía del cultivo del trigo. *Programa de cereales boletín divulgatorio*, 411, 1-20. Recuperado de http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/Gu%C3%ADa_del_Cultivo_de_Trigo..pdf (Septiembre, 2013).
35. Ghildyal, N., Gowthaman, M., Raghava, K. y Karanth, N. (1994). Interaction of transport resistances with biochemical reaction in packed-bed solid-state fermentors: Effect of temperature gradients. *Enzyme and Microbial Technology*, 16, 253-257.
36. González, S., Soto, N., Rutiaga Quiñones O., Medrano, H., Rutiaga Quiñones J. y López, J. (2011). Optimización del proceso de hidrólisis enzimática de una mezcla de pajas de frijol de cuatro variedades (*Pinto villa*, *Pinto saltillo*, *Pinto mestizo* y *Flor de mayo*). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 10(1), 17-28.

37. Gordón, D. y Chao, L. (2013). Relationship of components in wheat bran and spinach to iron bioavailability in the anemic rat. *The Journal of Nutrition*, 114(3), 526-535.
38. Grant, J. (1996). *Manual sobre la Fabricación de pulpa y papel (Laboratorio)*. (Primera edición en español). México, México D.F.: Compañía Editorial Continental.
39. Guadarrama, A., Orozco, J. y Morales, M. (2007). *Obtención de α -amilasa a partir de *Aspergillus oryzae**. En XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Morelia, México. Recuperado de http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/morelia07/TRABAJOS/Area_III/Carteles/CIII-24.pdf (Noviembre, 2013).
40. Gupta, A., Gupta, V., Modi, D. y Yadava, L. (2008). Production and Characterization of α -amylase from *Aspergillus niger*. *Biotechnology*, 7(3), 551-556.
41. Gurung, N., Ray, S., Bose, S. y Rai, V. (2013). A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine and beyond. *BioMed Research International*, 1, 1-18.
42. Hernández, A. (2003). *Microbiología Industrial*. (1a. ed.). Costa Rica: Universidad Estatal a Distancia San José.
43. Hölker, U., Höfer, M. y Lenz, J. (2004). Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(2), 175-186.
44. Irfan, M., Nadeem, M. y Syed Q. (2012). Media optimization for amylase production fermentation of wheat bran by fungal strains. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 10(1), 55-64.

45. Javed, M., Zahoor, S., Shafaat, S., Mehmooda, I., Gul, A., Rasheed, H., Bukhari, S., Aftab, M. y Ikram-ul-Haq. (2012). Wheat bran as a brown gold: nutritious value and its biotechnological applications. *African Journal of Microbiology Research*, 6(4), 724-733.
46. Johnson, R. y Padmaja, G. (2013). Comparative studies on the production of glucose and high fructose syrup from tuber starches. *International Research Journal of Biological Sciences*, 2(10), 68-75.
47. Julián, M. y Ramos, L. (2007). Fermentación en estado sólido (I). Producción de alimento animal. *Tecnología Química*, 27(3), 17-22.
48. Khan, J., y Yadav, S. (2011). Production of alpha amylase by *Aspergillus niger* using substrates employing solid state fermentation. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, 1(3), 100-108.
49. Kumar, A., Mohanta, K., Kumar, D. y Parkash, O. (2012). Properties and Industrial Applications of rice husk: A review. *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering*, 2(10), 86-90.
50. Lagunas, I., García, B., Castaño, E., Regalado, C. y Ávila, E. (2006). Producción de enzimas hemicelulolíticas por fermentación sólida y su aplicación en alimento balanceado para pollo que engorda. *Revista Veterinaria México*, 37(1), 1-13.
51. León, J. (2001). *Diseño y cálculo de recipientes a presión*. (1a. ed.). México: Inglesa.
52. Loaiza, C. (1992). *Obtención de una cepa nativa para enriquecimiento proteico y producción de amilasas en harina integral de banano por fermentación en medio sólido*. (Tesis previa a la obtención del título de Ingeniero en la especialización de Ingeniería Química). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.

53. López, Y., García, A., Karimi, K., Taherzadeh, M. y Martín, C. (2010). Chemical characterization and dilute-acid hydrolysis of rice hulls from an artisan mill. *Bioresources*, 5(4), 2 268- 2 277.
54. Lu, M., Brooks, J. y Maddox, S. (1997). Citric acid production by solid-state fermentation in a packed-bed reactor using *Aspergillus niger*. *Enzyme and Microbial Technology*, 21, 392-397.
55. MAGAP. (2013). Superficie, producción y rendimiento. Recuperado de <http://sinagap.agricultura.gob.ec/index.php/site-map/2-produccion> (Septiembre, 2013).
56. Martínez, R. y Gragera, R. (2008). *Fundamentos teóricos y prácticos de la histoquímica*. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
57. Mera, I. y Cataño, J. (2005). Obtención de glucosa a partir de almidón de yuca *Manihot sculenta*. *Revista de la Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 3(1), 54-63.
58. Milagres, A., Santos, E., Piovan, T. y Roberto, I. (2004). Production of xylanase by *Thermoascus aurantiacus* from sugar cane bagasse in an aerated growth fermentor. *Process Biochemistry*, 39, 1 387-1 391.
59. Mitchell, D. (1989). *Development of a model system and a mathematical model for solid state fermentation*. (Tesis previa a la obtención del título de PhD en Biotecnología). Universidad de Queensland, Queensland, Australia.
60. Monteiro, P., de Oliveira, P. y Magalhães. (2010). Application of microbial α -amylase in industry - a review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 850-861.

61. Morales, M., Regalado, C. y García, B. (2006). *Efecto de la suplementación en la producción de enzimas manasas, endo+exoxilanasas y endoxilanasas por fermentación sólida usando Aspergillus niger*. En Memorias del VIII verano de la ciencia de la región centro y V verano de la ciencia de la UAQ, Querétaro, México. Recuperado de <http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-VIII/> (Septiembre, 2013).
62. Namazi, H., Fathi, F. y Heydari, A. (2012). Nanoparticles based on modified polysaccharides. En Hashim, A. (Ed.). *The delivery of nanoparticles* (pp. 149-184). Irán: InTech.
63. Nouadri, T., Meraihi, Z., Shahrzad, D. y Leila, B. (2010). Purification and characterization of the α -amylase isolated from *Penicillium camemberti* PL21. *African Journal of Biochemistry Research*, 4(6), 155-162.
64. Olmos, A. (1987). Enzimas: Manual de métodos de análisis. *Reportes de Biotecnología*, 5, 36-39.
65. Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C. y Nigam, P. (1999). Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current science*, 77(1), 149-162.
66. Pastrana, L. (1996). Fundamentos de la fermentación en estado sólido y aplicación a la industria alimentaria. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 1(3), 4-12.
67. Peña, A., Molina, D. y Torres, R. (2009). *Hidrólisis de almidón de yuca mediante la utilización de preparaciones solubles e insolubilizadas de alfa-amilasa (Aspergillus niger)*. En Memorias del IV Simposio de Química Aplicada, Armenia, Colombia. Recuperado de <http://www.uniquindio.edu.co/uniquindio/eventos/siquia/siquia2009pos4.pdf> (Septiembre, 2013).

68. Prabhakar, A., Krishnaiah, K., Janaun, J. y Bono, A. (2005). An overview of engineering aspects of solid state fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology*, 1(2), 10-16.
69. Quintero, M., Montoya, O. y Gutiérrez, P. (2010). Purificación y caracterización de una α -amilasa producida por la cepa nativa *Bacillus* sp. BBM1. *Dyna*, 162, 31-38.
70. Rimbault, M. (1998). General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, 1(3), 174-188.
71. Rimbault, M. y Alazard, D. (1980). Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *European Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9, 199-209.
72. Rico, Y. (1990). Producción, purificación y caracterización parcial de una glucoamilasa de *Aspergillus niger*. *Revista Colombiana de Química*, 19(1), 61-71.
73. Rinku, S., Liji, T., Rajila, C. y Suganyadevi, P. (2012). Amylase production by *Aspergillus niger* under submerged fermentation using *Ipomoea batatas*. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 3(2), 175-182.
74. Ruíz, A. (2011). Toxinas vegetales con acción sobre el sistema nervioso. Aminas biogénicas. Toxinas vegetales con acción antinutriente. En Toxicología alimentaria, Madrid, España. Recuperado de http://www.uam.es/departamentos/medicina/farmacologia/especifica/ToxAlim/ToxAlim_L9d.pdf (Enero, 2014).
75. Ruíz, H., Rodríguez Jasso, R., Rodríguez Herrera, R., Contreras, J. y Aguilar, C. (2007). Diseño de biorreactores para fermentación en medio sólido. *Revista mexicana de Ingeniería Química*, 6(1), 33-40.

76. Ruíz, M., Molina, D., Torres, R. y Sánchez, C. (2009). *Determinación de los parámetros hidrolíticos para la producción de jarabes de glucosa a partir de almidón de yuca*. En Memorias del IV Simposio de Química Aplicada, Armenia, Colombia. Recuperado de <http://www.uniquindio.edu.co/uniquindio/eventos/siquia/siquia2009pos2.pdf> (Noviembre, 2013).
77. Sánchez, A., Gutiérrez, A., Muñoz, J. y Rivera, C. (2010). Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. *Revista Tumbaga*, 5, 61-91.
78. Sánchez, C., Mejía, C., Figueroa, M., Esquivia, M., Agudelo, L. y Zapata, N. Bioprospección de microorganismos nativos amilolíticos. *Revista de la Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 2(1), 8-17.
79. Satyanarayana, T., Noorwez, S., Kumar, S., Rao, J., Ezhilvannan, M. y Kaur, P. (2004). Development of an ideal starch saccharification process using amylolytic enzymes from thermophiles. *Biochemical Society Transactions*, 32(2), 276-278.
80. Saucedo, G., Gutiérrez, M., Bacquet, G., Raimbault, M. y Viniegra, G. (1990). Heat transfer simulation in solid substrate fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 35, 802-808.
81. Saval, S. (2012). Aprovechamiento de residuos agroindustriales: Pasado, Presente y Futuro. *Biotecnología*, 16(2), 14-46.
82. Saxena, R. y Singh, R. (2011). Amylase production by solid-state fermentation of agro-industrial wastes using *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, 1 334-1 342.
83. Sharanappa, A., Wani, K. y Patil, P. (2011). Bioprocessing of food industrial waste for α -amylase production by solid state fermentation. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, 2(4), 473-480.

84. Singh, R. y Heldman, D. (2013). *Introduction to Food Engineering*. (5ta. ed.). San Diego: Elsevier.
85. Sinnott, R. (2005). *Chemical Engineering Design*. (4ta. ed.). Chennai, India: Elsevier.
86. Suganthi, R., Benazir, J., Santhi, R., Ramesh, V., Anjana, H., Nitya, M., Nidhiya, K., Kavitha, G. y Lakshmi, R. (2011). Amylase production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation using agroindustrial wastes. *International Journal of Engineering Science and Technology*, 3(2), 1 756-1 763.
87. Suligoy, C. (2012). Proyecto papas. Recuperado de <http://prezi.com/fxax9tq1rdnj/proyecto-papas/> (Junio, 2013).
88. Suquilanda, M. (2011). Producción orgánica de la papa. *Revista Tierra adentro*.1-41. Recuperado de <http://revistatierraadentro.com/index.php/agricultura/148-la-produccion-organica-de-la-papa?format=pdf> (Septiembre, 2013).
89. Taherzadeh, M. y Karimi, K. (2007). Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *BioResources*, 2(3), 472-499.
90. Valverde, A., Sarria, B. y Monteagudo, J. (2007). Análisis comparativo de las características fisicoquímicas de la cascarilla de arroz. *Revista Scientia et Technica*, 37, 255-260.
91. Van der Maarel, M., Van der Veen, B., Uitdehaag, J., Leemhuis, H. y Dijkhuizen, L. (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of Biotechnology*, 94, 137-155.

92. Varalakshmi, K., Kumudini, B., Nandini, B., Solomon, J., Suhas, R., Mahesh, B. y Kavitha A. (2008). Production and Characterization of α -Amylase from *Aspergillus niger* JGI 24 Isolated in Bangalore. *Polish Journal of Microbiology*, 58(1), 29-36.
93. Vargas, E. (2000). Composición de los subproductos de trigo utilizados en la alimentación animal en Costa Rica. *Nutrición Animal Tropical*, 6(1), 23-38.
94. Yubero, F. (2013). Semillas de *Moringa oleífera* cultivadas en el chaco central como fuente de enzimas para alimentación animal. *Compendio de Ciencias Veterinarias*, 3(1), 15-20.
95. Zugarramurdi, A. y Parin, M. (1995). Economic engineering applied to the fishery industry. *FAO Fisheries Technical Paper*, 351. Recuperado de <http://www.fao.org/docrep/003/v8490e/V8490e00.HTM#Contents> (Noviembre, 2013).

ANEXOS

ANEXO I

DETERMINACIÓN DE RESINAS, CERAS Y GRASAS

La determinación de resinas, ceras y grasas se realizó con la norma TAPPI-T-6-os-59, que se fundamenta en la cuantificación de compuestos solubles en una mezcla alcohol-benceno.

Reactivos

- Mezcla 2:1 alcohol-benceno, que se obtuvo al mezclar un volumen de etanol (95 %) con dos volúmenes de benceno.

Equipo

- Balanza analítica
- Desecador
- Estufa
- Extractor soxhlet con un recipiente de sifonamiento de 250 mL
- Rotavapor

Muestra para análisis

Se utilizó una fracción del sustrato que quedó retenida entre la malla N° 40 y 60, es decir que presenta un tamaño de partícula de 0,25 a 0,4 mm de diámetro.

Para determinar la humedad de la muestra, se pesó 2 g del sustrato en un crisol previamente tarado y se colocó en la estufa a 105 °C por 24 horas.

Posteriormente se enfrió la muestra en el desecador y se volvió a pesar. El contenido de humedad se obtuvo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{Masa}_{\text{inicial}} - \text{Masa}_{\text{final}}}{\text{Masa}_{\text{inicial}}} \times 100 \quad [1.1]$$

Método

Para determinar tanto lignina como celulosa fue necesario realizar la extracción de resinas, ceras y grasas, para lo cual se pesó inicialmente el balón del soxhlet, limpio y seco, cuyo valor se registró hasta el cuarto dígito decimal. Se pesó 5 g de la muestra tamizada, la cual se colocó en un thimble o capuchón previamente tarado (secado en la estufa durante 5 horas a 105 °C y pesado). Se colocó 400 mL de la mezcla alcohol-benceno en el balón de extracción previamente tarado. Se armó el aparato y se colocó el equipo armado en un baño de agua caliente que se encontraba aproximadamente a 80 °C. Se dejó la muestra en reflujo durante 15 h, se debe evitar mover el equipo una vez que empezó la ebullición de la mezcla alcohol-benceno. Además el nivel del agua del baño debe mantenerse en las $\frac{3}{4}$ partes y es necesario verificar constantemente la adecuada circulación del agua por los refrigerantes. La temperatura del baño debe permanecer a 80 °C.

Una vez terminado el proceso, se dejó los capuchones secar al ambiente. Se extrajo la mezcla alcohol-benceno del balón de extracción con ayuda de un rotavapor hasta que la grasa quede adherida a las paredes del balón. Se recuperó alrededor de 320 mL de la mezcla alcohol-benceno inicial. Seguidamente se colocó el balón en la estufa a 105 °C por un periodo de 3 horas, para luego dejarlo enfriar en el desecador. Se pesó el balón y se halló el contenido resinas, ceras y grasas con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Grasas} = \frac{\text{Masa balón}_{\text{inicial}} - \text{Masa balón}_{\text{final}}}{\text{Masa balón}_{\text{inicial}} \times (1 - \text{Humedad}_{\text{análisis}})} \times 100 \quad [1.2]$$

ANEXO II

DETERMINACIÓN DE CELULOSA

El método se basó en el aislamiento de la fracción de celulosa contenida en la muestra por clorinación, se realizó con el método descrito por la norma TAPPI-T-17-m-55.

Reactivos

- Solución de hipoclorito de sodio, 10 %
- Solución de bióxido de azufre, 3 %
- Solución de sulfito de sodio, 2 %

Equipo

- Baño termostatzado
- Bomba de vacío
- Crisoles filtrantes
- Embudos
- Lunas de reloj
- Vasos de precipitación

Método

Se pesó 2 g de muestra previamente tratada con alcohol-benceno donde se eliminó las resinas, ceras y grasas, como se explicó en el Anexo I. Se colocó la muestra en un erlenmeyer de 125 mL y se añadió 50 mL de hipoclorito de sodio al 10 %, dejándola reaccionar durante 8 horas. Para eliminar el exceso de lignina se

filtró el material en un crisol poroso previamente tarado y luego se lavó con 50 mL de agua y 50 mL de bióxido de azufre al 3 %, a continuación se lavó nuevamente con 50 mL de agua y 50 mL de sulfito de sodio al 2 %. Se transfirió el material del crisol a un vaso de precipitación y se añadió 115 mL de sulfito de sodio al 2 %. Se lo introdujo en un baño de agua caliente por un periodo de 30 minutos. Se volvió a filtrar la solución en el mismo crisol y se lavó el material filtrado con 250 mL de agua. Se secó la muestra a 105 °C en la estufa por 3 horas. Se colocó el crisol en el desecador hasta que la muestra se enfríe. Se pesó el crisol junto con el material obtenido al final del proceso. El contenido de celulosa se determinó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Celulosa} = \frac{\text{Masa crisol}_{\text{inicial}} - \text{Masa crisol}_{\text{final}}}{\text{Masa muestra}_{\text{inicial}} \times (1 - H^*)} \times 100 \quad [\text{II.1}]$$

H^* puede considerarse igual a cero, ya que al sacar la muestra de la estufa y colocarla de manera inmediata dentro del desecador, la muestra no ganó humedad.

ANEXO III

DETERMINACIÓN DE LIGNINA

La determinación se realizó a través del método establecido por la norma TAPPI-T-13-os-54, que se fundamenta en que los carbohidratos de materiales celulósicos se hidrolizan al ser atacados con ácidos fuertes y dejan la lignina como residuo insoluble.

Reactivos

- Solución de ácido sulfúrico, 72 %

Equipo

- Balones
- Balones de destilación
- Bomba de vacío
- Baño termostatzado
- Crisoles filtrantes
- Lunas de reloj
- Refrigerantes
- Vasos de precipitación

Método

Se pesó 1 g de muestra libre de resinas, ceras y grasas, como se indicó en el Anexo I. Se colocó la muestra en un erlenmeyer de 125 mL y se añadió 15 mL de

una solución de ácido sulfúrico al 72 %. Se agitó continuamente durante 2 horas y se mantuvo la muestra a una temperatura entre 18 - 20 °C.

Se transfirió la muestra a un balón de 1 000 mL y se añadió 560 mL de agua, para que la solución nueva tenga una concentración de ácido sulfúrico del 3 %. Se mantuvo en ebullición la muestra con reflujo por un periodo de 4 horas. Se dejó enfriar y sedimentar la muestra contenida en el balón.

Finalmente se filtró la solución en un crisol poroso previamente tarado y se lavó los carbohidratos que pudieron quedar con 500 mL de agua destilada caliente. Se secó la muestra contenida en el crisol filtrante en la estufa a 105 °C durante 3 horas. Se colocó el crisol en el desecador hasta que se enfríe y se lo pesó. Se determinó la cantidad de lignina de la siguiente manera:

$$\% \text{ Lignina} = \frac{\text{Masa crisol}_{\text{inicial}} - \text{Masa crisol}_{\text{final}}}{\text{Masa muestra}_{\text{inicial}} \times (1 - H^*)} \times 100 \quad [\text{III.1}]$$

H^* puede considerarse igual a cero, ya que al sacar la muestra de la estufa y colocarla de manera inmediata dentro del desecador, la muestra no ganó humedad.

ANEXO IV

INFORME DE RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LAS MATERIAS PRIMAS



ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIA DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA (DECAB)
 Campus Politécnico José Rubén Orellana Ricaurte
 Direc.: Pasaje Andalucía E12-A y Alfredo Mena Caamaño Telf.: 2507 138
 Personas de Contacto: Dra. Irma Paredes Telf.: 2507 144 ext. 2490 e-mail: irma.paredes@epn.edu.ec
 Tga. Elisabeth Venegas Telf.: 2507 144 ext. 2272 e-mail: elisabeth.venegas@epn.edu.ec
 Quito- Ecuador



INFORME DE RESULTADOS DE ANÁLISIS O TRABAJO

ORDEN: DC-OTI0169-2013

Cliente: PROYECTO DE TITULACIÓN

IDENTIFICACIÓN DE LA(S) MUESTRA(S) Y SERVICIO (S)

No. muestra	Muestra	Servicio/Analito	Laboratorio
1	Cáscara de papa	Contenido de Celulosa	Pulpa y papel
2	Cáscara de arroz	Contenido de Lignina	
3	Cáscara de trigo	Solubilidad en alcohol benceno Humedad para análisis	

RESULTADOS

Muestra	Servicio/Analito	Resultado	Unidades	Método
Cáscara de papa	Contenido de celulosa	15.52	%	Tappi T-17-m-55
Cáscara de arroz		35.80	%	
Cáscara de trigo		13.14	%	
Cáscara de papa	Contenido de lignina	4.77	%	Tappi T-13-os-54
Cáscara de arroz		24.05	%	
Cáscara de trigo		10.05	%	
Cáscara de papa	Solubilidad en alcohol benceno	3.21	%	Tappi T-6-os-59
Cáscara de arroz		1.28	%	
Cáscara de trigo		3.52	%	
Cáscara de papa	Humedad para análisis	6.49	%	Tappi T-412-m(6)
Cáscara de arroz		7.84	%	
Cáscara de trigo		5.28	%	

COMENTARIOS:

El trabajo fue desarrollado en su totalidad por el Sr. Germán Romo.

PROFESIONAL RESPONSABLE
DEL ANÁLISIS O TRABAJO

Ing. Elena Coyago

QUEJAS Y SUGERENCIAS

El cliente puede canalizar las quejas sobre los resultados de los análisis, sobre el tiempo de entrega del informe, u otro aspecto, a través del Jefe del DECAB, o de la persona Encargada de Recepción de Muestra y Atención al Cliente, ya sea en forma verbal o en forma escrita hasta 8 días después de la entrega del informe. En el DECAB se mantiene un registro de quejas y sugerencias con el fin de mejorar el Servicio al Cliente.

El laboratorio no se responsabiliza por el muestreo realizado antes de la entrega de las muestras al DECAB, pero si se responsabiliza de las muestras recibidas, tal como se las entrega.

ANEXO V

DESARROLLO DEL MICROORGANISMO ASPERGILLUS NIGER EN LOS REACTORES DE LECHO EMPACADO

En las Figuras AV.1 y AV.2 se observa el desarrollo del microorganismo en el salvado de trigo y cáscara de papa:



Figura AV.1. Desarrollo del hongo en la cáscara de papa a 30 °C a las 48 h de fermentación



Figura AV.2. Desarrollo del hongo en el salvado de trigo a 30 °C a las 48 h de fermentación

ANEXO VI

DATOS DE LA VARIACIÓN DE LA ABSORBANCIA Y HUMEDAD EN LA PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA

Los datos de la variación de la absorbancia con el tiempo de fermentación en la cáscara de arroz, trigo y papa por el desarrollo del microorganismo *Aspergillus niger* en un sistema de biorreactores de lecho empacado a temperatura ambiente y 30 °C se presentan en las Tablas AVI.1, AVI.2, AVI.3, AVI.4, AVI.5, y AVI.6:

- **Cáscara de arroz**

Tabla AVI.1. Datos de la variación de absorbancia con el tiempo para la determinación de la actividad amilásica en cáscara de arroz a 13 °C

Tiempo (h)	Absorbancia		Humedad	
	T1	T1'	T1	T1'
0	0	0	58,42	60,89
3	0,018	0,012	51,98	52,76
6	0,020	0,016	53,50	53,23
21	0,028	0,029	49,50	56,93
24	0,030	0,038	50,97	48,50
27	0,046	0,056	49,25	48,54
30	0,060	0,063	49,01	50,50
45	0,078	0,073	49,25	50,74
48	0,083	0,082	50,99	48,55

Tabla AVI.2. Datos de la variación de absorbancia con el tiempo para la determinación de la actividad amilásica en cáscara de arroz a 30 °C

Tiempo (h)	Absorbancia		Humedad	
	T2	T2'	T2	T2'
0	0	0	58,42	56,50
3	0,020	0,017	55,28	54,50
6	0,016	0,031	52,17	50,25
21	0,066	0,066	51,24	52,97
24	0,074	0,081	52,15	54,73
27	0,083	0,096	50,50	50,00
30	0,097	0,102	51,71	55,61
45	0,116	0,125	49,02	54,46
48	0,129	0,137	51,24	55,02

- **Cáscara de papa**

Tabla AVI.3. Datos de la variación de absorbancia con el tiempo para la determinación de la actividad amilásica en cáscara de papa a 13 °C

Tiempo (h)	Absorbancia		Humedad	
	T3	T3'	T3	T3'
0	0	0	49,67	49,51
3	0,021	0,011	53,23	50,25
6	0,018	0,013	48,77	51,20
21	0,038	0,031	51,24	50,25
24	0,081	0,071	50,99	48,94
27	0,107	0,094	48,50	50,96
30	0,091	0,102	51,96	49,86
45	0,100	0,112	48,80	50,94
48	0,125	0,159	51,89	51,24

Tabla AVI.4. Datos de la variación de absorbancia con el tiempo para la determinación de la actividad amilásica en cáscara de papa a 30 °C

Tiempo (h)	Absorbancia		Humedad	
	T4	T4'	T4	T4'
0	0	0	48,35	44,25
3	0,021	0,046	47,81	45,89
6	0,053	0,081	49,90	48,35
21	0,129	0,121	47,67	49,22
24	0,161	0,134	48,89	49,05
27	0,201	0,209	52,11	50,00
30	0,186	0,219	52,57	51,26
45	0,279	0,310	55,10	54,00
48	0,297	0,360	56,34	54,12

- **Salvado de trigo**

Tabla AVI.5. Datos de la variación de absorbancia con el tiempo para la determinación de la actividad amilásica en cáscara de trigo a 13 °C

Tiempo (h)	Absorbancia		Humedad	
	T5	T5'	T5	T5'
0	0	0	55,72	52,24
3	0,038	0,047	55,00	56,72
6	0,041	0,042	56,22	58,71
21	0,081	0,088	56,22	56,22
24	0,090	0,106	55,94	57,21
27	0,094	0,120	56,89	54,50
30	0,109	0,138	56,93	56,80
45	0,143	0,156	57,07	58,71
48	0,177	0,223	57,07	56,19

Tabla AVI.6. Datos de la variación de absorbancia con el tiempo para la determinación de la actividad amilásica en cáscara de trigo a 30 °C

Tiempo (h)	Absorbancia		Humedad	
	T6	T6'	T6	T6'
0	0	0	53,00	53,96
3	0,039	0,051	55,94	55,22
6	0,064	0,052	55,00	54,23
21	0,223	0,192	60,50	59,00
24	0,243	0,188	60,00	61,08
27	0,260	0,209	61,69	61,00
30	0,255	0,300	62,50	62,00
45	0,357	0,408	67,00	64,68
48	0,444	0,477	66,17	61,50

ANEXO VII

DATOS DE LA VARIACIÓN DE LA ABSORBANCIA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

Los datos de la variación de la absorbancia con el tiempo de fermentación en la cáscara de arroz, trigo y papa por el desarrollo del microorganismo *Aspergillus niger* en un sistema de biorreactores de lecho empacado a temperatura ambiente y 30 °C se presentan en las Tablas AVII.1, AVII.2, AVII.3, AVII.4, AVII.5, y AVII.6:

- **Cáscara de arroz**

Tabla AVII.1. Datos de la variación de absorbancia con el tiempo para la determinación de la concentración de proteínas en cáscara de arroz a 13 °C

Tiempo (h)	Absorbancia	
	T1	T1'
0	0,007	0,005
3	0,010	0,009
6	0,011	0,010
21	0,018	0,015
24	0,018	0,019
27	0,020	0,021
30	0,020	0,020
45	0,023	0,021
48	0,023	0,023

Tabla AVII.2. Datos de la variación de absorbancia con el tiempo para la determinación de la concentración de proteínas en cáscara de arroz a 30 °C

Tiempo (h)	Absorbancia	
	T2	T2'
0	0,002	0,003
3	0,006	0,004
6	0,006	0,008
21	0,017	0,018
24	0,017	0,019
27	0,018	0,023
30	0,020	0,021
45	0,027	0,028
48	0,031	0,030

- **Cáscara de papa**

Tabla AVII.3. Datos de la variación de absorbancia con el tiempo para la determinación de la concentración de proteínas en cáscara de papa a 13 °C

Tiempo (h)	Absorbancia	
	T3	T3'
0	0,030	0,030
3	0,024	0,030
6	0,037	0,031
21	0,045	0,046
24	0,047	0,051
27	0,058	0,049
30	0,048	0,055
45	0,061	0,058
48	0,054	0,060

Tabla AVII.4. Datos de la variación de absorbancia con el tiempo para la determinación de la concentración de proteínas en cáscara de papa a 30 °C

Tiempo (h)	Absorbancia	
	T4	T4'
0	0,033	0,037
3	0,038	0,044
6	0,039	0,048
21	0,058	0,056
24	0,062	0,054
27	0,064	0,065
30	0,064	0,066
45	0,064	0,087
48	0,072	0,095

- **Salvado de trigo**

Tabla AVII.5. Datos de la variación de absorbancia con el tiempo para la determinación de la concentración de proteínas en cáscara de trigo a 13 °C

Tiempo (h)	Absorbancia	
	T5	T5'
0	0,035	0,038
3	0,038	0,033
6	0,038	0,031
21	0,046	0,054
24	0,048	0,052
27	0,048	0,067
30	0,052	0,067
45	0,060	0,063
48	0,072	0,080

Tabla AVII.6. Datos de la variación de absorbancia con el tiempo para la determinación de la concentración de proteínas en cáscara de trigo a 30 °C

Tiempo (h)	Absorbancia	
	T6	T6'
0	0,047	0,052
3	0,048	0,055
6	0,055	0,061
21	0,057	0,055
24	0,065	0,053
27	0,079	0,075
30	0,075	0,094
45	0,083	0,106
48	0,100	0,129

ANEXO VIII

CÁLCULO DE LA ACTIVIDAD AMILÁSICA

Para calcular la actividad se realizó la curva de calibración con una solución de glucosa 0,1 % como se muestra en la Tabla AVIII.1:

Tabla AVIII.1. Curva de calibración de la glucosa para calcular la actividad enzimática a $\lambda = 490 \text{ nm}$

Tubo (#)	Solución estándar (mL)	Agua destilada (mL)	Concentración (mg azúcar/L)
0	0,00	1,00	0
1	0,20	0,80	200
2	0,40	0,60	400
3	0,60	0,40	600
4	0,80	0,20	800
5	1,00	0,00	1000

Posteriormente se obtuvo la ecuación de la curva de calibración:

$$A = 1,292 C + 0,0025 \quad \text{[VIII.1]}$$

Donde:

A: Absorbancia medida a 490 nm

C: Concentración (g glucosa/L extracto)

Con la ecuación anterior se determinó la concentración de las muestras de fermentación y posteriormente se realizó la transformación de unidades, de tal manera que sean las correspondientes a la actividad enzimática ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g}$ sustrato seco). A continuación se presenta el ejemplo de cálculo, se elige la absorbancia de la cáscara de papa a 30 °C a las 30 horas de fermentación:

$$C = \frac{A - 0,0025}{1,292} = \frac{0,186 - 0,0025}{1,292} \times \frac{20}{2} = 1,420 \frac{\text{mg glucosa}}{\text{mL extracto}}$$

$$UI = \frac{1,420 \text{ mg glucosa}}{\text{mL extracto}} \times \frac{50 \text{ mL extracto}}{2 \text{ g sustrato húmedo}} \times \frac{100 \text{ g sustrato húmedo}}{47,43 \text{ g sustrato seco}} \\ \times \frac{1 \text{ mmol glucosa}}{180 \text{ mg glucosa}} \times \frac{1000 \text{ } \mu\text{mol glucosa}}{1 \text{ mmol glucosa}} \times \frac{1}{15 \text{ min de reacción}} = \frac{27,727 \text{ } \mu\text{mol}}{\text{g sustrato seco} \cdot \text{min}}$$

Se debe considerar que cada muestra tiene su propio contenido de humedad como se indicó en la Tabla AVI.4.

ANEXO IX

CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

Para calcular la concentración de proteínas se realizó la curva de calibración con una solución de albúmina de huevo de 0,01 % como se muestra en la Tabla 2.7:

Tabla AIX.1. Curva de calibración para calcular la concentración de proteínas a $\lambda=555$ nm

Tubo (#)	Solución estándar (mL)	Agua destilada (mL)	Concentración (g proteína/mL)
0	0,00	1,00	0
1	0,20	0,80	0,002
2	0,40	0,60	0,004
3	0,60	0,40	0,006
4	0,80	0,20	0,008
5	0,90	0,10	0,009
6	1,00	0,00	0,010

Posteriormente se estableció la ecuación de la curva de calibración:

$$A = 101,39 x - 0,0037 \quad \text{[IX.1]}$$

Donde:

A: Absorbancia medida a 550 nm

C: Concentración (g proteína/mL extracto)

Con la ecuación anterior se determinó la concentración de las muestras de fermentación y posteriormente se realizó la transformación de unidades. A continuación se presenta el ejemplo de cálculo, se elige la absorbancia de la cáscara de arroz a 13 °C a las 6 horas de fermentación:

$$C = \frac{A + 0,0037}{101,39} = \frac{0,011 + 0,0037}{101,39} = 1,449 \times 10^{-4} \frac{\text{g proteína}}{\text{mL extracto}}$$

$$C = \frac{1,449 \times 10^{-4} \text{ g proteína}}{\text{mL extracto}} \times \frac{50 \text{ mL extracto}}{1 \text{ g sustrato húmedo}} \times \frac{100 \text{ g sustrato húmedo}}{46,50 \text{ g sustrato seco}}$$

$$= \frac{0,016 \text{ g proteína}}{\text{g sustrato seco}}$$

Se debe considerar que cada muestra tiene su propio contenido de humedad como se indicó en la Tabla AVI.1. Debido a que cada sustrato tuvo una concentración inicial diferente, los datos de concentración de proteínas reportados en el presente estudio son intervalos, es decir a todos los valores se les restó la concentración inicial de su respectivo sustrato.

ANEXO X

DISEÑO DE LA PLANTA DE PRODUCCIÓN DE AMILASA A ESCALA PILOTO

Humidificador

Se presentan los cálculos realizados para la determinación de las dimensiones del humidificador:

$$L_c = L_{Lc} + L_v = 0,41 + 0,75 = 1,16 \text{ m}$$

El volumen del humidificador es igual a:

$$V_{\text{cilindro}} = \frac{\pi}{4} D^2 h \quad [\text{X.1}]$$

Al reemplazar los datos en la ecuación anterior se obtiene:

$$0,03 = \frac{\pi}{4} D^2 (1,16)$$

$$D = 0,18 \text{ m}$$

Por lo tanto las dimensiones del humidificador son:

$$L = 116 \text{ cm} \approx 120 \text{ cm}$$

$$D = 18 \text{ cm} \approx 20 \text{ cm}$$

Se escogió la tapa bridada y cóncava estándar por ser la más utilizada en este tipo de recipientes.

$$L_f = 0,139 D = 0,139 (20) = 2,78 \text{ cm} \approx 3 \text{ cm}$$

Para calcular el espesor tenemos:

$$P = P_h = \left(1000 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3} \times 9,8 \frac{\text{m}}{\text{s}^2} \right) \times (0,75 + 0,03)\text{m}$$

$$P = 7\,644 \text{ Pa}$$

La presión de diseño es:

$$P_d = 1,2 (7\,644) = 9\,172,8 \text{ Pa}$$

$$P_d = 1,33 \text{ psi}$$

El espesor del humidificador es igual a:

$$e = \frac{1,33 (7,874)}{2 (78\,879,94)(0,725) - 1,33} + \frac{3}{32}$$

$$e = 0,094 \text{ in}$$

Reactor

Se muestran los cálculos realizados para la determinación del espesor del reactor:

$$P = P_h = \left(320 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3} \times 9,8 \frac{\text{m}}{\text{s}^2} \right) \times (0,345)\text{m}$$

$$P = 1\,081,92 \text{ Pa}$$

La presión de diseño es:

$$P_d = 1,2 (1\,081,92) = 1\,298,30 \text{ Pa}$$

$$P_d = 0,188 \text{ psi}$$

El espesor del fermentador es igual a:

$$e = \frac{0,188(5,91)}{2(78\,879,94)(0,725) - 0,188} + \frac{3}{32}$$

$$e = 0,094 \text{ in}$$

ANEXO XI

ANÁLISIS ECONÓMICO DE LA PLANTA DE PRODUCCIÓN DE AMILASA A ESCALA PILOTO

Se presentan los cálculos realizados para el análisis económico del proyecto:

Para calcular la inversión fija al considerar los costos directos e indirectos tenemos:

$$I_F = 101\,746 + 1,69(101\,746) + 1,28(101\,746) = 403\,931,62$$

Para considerar los equipos auxiliares se calcula:

$$I_{F'} = 0,25I_F = 0,25 \times 403\,931,62 + 403\,931,62 = 504\,914,53$$

Se establece el capital del trabajo:

$$I_W = 0,7I_E = 0,7 \times 101\,132 = 71\,222,2$$

Los costos anuales proporcionales a la inversión fija (C_{IF}) es igual a:

$$C_{IF} = 403\,931,62 \times 0,285 = 115\,120,51$$

Los costos anuales proporcionales a la cantidad anual de producción (C_Q):

$$C_Q = 515,63 \times 2,61 = 1\,344,11$$

Los costos anuales proporcionales a la mano de obra directa (C_L):

$$L = 4\,958,32 + 14\,583,3 + 7\,291,65 = 26\,833,27$$

$$C_L = 26\,833,27 \times 4 = 107\,333,09$$

Por lo tanto:

$$C_{\text{Total}} = 115\,120,51 + 1\,344,11 + 128\,640,00 = 223\,797,71$$

Se indica en la Tabla AXI.1 la amortización de crédito:

Tabla AXI.1. Tabla de amortización de crédito para la planta de producción de amilasa a escala piloto

Semestre	Interés	Amortización	Capital Reducido	Pago
0			71 222,20	
1	3 561,11	2 153,94	69 068,26	5 715,05
2	3 453,41	2 261,64	66 806,62	5 715,05
3	3 340,33	2 374,72	64 431,89	5 715,05
4	3 221,59	2 493,46	61 938,43	5 715,05
5	3 096,92	2 618,13	59 320,30	5 715,05
6	2 966,02	2 749,04	56 571,26	5 715,05
7	2 828,56	2 886,49	53 684,77	5 715,05
8	2 684,24	3 030,81	50 653,96	5 715,05
9	2 532,70	3 182,36	47 471,60	5 715,05
10	2 373,58	3 341,47	44 130,13	5 715,05
11	2 206,51	3 508,55	40 621,58	5 715,05
12	2 031,08	3 683,97	36 937,61	5 715,05
13	1 846,88	3 868,17	33 069,43	5 715,05
14	1 653,47	4 061,58	29 007,85	5 715,05
15	1 450,39	4 264,66	24 743,19	5 715,05
16	1 237,16	4 477,89	20 265,30	5 715,05
17	1 013,26	4 701,79	15 563,51	5 715,05
18	778,18	4 936,88	10 626,63	5 715,05
19	531,33	5 183,72	5 442,91	5 715,05
20	272,15	5 442,91	0,00	5 715,05