



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

TESIS DOCTORAL EN INGENIERÍA QUÍMICA

PRODUCCIÓN DE POLI(HIDROXIALCANOATO)S (PHA)S:  
ESTUDIOS EXPERIMENTALES Y DISEÑO ÓPTIMO DE  
BIORREFINERÍAS

*Fernando Daniel Ramos*

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2019



## PREFACIO

Esta tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de *Doctor en Ingeniería Química*, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en la *Planta Piloto de Ingeniería Química*, dependiente del *Departamento de Ingeniería Química* durante el período comprendido entre *abril de 2012 y marzo de 2019*, bajo la dirección de la *Dra. María Soledad Díaz, Investigadora Principal de CONICET y Profesora Titular del Departamento de Ingeniería Química* y el *Dr. Marcelo Armando Villar, Investigador Principal de CONICET y Profesor Titular del Departamento de Ingeniería Química*.

Departamento de Ingeniería Química

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR  
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el ....../....../..... ,  
mereciendo la calificación de .....(.....)



## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores, Soledad y Marcelo, quienes me acompañaron de manera incondicional durante estos años, brindándome infinidad de oportunidades para crecer como profesional y también como persona. Gracias por su confianza.

A la Planta Piloto de Ingeniería Química por ser como una segunda casa, la cual me albergó y ofreció el soporte institucional para realizar todas las actividades de mi tesis. Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, a la Universidad Nacional del Sur y al Departamento de Ingeniería Química por proveer todos los medios necesarios para realizar este trabajo.

Al Profesor Tito Alves, y a su grupo de trabajo de la Universidad Federal de Río de Janeiro, Mônica y Guilherme, quienes me recibieron tan cálidamente durante mi estadía allí, confiaron en mí y me ofrecieron su valiosa ayuda en todo el trabajo experimental llevado a cabo en esta tesis.

A Any, Nora, Elsa, Aldi, Silvia R., Vivi, Adri, Yesi y Selva por ayudarme en todas las tareas diarias a lo largo de estos años.

A todos y cada uno de los integrantes del grupo de Procesos, por recorrer junto a mí este camino durante todo este tiempo.

A Claudio, Chipi, Ami, Carla y Andrés, por su gran compañerismo, los ricos mates y las enriquecedoras charlas compartidas.

A Carlita, por convertirte en la persona que posibilitó esta relación laboral, la cual fue tan amena y valiosa. Gracias por tus palabras, valores, motivaciones, consejos y enseñanzas impartidas a lo largo de nuestro doctorado. Gracias por tu amistad.

A Clau, por su alegría y toda la ayuda computacional que me brindó de manera totalmente desinteresada en todo este tiempo. Te admiro y valoro mucho.

A Vani, por su gran calidez humana y guía durante estos años. Sos como la hermana mayor científica que todos quisiéramos tener siempre a nuestro lado.

A mis amigos de toda la vida. Especialmente a Ger, y a su hermosa familia, Dani, Jose y mi maravillosa ahijadita, Emma. Gracias por estar y confiar siempre en mí.

A mi familia por ser exactamente como son. Gracias papi por todo lo que me brindaste en la vida, sos un ejemplo de perseverancia, honestidad y compromiso. Mami, gracias por tu enorme esfuerzo diario. No creo que pueda encontrar palabras para describir todo lo que genera en mí tu valiosísima compañía en cada uno de los momentos de mi vida, gracias por el enorme regalo de la vida. Gonza, gracias por los momentos vividos, especialmente los deportivos que me permitieron disfrutar y despejarme en numerosas ocasiones. Mati, gracias por ser el motor para seguir aprendiendo cada vez más profundamente de esta carrera tan linda que compartimos.

Al amor de mi vida, Yane. Gracias por recorrer juntos este camino de la vida. Todo cobra un sentido totalmente diferente a tu lado. Junto a Rafa y Preta supieron hacer de esta etapa, una que tendrá un lugar especial en mi corazón. Te amo.

## RESUMEN

La gran versatilidad y amplia variedad de características que poseen los plásticos los hace materiales claves para el ser humano, ya que permiten mejorar la calidad de vida, al ser empleados en sectores como la construcción, el transporte, el envasado, la medicina y el deporte, entre otros. No obstante, los plásticos producidos a partir de petróleo tienen la gran desventaja de no ser biodegradables, por lo que esta preocupación ha creado un especial interés en el desarrollo de procesos alternativos para generar polímeros de origen biológico, amigables con el medio ambiente. A pesar de los esfuerzos destinados a la investigación de biopolímeros, éstos aún no resultan competitivos en términos económicos frente a los plásticos petroquímicos. El costo de los polímeros convencionales oscila entre 1 y 1,5 dólares por kilogramo y el de los biopolímeros puede variar entre 2,5 y 15 dólares por kilogramo. Por lo tanto, el objetivo que se propone en este trabajo de tesis es profundizar, tanto a nivel teórico como experimental, en el estudio de la producción de plásticos biodegradables (poli(hidroxialcanoato)s, PHAs) empleando fuentes de carbono alternativas para su biosíntesis.

En la presente tesis se llevan a cabo experiencias *in vivo* con un microorganismo aislado del estuario de Bahía Blanca, *Bacillus megaterium* BBST4, en cultivos batch. A partir del biomaterial obtenido, se realizan ensayos que permiten caracterizar el polímero acumulado intracelularmente. Asimismo, se obtienen datos experimentales a nivel Erlenmeyer y biorreactor, que se emplean para ajustar un modelo cinético de crecimiento y biosíntesis de PHA. La estimación de parámetros se realiza mediante la formulación de un problema de optimización dinámico cuya función objetivo es de cuadrados mínimos, sujeto a un sistema de ecuaciones diferenciales y algebraicas. Por otro lado, con el objetivo de realizar aportes en el diseño de biorrefinerías, se propone la implementación de modelos detallados de los equipos de una planta de producción de PHA y también de una biorrefinería integrada, donde la síntesis de biopolímero brinda un valor agregado al objetivo económico de la misma. Para ello, las distintas configuraciones de operación de las plantas se incluyen en una superestructura y se formulan problemas de programación no lineal mixto entero (MINLP) en un entorno orientado a ecuaciones, con un

criterio de optimización económico (maximización del valor presente neto del proceso productivo) sujeto a restricciones de balances de masa y energía, ecuaciones de diseño, condiciones operativas y correlaciones de costos.

La metodología presentada en esta tesis junto con los resultados numéricos obtenidos, representan una progresión en el estudio biotecnológico de la síntesis de PHAs mediante la utilización de herramientas provistas por el modelado matemático.



## ABSTRACT

Due to their great versatility and comprehensive features, plastics have become key materials to human beings. They allow improving the quality of human life in areas such as construction, transportation, packaging, medicine and sports, among others. Nevertheless, petroleum-based plastics are non-biodegradable. This issue has led to the development of alternative processes to produce bio-based polymers environmentally friendly. Despite efforts devoted to biopolymers research, they are still non-economically competitive with the petrochemical plastics. While synthetic polymers cost is between 1 to 1.5 dollars per kilogram, biopolymers prices vary between 2.5 to 15 dollars per kilogram. Therefore, the main objective of the work is to carry out theoretical and experimental studies of biodegradable biopolymer production (poly(hydroxyalkanoate)s, PHAs) using alternative carbon sources for their biosynthesis.

In this thesis work, *in vivo* experiences in batch cultivations are performed by means of *Bacillus megaterium* BBST4, a microorganism isolated from Bahía Blanca estuary. With the obtained biomaterial, several tests were carried out in order to achieve a characterization of the intracellular accumulated polymer. Also, experimental data is obtained in Erlenmeyer and bioreactor cultures. This data is used to adjust a growth and PHA bio-synthesis kinetics model. Parameter estimation is performed within a dynamic optimization framework with a least squares objective function, subject to a differential algebraic equations system. Furthermore, in order to make a contribution to biorefineries design, we implemented two detailed equipment models: a PHA production plant and an integrated biorefinery, where biopolymer synthesis is a value-added co-product. Different plant configurations are embedded within a superstructure. Mixed integer nonlinear programming (MINLP) problems are formulated in an equation oriented approach. The economic objective function (net present value maximization of the productive process) is subjected to mass and energy balances, equipment design cost, operation conditions and cost correlations.

The methodology presented in this thesis together with the obtained numerical results, provides useful insights on the biotechnological study of PHAs synthesis by means of mathematical modeling tools.

## **ÍNDICE**

**Índice de Figuras** .....x

**Índice de Tablas** .....xiv

**Nomenclatura** .....xvii

### **Índice de Contenidos**

## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUCCIÓN GENERAL**

1.1. Panorama mundial de la producción de plásticos ..... 1

1.2. Poli(hidroxialcanoato)s ..... 4

1.3. Aplicaciones de los PHAs..... 7

    1.3.1. Aplicaciones médicas..... 8

    1.3.2. Aplicaciones industriales..... 9

1.4. Producción industrial y comercialización de PHAs..... 10

1.5. Producción de PHAs a partir del concepto de biorrefinerías integradas ... 14

1.6. Objetivos de la tesis ..... 16

    1.6.1. Objetivo general ..... 16

    1.6.2. Objetivos específicos ..... 16

1.7. Estructura de la tesis ..... 16

## **CAPÍTULO 2**

### **PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA Y EXTRACCIÓN DE PHA**

2.1. Introducción ..... 19

2.2. Materiales y métodos ..... 22

    2.2.1. Microorganismo..... 22

    2.2.2. Reactivación del microorganismo ..... 22

    2.2.3. Determinación del microorganismo por tinción de Gram ..... 23

    2.2.4. Medio de cultivo ..... 23

    2.2.5. Cultivo en Erlenmeyer..... 24

    2.2.6. Cultivo en biorreactor ..... 25

2.2.7. Preparación de las muestras .....	27
2.2.8. Métodos analíticos .....	27
2.2.8.1. Determinación de la biomasa .....	27
2.2.8.2. Determinación del biopolímero .....	28
2.2.8.3. Determinación de glicerol .....	29
2.2.8.4. Determinación de urea .....	30
2.2.8.5. Determinación de fósforo.....	31
2.2.9. Extracción del biopolímero.....	32
2.3. Resultados y discusión.....	33
2.3.1. Reactivación e identificación de <i>Bacillus megaterium</i> .....	33
2.3.2. Cultivo en Erlenmeyer.....	35
2.3.3. Cultivo en biorreactor .....	37
2.3.4. Extracción del biopolímero.....	45
2.4. Conclusiones.....	47
<b>CAPÍTULO 3</b>	
<b>CARACTERIZACIÓN DE LOS PHAs EXTRAÍDOS</b>	
3.1. Introducción.....	49
3.2. Materiales y métodos .....	51
3.2.1. Materiales .....	51
3.2.2. Determinación de la estructura química.....	52
3.2.2.1. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) .....	52
3.2.3. Determinación de las propiedades térmicas .....	52
3.2.3.1. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	52
3.2.3.2. Análisis termogravimétrico (TGA).....	53
3.2.4. Formación de las películas .....	53
3.2.5. Caracterización morfológica de las películas.....	54
3.2.5.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	54
3.2.5.2. Propiedades ópticas .....	54
3.3. Resultados y discusión.....	54

3.3.1. Determinación de la estructura química.....	54
3.3.1.1. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) .....	54
3.3.2. Determinación de las propiedades térmicas .....	56
3.3.2.1. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	56
3.3.2.2. Análisis termogravimétrico (TGA).....	60
3.3.3. Caracterización morfológica de las películas generadas .....	63
3.3.3.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	63
3.3.3.2. Propiedades ópticas .....	66
3.4. Conclusiones.....	68

## **CAPÍTULO 4**

### **MODELADO CINÉTICO Y ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS DE LA PRODUCCIÓN DE PHAs A PARTIR DE FUENTES DE CARBONO ALTERNATIVAS**

4.1. Introducción.....	69
4.2. Materiales y métodos .....	72
4.2.1. Determinaciones experimentales.....	72
4.2.2. Modelo cinético .....	73
4.2.3. Problema de estimación dinámica de parámetros .....	76
4.2.4. Algoritmos de optimización .....	78
4.2.4.1 Colocación ortogonal sobre elementos finitos en problemas de optimización dinámica .....	79
4.3. Resultados y discusión.....	81
4.3.1. Cultivo de <i>B. megaterium</i> empleando almidón y extracto de levadura como sustratos.....	81
4.3.2. Cultivo de <i>B. megaterium</i> empleando glicerol como sustrato .....	89
4.4. Conclusiones.....	94

## **CAPÍTULO 5**

### **DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE PLANTAS DE PRODUCCIÓN DE PHAs A PARTIR DE SUSTRATOS ALTERNATIVOS**

5.1. Introducción.....	95
------------------------	----

5.2. Descripción del Proceso.....	97
5.2.1. Pretratamiento de las materias primas.....	98
5.2.1.1. Glicerol .....	99
5.2.1.2. Almidón.....	101
5.2.1.3. Caña de azúcar .....	103
5.2.2. Biosíntesis.....	105
5.2.3. Extracción y purificación del biopolímero .....	107
5.3. Modelo matemático .....	111
5.3.1. Balance general de masa .....	111
5.3.2. Balances de energía .....	112
5.3.3. Restricciones enteras y mixto-enteras .....	113
5.3.4. Restricciones económicas y de diseño .....	118
5.3.5. Función objetivo .....	129
5.3.6. Análisis de sensibilidad .....	131
5.4. Resultados y discusión.....	131
5.5. Conclusiones.....	140

## **CAPÍTULO 6**

### **DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE UNA BIORREFINERÍA INTEGRADA**

6.1. Introducción.....	143
6.2. Descripción del Proceso.....	146
6.2.1. Proceso de producción de biodiesel en base a microalgas .....	146
6.2.1.1. Cultivo microalgal .....	146
6.2.1.2. Cosecha y secado de las microalgas .....	147
6.2.1.3. Extracción de lípidos.....	148
6.2.1.4. Transesterificación de aceites .....	148
6.2.1.5. Purificación de glicerol y recuperación de metanol.....	149
6.2.2. Proceso de digestión anaeróbica y ciclo combinado de calor y potencia .....	150
6.2.2.1. Proceso de digestión anaeróbica .....	150
6.2.2.2. Ciclo combinado de calor y potencia .....	151

6.2.3. Proceso de producción de PHAs .....	151
6.2.3.1. Producción biotecnológica de PHAs.....	151
6.2.3.2. Extracción y purificación del biopolímero.....	152
6.3. Modelo matemático .....	153
6.3.1. Balance general de masa .....	154
6.3.2. Balances de energía .....	155
6.3.3. Restricciones enteras y mixto-enteras .....	157
6.3.4. Restricciones económicas y de diseño .....	158
6.3.5. Restricciones de desigualdad .....	163
6.3.6. Función objetivo .....	164
6.3.7. Análisis de sensibilidad .....	168
6.4. Resultados y discusión.....	168
6.5. Conclusiones.....	177
<b>CAPÍTULO 7</b>	
<b>CONCLUSIONES Y TRABAJOS FUTUROS</b>	
7.1. Conclusiones generales .....	179
7.2. Conclusiones particulares .....	179
7.3. Trabajos futuros .....	182
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>185</b>
<b>ANEXO A .....</b>	<b>225</b>
<b>ANEXO B .....</b>	<b>227</b>
<b>ANEXO C .....</b>	<b>289</b>
<b>PUBLICACIONES Y CONGRESOS .....</b>	<b>319</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.1.</b> Producción mundial de plásticos desde 1950. Modificada de Crawford & Quinn (2017). .....	1
<b>Figura 1.2.</b> Distribución global de la producción de materiales plásticos (CEI: Comunidad de Estados Independientes). Fuente: <a href="http://www.ambienteplastico.com">www.ambienteplastico.com</a> .	2
<b>Figura 1.3.</b> Clasificación de los materiales plásticos según su origen y biodegradabilidad. Modificada de <a href="http://european-bioplastics.org">european-bioplastics.org</a> .....	3
<b>Figura 1.4.</b> Producción mundial de bioplásticos 2017 por tipo de material. Modificada de <a href="http://european-bioplastics.org">european-bioplastics.org</a> .....	4
<b>Figura 1.5.</b> Rutas metabólicas asociadas a la producción de PHAs. Modificada de Tan <i>et al.</i> (2017).....	6
<b>Figura 1.6.</b> Etapas de procesamiento para la producción de PHAs. Modificada de Chen (2009). .....	7
<b>Figura 2.1.</b> Célula productora de biopolímeros completa de gránulos blancos de PHA. Fuente: Gao <i>et al.</i> (2011). .....	20
<b>Figura 2.2.</b> Biorreactor Multifors de 750 mL.....	25
<b>Figura 2.3.</b> Biorreactor Multifors de 2,5 L. ....	25
<b>Figura 2.4.</b> Reacciones involucradas en la cuantificación de glicerol. ....	29
<b>Figura 2.5.</b> Reacciones involucradas en la cuantificación de urea. ....	30
<b>Figura 2.6.</b> Esquema del extractor Soxhlet. Fuente: <a href="http://wikipedia.org">wikipedia.org</a> .....	32
<b>Figura 2.7.</b> Colonias formadas en medio sólido.....	34
<b>Figura 2.8.</b> Imagen de la bacteria reactivada al microscopio óptico (NIKON YS100, Japón) con un aumento 1000x luego de la aplicación de la tinción de Gram. ....	34
<b>Figura 2.9.</b> Micrografía TEM (50000 x) de <i>B. megaterium</i> donde pueden observar los gránulos de PHA en su citoplasma. Pared celular (PC), membrana plasmática (MP), citoplasma (C) y gránulos de PHA (PHA).....	35
<b>Figura 2.10.</b> Evolución en función del tiempo de la biomasa en peso seco (a), producción de PHB (c), consumo de sustratos (b, d, f) y variación del pH (e) para un cultivo en Erlenmeyer con 20 g/L de glicerol y 2 g/L de urea Símbolos: (■) Experimento 1 y (●) Experimento 2. ....	36
<b>Figura 2.11.</b> Evolución en función del tiempo de la biomasa en peso seco (a), producción de PHB (c), consumo de sustratos (b, d, f) y variación del pH (e) para un cultivo en Biorreactor 1 con 20 g/L de glicerol y 2 g/L de urea. Símbolos: (■) Experimento 1 y (●) Experimento 2 .....	38
<b>Figura 2.12.</b> Evolución en función del tiempo de la biomasa en peso seco (a), producción de PHB (c), consumo de sustratos (b, d, f) y variación del pH (e)	



para un cultivo en Biorreactor 2 con 40 g/L de glicerol y 4 g/L de urea. Símbolos: (■) Experimento 1 y (●) Experimento 2 .....	41
<b>Figura 2.13.</b> Presión parcial de oxígeno disuelto ( $p_{O_2}$ ). Símbolos: (■) Biorreactor 1 y (●) Biorreactor 2. ....	45
<b>Figura 2.14.</b> Biopolímero extraído mediante extracción Soxhlet.....	47
<b>Figura 3.1.</b> Fórmula estructural de una molécula de P(3-HB-co-HV) .....	50
<b>Figura 3.2.</b> Fórmula estructural general de una molécula de PHA .....	51
<b>Figura 3.3.</b> Prensa hidráulica de platos calefaccionados Modelo AMS 160/3353	
<b>Figura 3.4.</b> Espectro FTIR de muestra de PHA obtenido a partir de <i>Bacillus megaterium</i> .....	55
<b>Figura 3.5.</b> Espectro FTIR de muestra de PHB comercial.....	56
<b>Figura 3.6.</b> Termograma correspondiente a la muestra de PHA obtenido a partir de <i>Bacillus megaterium</i> .....	57
<b>Figura 3.7.</b> Termograma correspondiente a la muestra de PHB comercial .....	57
<b>Figura 3.8.</b> TGA de la muestra de PHA obtenido a partir de <i>Bacillus megaterium</i> .....	61
<b>Figura 3.9.</b> TGA de la muestra de PHB comercial.....	61
<b>Figura 3.10.</b> Micrografías SEM de la película de PHA biosintetizado. Magnificación: a) 500 x, b) 1000 x, c) 2000 x, d) 5000 x, e) 20000 x, f) 40000 x. .....	64
<b>Figura 3.11</b> Micrografías SEM de la película de PHB comercial. Magnificación: a) 500 x, b) 1000 x, c) 2000 x, d) 5000 x, e) 20000 x y f) 40000 x. .....	66
<b>Figura 3.12.</b> Opacidad y capacidad de barrera al UV de la película de PHA obtenidas mediante <i>Bacillus megaterium</i> y PHB comercial .....	67
<b>Figura 4.1.</b> Enfoque de resolución secuencial en gPROMS. u: vector de variables de optimización. Modificada de Diaz & Biegler (2015).....	79
<b>Figura 4.2.</b> Perfiles de simulación y datos observados de las experiencias DCA (■) y DCAVal (●) como función del tiempo para <i>B. megaterium</i> BBST4. (---) Biomasa total, (— —) Almidón, (—) pH y (.....) Biopolímero: Perfiles simulados para las variables de estado .....	84
<b>Figura 4.3.</b> Perfiles de simulación y datos observados de las experiencias DCB (■) y DCBVal (●) como función del tiempo para <i>B. megaterium</i> BBST4. (---) Biomasa total, (— —) Almidón, (—) pH y (.....) Biopolímero: Perfiles simulados para las variables de estado .....	87
<b>Figura 4.4.</b> Perfiles de simulación y datos observados de concentraciones de a) biomasa total, b) glicerol, c) biomasa residual, d) urea, e) biopolímero, f)	

fósforo y g) iones hidrógeno. (●) Datos experimentales, (—) Perfiles simulados. ....	92
<b>Figura 5.1.</b> Superestructura simplificada de la biorrefinería para la producción de PHAs .....	98
<b>Figura 5.2.</b> Superestructura del sector de purificación de materias primas de la biorrefinería para la producción de PHAs.....	99
<b>Figura 5.3.</b> Superestructura del sector de biosíntesis de una biorrefinería para la producción de PHAs.....	105
<b>Figura 5.4.</b> Superestructura del sector de extracción y purificación de la biorrefinería para la producción de PHAs.....	108
<b>Figura 5.5.</b> Resultados de la optimización de la biorrefinería para la producción PHA.....	132
<b>Figura 5.6.</b> Distribución del costo de producción de PHA.....	133
<b>Figura 5.7.</b> Distribución del costo de materias primas e insumos.....	134
<b>Figura 5.8.</b> Distribución de la energía consumida en la planta de producción de PHA.....	135
<b>Figura 5.9.</b> Distribución de la energía consumida por los equipos en el sector de extracción y purificación .....	135
<b>Figura 5.10.</b> Distribución de la inversión inicial.....	137
<b>Figura 5.11.</b> Análisis de sensibilidad de la planta de producción de PHA .....	138
<b>Figura 5.12.</b> Resultados de la planta de producción PHA mediante extracción con solvente .....	140
<b>Figura 6.1.</b> Evolución del concepto de biorrefinería tradicional hacia biorrefinería integrada .....	144
<b>Figura 6.2.</b> Superestructura simplificada de la biorrefinería integrada propuesta .....	146
<b>Figura 6.3.</b> Reacción de transesterificación de triglicéridos.....	149
<b>Figura 6.4.</b> Superestructura de la biorrefinería microalgal propuesta .....	154
<b>Figura 6.5.</b> Resultados de la optimización de la biorrefinería integrada (escenario 1) .....	169
<b>Figura 6.6.</b> Distribución de costos de producción (escenario 1) .....	171
<b>Figura 6.7.</b> Comparación entre los diferentes escenarios presentados. a) Valor presente neto y b) Distribución de costo de producción.....	175
<b>Figura 6.8.</b> Análisis de sensibilidad de la biorrefinería integrada.....	177
<b>Figura A.1.</b> Curva de calibrado para la determinación de la biomasa .....	225

<b>Figura A.2.</b> Curva de calibrado para la determinación de PHB .....	225
<b>Figura A.3.</b> Curva de calibrado para la determinación del glicerol .....	226
<b>Figura A.4.</b> Curva de calibrado para la determinación de urea .....	226
<b>Figura A.5.</b> Curva de calibrado para la determinación de fósforo.....	226

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.1.</b> Empresas productoras de PHAs en el mundo .....	12
<b>Tabla 2.1.</b> Comparación del porcentaje de acumulación de PHA entre distintas cepas de <i>Bacillus megaterium</i> .....	40
<b>Tabla 2.2.</b> Resumen de los resultados obtenidos para <i>B. megaterium</i> BBST4	44
<b>Tabla 3.1.</b> Fórmula estructural de PHAs de cadena corta, media y larga .....	51
<b>Tabla 3.2.</b> Variación del contenido de copolímero en función de la temperatura y entalpía de fusión de P(3HB-co-3HV) (Anjum <i>et al.</i> , 2016) .....	58
<b>Tabla 3.3.</b> Propiedades térmicas de PHAs biosintetizados.....	59
<b>Tabla 3.4.</b> Temperatura de degradación de PHB y P(3HB-co-3HV) reportados en la literatura.....	62
<b>Tabla 3.5.</b> Parámetros de color para las películas de biopolímero .....	68
<b>Tabla 4.1.</b> Principales métricas del problema de estimación de parámetros para las experiencias DCA y DCB.....	82
<b>Tabla 4.2.</b> Set de parámetros óptimos para el modelo de producción de PHA a partir de <i>B. megaterium</i> BBST4 (Experiencia DCA y DCB).....	82
<b>Tabla 4.3.</b> Error medio ( <i>EM</i> ), error relativo ( <i>ER</i> ) e índice de concordancia ( <i>d</i> ) de las variables de estado de la experiencia DCA empleando <i>B. megaterium</i> BBST4 .....	85
<b>Tabla 4.4.</b> Error medio ( <i>EM</i> ), error relativo ( <i>ER</i> ) e índice de concordancia ( <i>d</i> ) de las variables de estado de la experiencia DCAVal empleando <i>B. megaterium</i> BBST4 .....	86
<b>Tabla 4.5.</b> Error medio ( <i>EM</i> ), error relativo ( <i>ER</i> ) e índice de concordancia ( <i>d</i> ) de las variables de estado de la experiencia DCB empleando <i>B. megaterium</i> BBST4.....	87
<b>Tabla 4.6.</b> Error medio ( <i>EM</i> ), error relativo ( <i>ER</i> ) e índice de concordancia ( <i>d</i> ) de las variables de estado de la experiencia DCBVal empleando <i>B. megaterium</i> BBST4 .....	88
<b>Tabla 4.7.</b> Set de parámetros óptimos para el modelo de producción de PHA a partir de <i>B. megaterium</i> BBST4 (Experiencia ERL).....	91
<b>Tabla 4.8.</b> Error medio ( <i>EM</i> ), error relativo ( <i>ER</i> ) e índice de concordancia ( <i>d</i> ) de las variables de estado de la experiencia ERLen empleando <i>B. megaterium</i> BBST4 .....	94
<b>Tabla 5.1.</b> Composición típica de glicerol crudo.....	100
<b>Tabla 5.2.</b> Composición típica del grano de maíz .....	101
<b>Tabla 5.3.</b> Composición típica de la caña de azúcar.....	104

<b>Tabla 5.4.</b> Principales parámetros utilizados en el sector de biosíntesis .....	106
<b>Tabla 5.5.</b> Transformación de los principales operadores lógicos a forma algebraica.....	114
<b>Tabla 5.6.</b> Principales parámetros utilizados para el modelado de los intercambiadores de calor I .....	123
<b>Tabla 5.7.</b> Principales parámetros utilizados para el modelado de los intercambiadores de calor II .....	125
<b>Tabla 5.8.</b> Índices de rentabilidad considerados en la evaluación económica	136
<b>Tabla 5.9.</b> Set de potenciales rutas tecnológicas de procesamiento de PHAs .....	139
<b>Tabla 6.1.</b> Principales parámetros de consumo energético .....	156
<b>Tabla 6.2.</b> Principales parámetros utilizados para el cálculo de costos de los equipos.....	161
<b>Tabla 6.3.</b> Principales parámetros utilizados para el cálculo de costos de equipamiento a partir de la regla de los seis décimos.....	162
<b>Tabla 6.4.</b> Principales restricciones de desigualdad del modelo.....	163
<b>Tabla 6.5.</b> Precios y costos empleados en la superestructura propuesta .....	167
<b>Tabla 6.6.</b> Distribución del consumo energético anual.....	171
<b>Tabla 6.7.</b> Distribución del costo de capital.....	172
<b>Tabla B.1.</b> Parámetros de balance de masa del sector de purificación de glicerol crudo .....	231
<b>Tabla B.2.</b> Parámetros utilizados en los balances de masa del sector de tratamiento de grano de maíz.....	238
<b>Tabla B.3.</b> Parámetros utilizados en los balances de masa de sacarificación de almidón.....	243
<b>Tabla B.4.</b> Parámetros utilizados en los balances de masa del sector de acondicionamiento de la caña de azúcar .....	247
<b>Tabla B.5.</b> Parámetros utilizados en los balances de masa asociados al sector de biosíntesis de PHA .....	257
<b>Tabla B.6.</b> Parámetros utilizados en los balances de masa asociados al sector de extracción enzimática .....	262
<b>Tabla B.7.</b> Parámetros utilizados en los balances de masa asociados al sector de extracción por solvente .....	266
<b>Tabla B.8.</b> Parámetros utilizados en los balances de masa asociados al sector de extracción con surfactante.....	270

<b>Tabla B.9.</b> Parámetros utilizados en los balances de masa asociados al sector de extracción con surfactante y quelato .....	276
<b>Tabla B.10.</b> Parámetros utilizados en los balances de masa asociados al sector de purificación .....	278
<b>Tabla B.11.</b> Parámetros de consumo energético.....	279
<b>Tabla B.12.</b> Parámetros de consumo energético de los equipos <i>DS1 – 2, SD2</i> .....	280
<b>Tabla B.13.</b> Precio de venta de productos y subproductos.....	281
<b>Tabla B.14.</b> Costo de las materias primas .....	283
<b>Tabla B.15.</b> Dimensiones características y costos de los equipos involucrados en el sector óptimo de purificación de la materia prima .....	286
<b>Tabla B.16.</b> Dimensiones características y costos de los equipos involucrados en el sector óptimo de biosíntesis de PHA.....	286
<b>Tabla B.17.</b> Dimensiones características y costos de los equipos involucrados en el sector óptimo de extracción y purificación del biopolímero.....	287
<b>Tabla C.1.</b> Parámetros de balance de masa del sector de producción de biodiesel .....	301
<b>Tabla C.2.</b> Parámetros de balance de masa del sector de digestión anaeróbica .....	308
<b>Tabla C.3.</b> Parámetros de balance de masa del sector de producción de PHA .....	316

## Nomenclatura

### Componentes

<i>act</i>	acetona
<i>al</i>	microalga
<i>agu</i>	agua
<i>amd</i>	almidón
<i>asulf</i>	ácido sulfúrico
<i>bd</i>	biodiesel
<i>bmr</i>	biomasa residual
<i>carb</i>	carbohidratos
<i>cdo</i>	dióxido de carbono
<i>ch</i>	coagulante
<i>chel</i>	quelato
<i>ch4</i>	metano
<i>cñz</i>	caña de azúcar
<i>cal</i>	hidróxido de calcio
<i>cenz</i>	cenizas
<i>des</i>	dietil succinato
<i>enz</i>	enzimas
<i>fbr</i>	fibras
<i>fer</i>	fertilizantes
<i>ffa</i>	ácido grasos libres
<i>fgs</i>	gas de escape
<i>glic</i>	glicerol
<i>gluc</i>	glucosa
<i>glutf</i>	gluten feed
<i>glutm</i>	gluten meal

<i>hcl</i>	ácido clorhídrico
<i>hex</i>	hexano
<i>h2o2</i>	peróxido de hidrógeno
<i>jab</i>	jabones
<i>lpd</i>	lípidos
<i>mdx</i>	maltodextrinas
<i>merc</i>	mercaptano
<i>met</i>	metanol
<i>micr</i>	microorganismos
<i>mlz</i>	melazas de caña de azúcar
<i>moxs</i>	metóxido de sodio
<i>mz</i>	maiz
<i>nacl</i>	cloruro de sodio
<i>naocl</i>	hipoclorito de sodio
<i>naoh</i>	hidróxido de sodio
<i>nit</i>	nitrógeno
<i>oc</i>	torta algal
<i>otr</i>	otros
<i>pha</i>	PHA
<i>pot</i>	fósforo
<i>prt</i>	proteínas
<i>sac</i>	sacarosa
<i>sds</i>	dodecil sulfato sódico
<i>sld</i>	agua residual
<i>srf</i>	surfactante (betaína)
<i>sv</i>	sólidos volátiles
<i>tg</i>	triglicéridos



<i>vap</i>	vapor
<i>wp</i>	papel de desecho
<i>amls</i>	$\alpha$ -amilasa
<i>γmls</i>	glucoamilasa

### Corrientes

<i>acets</i>	acetona
<i>amzs</i>	almidón de maíz procesado
<i>amdcs</i>	almidón de mandioca procesado
<i>asulfs</i>	ácido sulfúrico
<i>bds</i>	biodiesel
<i>cachs</i>	cachaza
<i>cacts</i>	carbón activado
<i>cals</i>	hidróxido de calcio
<i>chels</i>	quelato
<i>chs</i>	coagulante
<i>cñzs</i>	caña de azúcar
<i>crms</i>	biomasa residual
<i>dsst</i>	di-etilsuccinato
<i>dess</i>	di-etilsuccinato
<i>enzs</i>	enzimas
<i>epo</i>	energía eléctrica
<i>fgss</i>	gas de escape
<i>fert</i>	fertilizantes
<i>glics</i>	glicerol crudo
<i>glips</i>	glicerol purificado
<i>glutfs</i>	gluten feed
<i>glutms</i>	gluten meal

<i>hcls</i>	ácido clorhídrico
<i>hpo</i>	energía térmica
<i>h2os</i>	agua
<i>h2o2s</i>	peróxido de hidrógeno
<i>mcults</i>	medio de cultivo
<i>mets</i>	metanol
<i>mlzs</i>	melaza de caña de azúcar
<i>mnt</i>	nutrientes frescos
<i>mwr</i>	agua fresca
<i>mzs</i>	granos de maíz
<i>naocls</i>	hipoclorito de sodio
<i>naohs</i>	hidróxido de sodio
<i>phas</i>	polihidroxialcanoato
<i>pbs</i>	polihidroxialcanoato
<i>rcdo</i>	dióxido de carbono recirculado
<i>rnt</i>	nutrientes recirculados
<i>rwr</i>	agua recirculada
<i>sacs</i>	sacarosa
<i>schs</i>	surfactante
<i>sdss</i>	dodecilsulfato sódico
<i>slds</i>	lodos de aguas residuales
<i>srfs</i>	betaína
<i>stm1</i>	vapor
<i>vaps</i>	vapor
<i>wps</i>	papel de desecho
<i>wr</i>	agua
<i>wst</i>	desperdicios

<i>wv</i>	vapor
<i>amlss</i>	$\alpha$ -amilasa
<i>γmlss</i>	glucoamilasa
<u>Equipos</u>	
<i>AD</i>	digestor anaeróbico
<i>BR1 – 14</i>	biorreactor
<i>CHP</i>	ciclo combinado de calor y potencia
<i>CL</i>	clarificador
<i>CN1 – 10</i>	centrífuga
<i>CT</i>	cinta transportadora
<i>DC1 – 6</i>	decantador
<i>DG1 – 4</i>	digestor
<i>DIS</i>	columna de destilación
<i>DR</i>	secadora
<i>DRY</i>	secador
<i>DS1 – 2</i>	columnas de destilación
<i>EX</i>	extractor
<i>FL1 – 8</i>	flash
<i>FP</i>	filtro de prensa
<i>FR</i>	horno
<i>HC1 – 2</i>	hidrociclón
<i>HOM</i>	homogeneizador
<i>HR</i>	unidad de recuperación de hexano
<i>HX1 – 13</i>	intercambiador de calor
<i>LE</i>	extractor de lípidos
<i>NEUTR</i>	reactor de neutralización
<i>MIX1 – 6</i>	mezcladores

<i>OP</i>	piletas abiertas
<i>RC1 – 4</i>	reactor
<i>RD</i>	tambor rotatorio
<i>RL</i>	reactor de licuefacción
<i>RS</i>	reactor de sacarificación
<i>SD1 – 2</i>	secador por aspersión
<i>SPL</i>	torre de separación
<i>STR</i>	torre de separación
<i>ST1 – 3</i>	esterilizador
<i>ML1 – 3</i>	malla
<i>MO1 – 3</i>	molino
<i>TA</i>	tanque aglutinante
<i>TAC</i>	tanque acondicionador
<i>TB</i>	turbina
<i>TPBR</i>	fotobiorreactor tubular
<i>TRANS</i>	reactor de transesterificación
<i>TK1 – 7</i>	tanque
<i>WC</i>	columna de lavado

### Variables y parámetros

<i>A</i>	área del intercambiador de calor en m <sup>2</sup> .
<i>air<sub>rate</sub></i>	flujo de aire necesario para operar en m <sup>3</sup> .
<i>C<sub>acces</sub></i>	costo de los accesorios en \$.
<i>C<sub>agitador</sub></i>	costo del agitador en \$.
<i>C<sub>carcasa</sub></i>	costo de la carcasa en \$.
<i>C<sub>eq</sub></i>	costo del equipo en \$.
<i>cp</i>	calor específico en kJ/(kg °C).
<i>C<sub>SB</sub></i>	coeficiente de Souders y Brown en pie/s.

$D$	diámetro en m.
$D_N$	diámetro nominal de la tobera en m.
$D_p$	diámetro de la partícula en $\mu\text{m}$ .
$Eff$	eficiencia de los platos
$F_{BM}$	factor de corrección de material y presión.
$F_{BM1}$	factor de corrección de material y presión para la cinta.
$F_{BM1}$	factor de corrección de material y presión para el motor.
$f_e$	factor de corrección por espesor.
$F_{LV}$	factor de relación líquido vapor
$f_m$	factor de corrección por material.
$FO$	factor de operación de unidades externas.
$f_p$	factor de corrección por presión.
$H$	altura en m.
$H_D$	altura desde el centro de la tobera al eliminador de niebla
$H_{inf}$	altura designada para el líquido por debajo en m.
$H_H$	altura de llenado en m.
$H_{LIN}$	altura desde la cota de llenado al centro de la tobera en m.
$H_{LLL}$	altura mínima del nivel del líquido en m.
$H_{ME}$	altura destinada al eliminador de niebla en m.
$H_{minfondo}$	altura mínima destinada a la sección inferior del equipo en m
$H_{mintope}$	altura mínima destinada a la sección superior del equipo en m
$H_S$	altura de vaciado en m.
$H_t$	separación entre platos en m.
$I_{CE}$	índice de actualización de costos para ingeniería química.
$L$	largo de la cinta transportadora en m.
$m_{a,enfr}$	caudal de agua de enfriamiento en kg/h.

$m_{mat}$	peso del material en kg.
$m_{vap}$	caudal de vapor de agua en kg/h.
$M\&S$	índice de actualización de costos Marshall & Swift.
$N$	número de etapas teóricas a partir de la correlación de Gilliland.
$Pent_{W/AS}$	lb de agua por libra de aire seco a la entrada del SD.
$Pot$	potencia requerida en kW.
$Pot_{vol}$	potencia volumétrica requerida por los agitadores en kW/m <sup>3</sup> .
$Psal_{W/AS}$	lb de agua por libra de aire seco a la salida del SD.
$Q$	energía consumida o liberada en kJ/h.
$rel_{H/D}$	relación altura/diámetro.
$rel_{liq/vap}$	relación líquido vapor
$t_1$	tiempo asociado a la instrumentación en min.
$t_2$	tiempo asociado al operador en min.
$t_H$	tiempo de llenado en min.
$t_{resid}$	tiempo de residencia en s.
$t_{ret}$	tiempo de retención en h.
$T_s$	separación entre platos de la columna en pie
$t_s$	tiempo de vaciado en min.
$U$	coeficiente global de transferencia de calor en kJ/(m <sup>2</sup> s °C)
$U_{NF}$	velocidad de inundación del vapor en pie/s.
$V_1$	volumen asociado a la ocupación de vapores en m <sup>3</sup> .
$V_2$	volumen mínimo asociado a razones operativas en m <sup>3</sup> .
$V$	volumen en m <sup>3</sup> .
$V_H$	volumen de vaciado en m <sup>3</sup> .
$V_{mat}$	volumen del material en m <sup>3</sup> .
$V_{ret}$	volumen de retención en m <sup>3</sup> .

$V_S$	volumen de llenado en $m^3$ .
$V_{tot}$	volumen total del fluido en el interior de los equipos en $m^3$ .
$v_{ent}$	volumen específico del aire a la entrada del SD en $pie^3/lb$ .
$v_{sal}$	volumen específico del aire a la salida del SD en $pie^3/lb$ .
$\rho_{\theta}^k$ $kg/m^3$ .	densidad de fluido de la corriente $k$ ingresando al equipo $\theta$ en $kg/m^3$ .
$\Delta T_{ml}$	diferencia de temperatura media logarítmica en $^{\circ}C$ .
$\Delta T$	diferencia de temperatura en $^{\circ}C$ .
$\sigma$	tensión superficial del líquido dina/cm.
$\rho_{acero}$	densidad del acero en $kg/m^3$ .
$\rho_{MB}$	densidad de la mezcla bifásica en $kg/m^3$ .



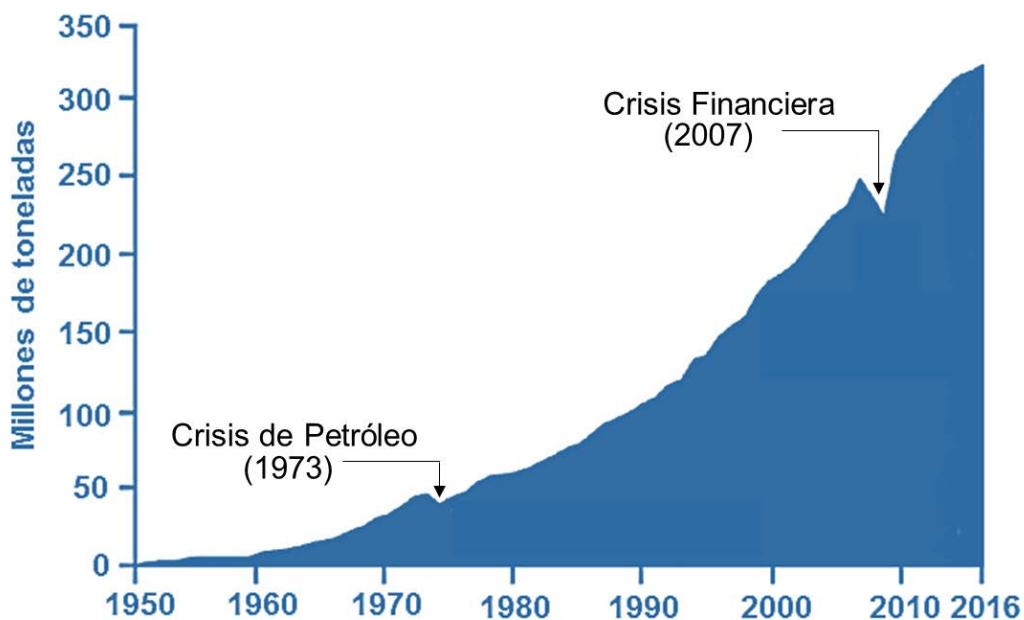


# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN GENERAL

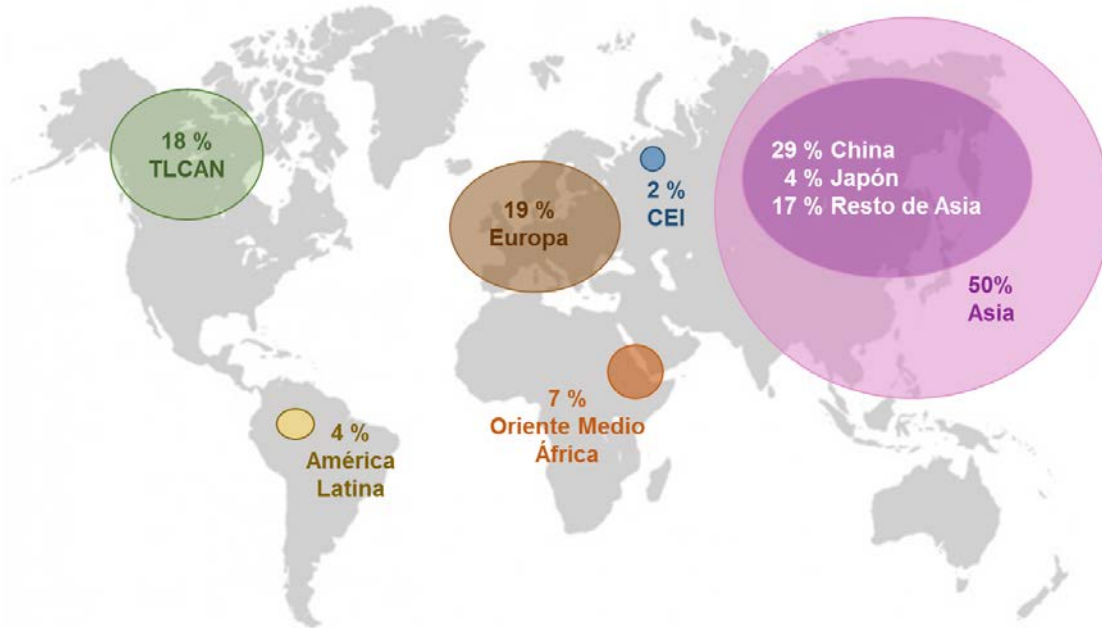
### 1.1. Panorama mundial de la producción de plásticos

Los plásticos derivados del petróleo se han transformado en una parte esencial de la vida cotidiana de la población, ya que actualmente se emplean en numerosas aplicaciones que van desde el envasado de productos alimenticios hasta la manufactura de complejos dispositivos médicos (Basnett *et al.*, 2017). La gran versatilidad que presentan estos materiales, junto con su creciente demanda, han impulsado una progresiva producción global a través de los años (Crawford & Quinn, 2017) como se muestra en la Figura 1.1.



**Figura 1.1.** Producción mundial de plásticos desde 1950. Modificada de Crawford & Quinn (2017).

En 1950, la producción anual totalizaba 1,5 MMt, y, exceptuando las caídas debido a la crisis del petróleo en 1973 y a la crisis financiera de 2007, la producción mundial de plásticos ha aumentado aproximadamente 9 % por año (Hirai *et al.*, 2011) hasta alcanzar los 335 MMt, en 2016 (conversio-gmbh.com). Actualmente, dentro de los principales productores se destacan China (29 %), Europa (19 %) y los países del Tratado de Libre Comercio de América del Norte (TLCAN, Estados Unidos, Canadá y México) con un 18 % de la producción total (Figura 1.2).

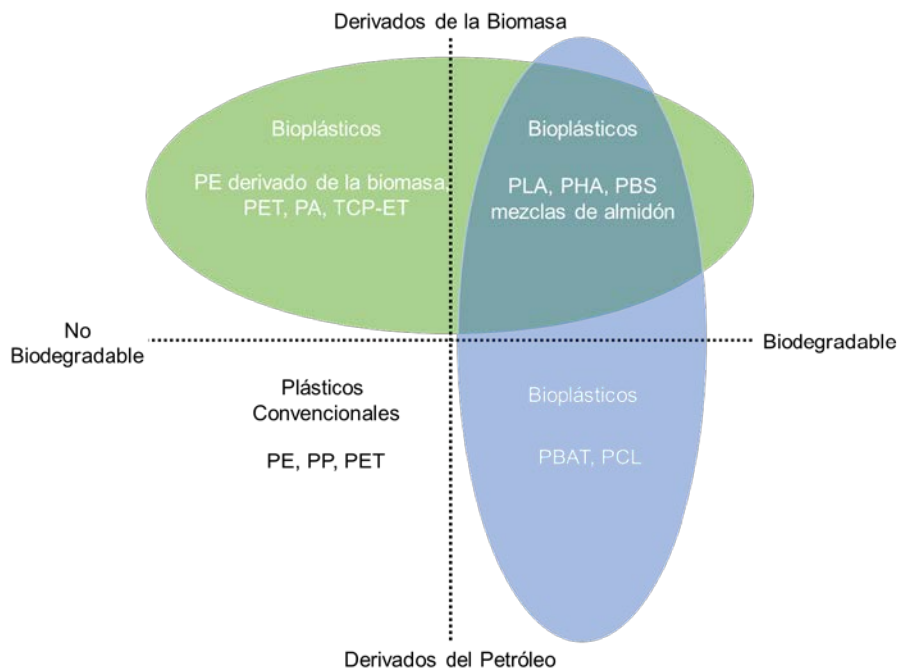


**Figura 1.2.** Distribución global de la producción de materiales plásticos (CEI: Comunidad de Estados Independientes). Fuente: [www.ambienteplastico.com](http://www.ambienteplastico.com)

Las perspectivas actuales sugieren que se espera un incremento exponencial de la producción de plásticos a futuro (Neufeld *et al.*, 2016). Complementariamente, dentro de las dificultades que presentan los polímeros sintéticos convencionales, se pueden encontrar problemas medioambientales asociados a su lenta degradación (Albuquerque & Malafaia, 2018) y, por consecuencia, la generación de desechos no biodegradables (Brandon & Criddle, 2019; Ali Raza *et al.*, 2018), alcanzando los 34 MMt/año de los cuales el 93 % son dispuestos en rellenos sanitarios (Pathak *et al.*, 2014). Estos inconvenientes han motivado una búsqueda intensiva en el área de la biotecnología para encontrar soluciones a los problemas generados por los plásticos tradicionales.

Una de las alternativas más prometedoras es la familia de los bioplásticos, que incluye a cualquier material plástico que sea biodegradable, derive de biomasa, o presente ambas características a la vez ([european-bioplastics.org](http://european-bioplastics.org)). En este punto, resulta importante destacar la diferencia que existe entre biodegradable y bioplástico. La biodegradación es un proceso químico en el cual un agente biológico (microorganismos, sol, agua, etc.) descompone un material en sustancias naturales como agua, dióxido de carbono, metano y biomasa. Por otro lado, el término bioplástico hace referencia a que el material deriva, al

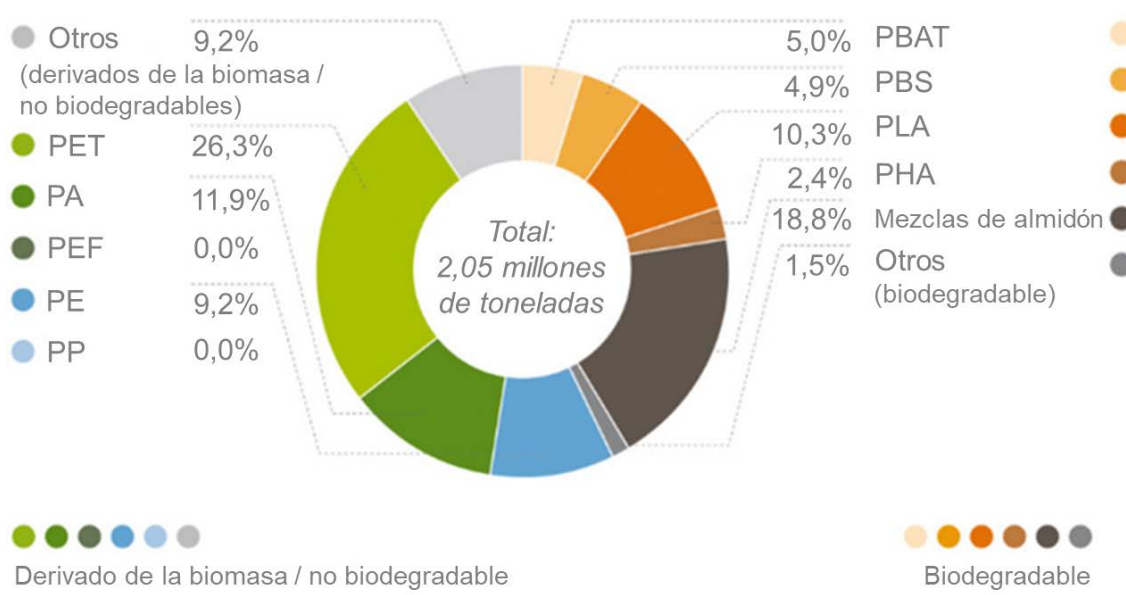
menos en parte, de la biomasa, lo cual no implica necesariamente que sea biodegradable. En resumen, se pueden mencionar a los plásticos derivados del petróleo como los plásticos convencionales que no son biodegradables como el polietileno (PE), polipropileno (PP), polietilentereftalato (PET); junto con aquellos que efectivamente resultan biodegradables como el polibutirato (PBAT) o la policaprolactona (PCL) en los cuadrantes inferiores izquierdo y derecho de la Figura 1.3, respectivamente. Por otro lado, dentro de los derivados de biomasa, se encuentran los bioplásticos no biodegradables como el elastómero de poliéster termoplástico (TPC-ET) además de los mencionados PE, PP y PET que también pueden producirse a partir de recursos renovables (cuadrante superior izquierdo de Figura 1.3). Por último, se encuentran aquellos de base biológica que además son biodegradables como los poli(hidroxicanoato)s (PHAs), el poliácido láctico (PLA) y polibutileno succinato (PBS) como se muestra en el cuadrante superior derecho de la Figura 1.3.



**Figura 1.3.** Clasificación de los materiales plásticos según su origen y biodegradabilidad. Modificada de european-bioplastics.org

Los polímeros biodegradables producidos a partir de fuentes renovables (biopolímeros) han surgido como potenciales sustitutos de los plásticos sintéticos. Los biopolímeros, además de ser sustentables y biodegradables por

naturaleza, poseen propiedades similares a los polímeros en base fósil, con lo cual se podría reducir la dependencia de los plásticos tradicionales y proveer alternativas más amigables con el medio ambiente (Thomson *et al.*, 2009). Actualmente, la producción de plásticos biodegradables representa menos del 1 % de los plásticos que se generan anualmente, sin embargo, su creciente demanda y la existencia de biopolímeros más sofisticados con nuevas aplicaciones, permiten un continuo crecimiento del mercado. De acuerdo con la información recopilada por la asociación europea de bioplásticos (European Bioplastics, european-bioplastics.org) en colaboración con el Instituto nova (nova-Institute), se predice que la producción de bioplásticos crecerá aproximadamente un 20 % desde 2,05 MMt en 2017 hasta 2,44 MMt en 2022. Los biopolímeros como el PLA y los PHAs son los principales impulsores de este crecimiento. Si bien en la actualidad solo representan un 10,3 % (PLA) y 2,4 % (PHAs) de la producción total de bioplásticos en nuestro planeta, se estima que en 5 años las capacidades de producción aumentarán un 50 % para el PLA y se triplicarán para el caso de los PHAs.



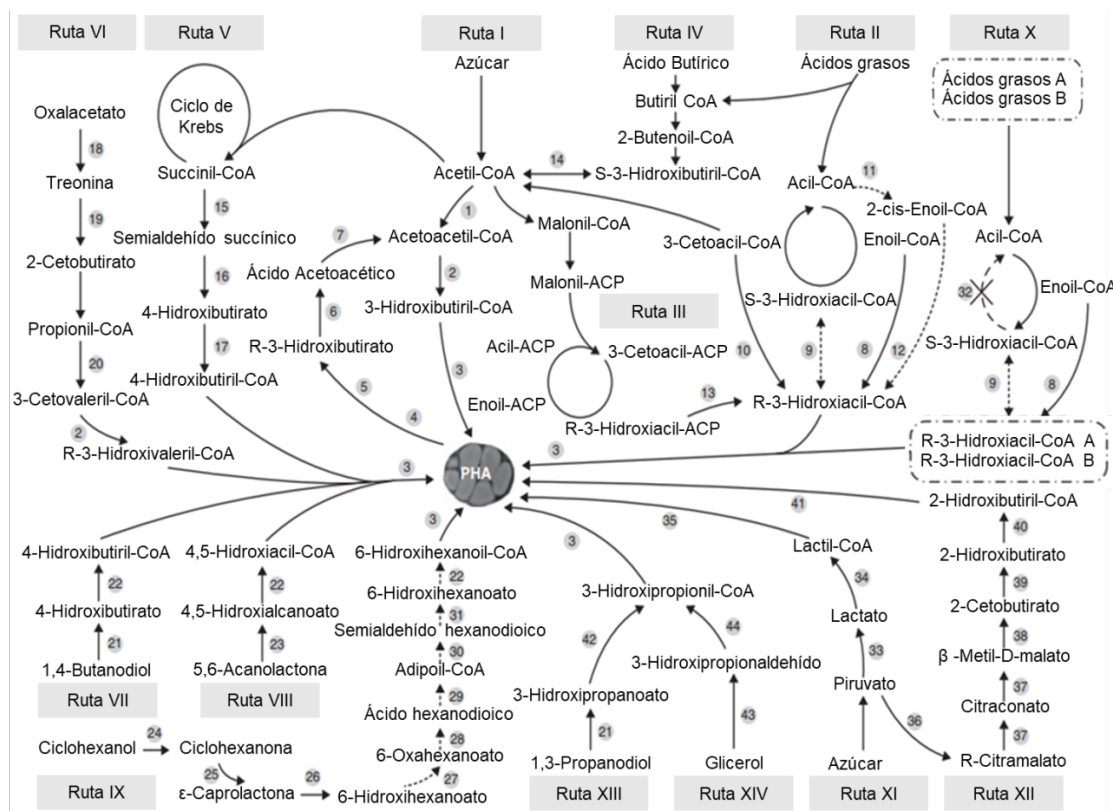
**Figura 1.4.** Producción mundial de bioplásticos 2017 por tipo de material. Modificada de european-bioplastics.org

## 1.2. Poli(hidroxialcanoato)s

Los PHAs son una familia de biopolímeros que pueden ser sintetizados por numerosas bacterias como reserva de carbono y energía (Lee, 1996). Cerca de

un tercio de las bacterias que residen en el suelo pueden acumular PHAs intracelularmente y algunas de ellas pueden acumular hasta el 90 % en peso seco de su biomasa (Chen & Patel, 2012). Comparado con otros bioplásticos, los PHAs presentan una extensa diversidad de monómeros, reportándose cerca de 150 variedades estructurales (Chen & Wu, 2005; Steinbüchel & Valentin, 1995). Pueden formar homopolímeros, copolímeros al azar o bloques de copolímeros dependiendo de las especies de bacterias productoras y las condiciones de crecimiento empleadas, permitiendo una amplia gama de propiedades, desde materiales rígidos a elásticos con flexibilidad de propiedades térmicas y mecánicas (Park *et al.*, 2012).

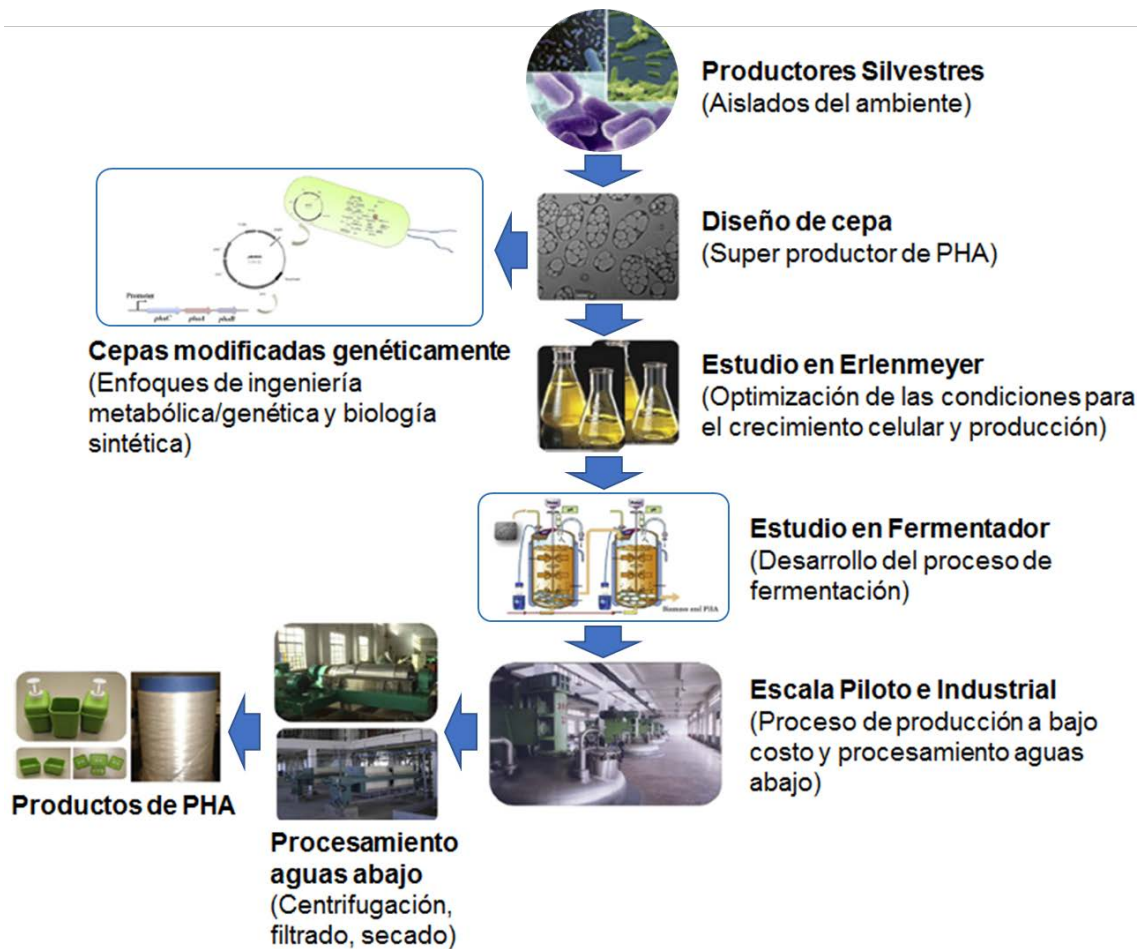
Actualmente se pueden encontrar en la literatura 14 rutas metabólicas asociadas a la formación de PHAs como se muestra en la Figura 1.5 (Meng *et al.*, 2014). En particular, dentro de las más conocidas se destacan 4 rutas metabólicas. Por su parte, la ruta I considera la producción de PHA a partir de azúcar para la formación de acetilcoenzima (acetil-CoA) que posteriormente forma el complejo acetoacetil-coenzima que finalmente se reduce al complejo enzimático 3-hidroxiacil-CoA el cual ingresa al proceso de polimerización para la formación de PHB (Slater *et al.*, 1988). La ruta metabólica II tiene a los ácidos grasos como sustrato, los cuales ingresan a un ciclo de  $\beta$ -oxidación que lleva a la formación de R-3-hidroxiacil-CoA, un monómero precursor de la síntesis de la mayoría de los PHAs de cadena media (Huisman *et al.*, 1989). En la ruta metabólica III, la acetil-CoA se transforma a malonil-CoA para posteriormente formar 3-ketoacil-ACP (ACP: proteína transportadora de grupos acilos) y consecuentemente sintetizar monómeros de R-3-hidroxiacil-CoA (Klinke *et al.*, 1999; Verwoert II *et al.*, 1992). Finalmente, la ruta IV emplea ácido butírico para la formación de S-3-hidroxiacil-CoA, precursor de acetil-CoA (Chohan & Copeland, 1998). Por otro lado, existen otras rutas metabólicas menos comunes que las mencionadas, como así también aquellas que surgen de la ingeniería metabólica, las cuales llevan a la síntesis de PHAs no convencionales (rutas metabólicas V a XIV) (Tan *et al.*, 2017).



**Figura 1.5.** Rutas metabólicas asociadas a la producción de PHAs. Modificada de Tan *et al.* (2017).

En términos generales, la producción industrial de PHAs involucra una serie de etapas previas que permiten alcanzar los diversos factores que promueven una adecuada biosíntesis del polímero como se observa en la Figura 1.6 (Chen, 2009). En primera instancia, se examinan las cepas que habitan en un ambiente de similares características a aquel donde se proyecta llevar a cabo el crecimiento y la biosíntesis. Asimismo, se puede obtener una cepa apropiada para la producción de biopolímero a partir de la aplicación de ingeniería genética o metabólica basándose en las mencionadas rutas de síntesis (Figura 1.5). En segundo lugar, se optimizan las condiciones de cultivo (temperatura, pH, oxígeno, concentraciones del sustrato) para alcanzar una acumulación de PHA máxima, acompañada de un crecimiento celular deseado. A continuación, se efectúa un estudio a escala laboratorio a fin de desarrollar un proceso de biosíntesis efectivo. En esta instancia, se tienen en cuenta factores como la densidad celular final, la tasa de crecimiento bacteriano, el porcentaje de acumulación de PHA dentro del microorganismo, el tiempo de cultivo, la eficiencia de la conversión de sustrato a producto, el costo del sustrato y el

método de extracción y purificación del biopolímero. En la escala piloto e industrial, se pone el foco de atención en el control de costos de todo el proceso mientras se mantienen las condiciones de operación que aseguran el máximo crecimiento celular y rendimiento hacia PHA. A su vez, en esta etapa se busca optimizar el procesamiento aguas abajo y desarrollar nuevas aplicaciones para el producto final.



**Figura 1.6.** Etapas de procesamiento para la producción de PHAs. Modificada de Chen (2009).

### 1.3. Aplicaciones de los PHAs

En los últimos años los PHAs han recibido creciente atención debido a la similitud de sus propiedades con las de los polímeros petroquímicos como el PP o poliestireno (PS) (Mozejko-Ciesielska & Kiewisz, 2016). La amplia diversidad química en sus radicales permite que las propiedades físicas de los biopolímeros varíen desde rígidos y frágiles a blandos y elastoméricos (Witholt & Kessler, 1999), las cuales, inclusive, pueden mejorarse o regularse mediante

la formación de mezclas con otros biopolímeros o nanocompuestos (Dall'Asta *et al.*, 2017). Además son insolubles en agua, no tóxicos, biocompatibles y presentan propiedades piezoeléctricas. Asimismo, algunas películas de PHA exhiben propiedades de barrera a los gases que resultan comparables con el policloruro de vinilo (PVC) y el PET, con la ventaja de que son biodegradables en diferentes ambientes (Quillaguaman *et al.*, 2010).

Basnett *et al.* (2017) proponen agrupar las numerosas aplicaciones que existen actualmente para este tipo de biopolímeros en dos grandes grupos. Uno de ellos comprende aquellos con fines biomédicos mientras que el otro engloba aplicaciones industriales.

### **1.3.1. Aplicaciones médicas**

La ingeniería de tejidos, instaurada a fines de los años 90, se ha transformado en un área multidisciplinaria que involucra a la ciencia de los materiales, la ingeniería, biofísica, ciencia quirúrgica, la biotecnología, entre otras (Basnett *et al.*, 2017). En esta área, los soportes utilizados son los componentes básicos en la estrategia de regeneración, por lo cual, las propiedades mecánicas del material empleado para soportes constituyen un factor determinante para definir su aplicación. Las principales condiciones de los soportes usados en ingeniería de tejidos son la biocompatibilidad, la capacidad de actuar como soporte para la adhesión celular, la habilidad de organizar el acoplamiento celular, la porosidad que permita el crecimiento del tejido y la posibilidad de degradarse en productos no tóxicos (Williams *et al.*, 1999). En este sentido, los PHAs han demostrado poseer estas propiedades necesarias para ser empleados como material de los soportes (Biazar, 2014). En la literatura se pueden encontrar ejemplos tales como el empleo de poli(3-hidroxiбутirato) (PHB) en la fabricación de soportes para huesos (Montazeri *et al.*, 2015); el copolímero poli(3-hidroxiбутirato-3-co-hidroxi valerato) (P(3HB-co-3HV)) para el uso en ligamentos y tendones (Rathbone *et al.*, 2010); poli(3-hidroxi octanoato) (P(3-HO)) para reparaciones cardiovasculares (Sodian *et al.*, 2000). Asimismo, desde el 2007 el poli(4-hidroxi бутirato) se emplea como material biomédico para suturas quirúrgicas luego de ser aprobado por la agencia estadounidense FDA (Food and Drug Administration), responsable de la regulación de



alimentos y medicamentos para aplicaciones clínicas (Shishatskaya *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2009).

Por otra parte, en el campo de la administración de medicamentos se buscan sistemas que faciliten la liberación de drogas, aumenten la focalización de la droga en un sector determinado e incrementen la biodisponibilidad de la droga minimizando su toxicidad y efectos secundarios (Zhang *et al.*, 2018). Biopolímeros como el P(3HB) y P(3HB-co-3HV) se han utilizado como materiales para la fabricación de microesferas que actúan como transportadores de fármacos que pueden ser liberados controladamente (Dinjaski & Prieto, 2015; Masaeli *et al.*, 2014; Murueva *et al.*, 2013).

### **1.3.2. Aplicaciones industriales**

El impacto negativo que genera la disposición de plásticos no biodegradables en el medioambiente ha motivado la utilización de materiales biodegradables como el PLA, la PCL y los PHAs en el sector de envoltorios de alimentos (Rhim *et al.*, 2013). Particularmente, el P(3HB) y P(3HB-co-3HV) poseen propiedades físicas y mecánicas semejantes a los polímeros en base a petróleo empleados para estos fines. A su vez, la incorporación de aditivos como la celulosa, lignocelulosa y arcillas orgánicas a matrices del copolímero P(3HB-co-3HV) provocan mejoras en el material para envoltorios de alimentos (Fabra *et al.*, 2014; Sanchez-García *et al.*; 2010). A pesar de los mayores costos de producción de los PHAs en relación a los plásticos petroquímicos, el creciente interés por la producción de PHAs a partir de residuos orgánicos ha comenzado a posicionar a estos biopolímeros como uno de los principales en el sector de envases (Bugnicourt *et al.*, 2014; Reddy *et al.*, 2013).

Los PHAs también pueden emplearse como biocombustibles a partir de la esterificación de sus monómeros para la formación de, por ejemplo 3-hidroxibutirato metil ester (3HBME) y 3-hidroxialacanoatos metil ester (3HAMEs) (Zhang *et al.*, 2009). Estos ésteres de PHAs que poseen calores de combustión entre 20 y 30 kJ/g pueden ser utilizados directamente como biocombustibles o incluso usados como aditivos de otros combustibles. Recientemente, el poli(3-hidroxipropionato) (P(3HP)) surge como un prometedor candidato a ser tenido en cuenta como biocombustible debido a su elevada

capacidad calorífica. A su vez, ya que no se conoce ningún microorganismo con la capacidad de producir este biopolímero, se ha recurrido a la ingeniería metabólica en organismos recombinantes para la producción de P(3HP) a través de diferentes rutas (Hanko *et al.*, 2017).

Otras aplicaciones surgen de los estudios realizados por Chen & Wu (2005), quienes reportan que los oligómeros de PHA, como el oligo-3-hidroxi butirato (O3HB) (componente celular involucrado en funciones fisiológicas de bacterias), pueden ser utilizados como aditivos de alimentos para animales.

Por último, ciertas propiedades que presentan los PHAs pueden originar su utilización en diferentes áreas. La naturaleza hidrofóbica de los PHAs puede ser utilizada para desarrollar materiales adsorbentes de tinturas que pueden encontrarse en los efluentes de las industrias textiles (Sridewi *et al.*, 2011; Sudesh *et al.*, 2011). Asimismo, Sudesh *et al.* (2007) reportaron que el rendimiento de películas de P(3HB), P(3HB-co-3HV) y poli(3-hidroxi butirato-co-hexanoato) (P(3HB-co-HHx)) para la absorción y retención de aceites es similar a películas en base a PP, lo que posibilita la aplicación de este biomaterial para la fabricación de paños para la limpieza de cosméticos faciales, papeles secantes de aceites en frituras o incluso la absorción de aceites residuales presentes en efluentes líquidos.

#### **1.4. Producción industrial y comercialización de PHAs**

Los PHAs han sido comercialmente producidos desde 1980 basados en predicciones de aumento de precio del petróleo debido a su agotamiento (Dietrich *et al.*, 2017). Los avances científicos de esa época llevaron a la producción en gran escala de biopolímeros como el P(3HB) por Chemie Linz AG, en Austria; el copolímero P(3HB-co-HV) por Imperial Chemical Industries, en el Reino Unido y P(3HB-co-HHx) por Procter & Gamble, en Estados Unidos.

Sin embargo, el precio del petróleo no tuvo un incremento significativo en los siguientes veinte años, lo que resultó en el cierre de algunas compañías y la finalización de numerosos proyectos relacionados con PHAs a nivel mundial (Chen, 2009). Inmediatamente después de 2001, el precio del petróleo comenzó a subir significativamente alcanzando valores por encima de los 100

dólares por barril durante 2003 (Chen, 2010). Desde ese momento, existió un gran impulso para fomentar el desarrollo de plásticos no basados en petróleo, lo que condujo a la puesta en marcha de nuevas plantas en China, Estados Unidos, Italia y Brasil (Bugnicourt *et al.*, 2014).

Biomer, una compañía radicada en Alemania desde 1990, adquirió la tecnología de producción de PHB de Chimie Linz. Esta compañía ha operado hasta el presente con una escala de producción de 1.000 t/año, empleando *Alcaligenes latus* como microorganismo productor a partir de un medio mineral con sacarosa como fuente de carbono (Philip *et al.*, 2007).

En Brasil, la producción industrial de PHA ha sido integrada a molinos de caña de azúcar ya existentes (Koller *et al.*, 2011; Nonato *et al.*, 2001). La empresa Copersucar junto con dos institutos de investigación, IPT (Instituto de Pesquisas Tecnológicas, San Pablo) e ICB (Instituto de Ciências Biomédicas, San Pablo), pusieron en marcha la planta piloto inicial, con financiamiento estatal, en 1991. En el proceso, el bagazo hidrolizado y la sacarosa purificada se utilizan como fuente de carbono para la producción simultánea de P(3HB), etanol y melazas. Los alcoholes obtenidos como productos secundarios (butanol, pentanol, etc.) de la fermentación del bioetanol son empleados como solventes para la extracción de PHA. Asimismo, la combustión del bagazo de caña de azúcar suministra la energía total requerida por la planta. La exitosa operación de la planta piloto llevó a la creación de PHB Industrial S.A. que actualmente produce 100 t/año usando el 17 % de los azúcares producidos en la molienda de la caña (Dietrich *et al.*, 2017).

Tianjin Green Biosciences, que comenzó a operar en 2004 en China, ha escalado gradualmente su proceso de biosíntesis desde un biorreactor de 30 L a 8 de 150.000 L, lo cual requirió un diseño detallado para superar la limitación de la transferencia de oxígeno (Tianjin GreenBio Materials, 2018). Actualmente asociado con la empresa holandesa DSM, poseen una producción de 10.000 t/año de poli(3-hidroxi butirato-co-4-hidroxi butirato) (P(3HB-co-4HB)) mediante una cepa recombinante de *Escherichia coli* empleando glucosa y 1,4-butanodiol como fuente de carbono (Mozejko-Ciesielska & Kiewisz, 2016).

Bio-on se pone en marcha en 2007 en Bolonia (Italia), con el objetivo de suministrar los materiales necesarios para el desarrollo de los sectores agroalimentario, de cosmética y farmacéutico, empleando fuentes 100 % renovables. Bio-on, a través de la marca MINERV-PHA™, opera en todo el mundo, principalmente utilizando residuos de la industria de la remolacha azucarera, materia prima que predomina en la zona, alcanzando una producción de 10.000 t/año de PHAs (Bio-on, 2018).

En 2009, la empresa ADM (Archer Daniels Midland, Estados Unidos) junto con Metabolix (Estados Unidos) inauguran la mayor planta de producción de PHAs con una capacidad de 50.000 t/año. En una planta de molienda húmeda de maíz perteneciente a ADM, adyacente al complejo destinado al crecimiento microbiano, se separa la materia prima en granos, almidones y azúcares. Luego, la corriente de azúcar se emplea como fuente de carbono para la biosíntesis de PHA (DiGregorio, 2009).

En la Tabla 1.1 se resumen las principales compañías productoras de PHAs del mundo junto con la escala de producción anual y las aplicaciones del biopolímero producido.

**Tabla 1.1.** Empresas productoras de PHAs en el mundo.

Compañía	Período	Producción (t/año)	PHA	Aplicaciones
BTF, Austria	1980s	20-100	P(3HB)	Envoltorios y suministro de medicamentos
Chemie Linz AG, Austria	1980s	20-100	P(3HB)	Envoltorios y suministro de medicamentos
Biomer, Alemania	1990s al presente	1.000	P(3HB)	Envoltorios y suministro de medicamentos
BASF, Alemania	1980s a 2005	Escala piloto	P(3HB), P(3HB-co-3HV)	Mezcla con Ecoflex
Imperial Chemical	1980s a 1990s	300	P(3HB-co-3HV)	Envoltorios

Industries, Reino Unido					
Bio-on, Italia	2008 al presente	10.000	PHAs	Materias primas	
Metabolix, Estados Unidos	1980s al presente	50.000	Diversos PHAs	Envoltorios	
Tepha, Inc., Estados Unidos	1990s al presente	desconocido	Diversos PHAs	Implantes biomédicos	
Archer Daniels Midland (ADM con Metabolix), Estados Unidos	2005 al presente	50.000	Diversos	Material primas	
Procter & Gamble (P&G), Estados Unidos	1980s al 2005	Manufactura por contrato	P(3HB-co-HHx)	Envoltorios	
Monsanto, Estados Unidos	1990s	Desconocido	P(3HB), P(3HV)	Materias primas	
MHG, Estados Unidos	2007 al presente	10.000	Diversos PHAs	Materias primas	
Biocycles, Brasil	1990s al presente	100	P(3HB)	Materias primas	
Kaneka (con P&G), Japón	1990s al presente	1.000	P(3HB-co-HHx)	Envoltorios	
Mitsubishi, Japón	1990s	10	P(3HB)	Envoltorios	
Zhejiang Tian An, China	1990s al presente	10.000	P(3HB-co-3HV)	Materias primas	
Tianjin Green Bioscience (con DSM), China	2004 al presente	10.000	P(3HB-co-4HB)	Materias primas y envoltorios	
Jiangsu Nantian, China	1990s al presente	Escala piloto	P(3HB), P(3HB-co-HHx)	Materias primas	
Jiangmen Center for Biotech, China	1990s	Desconocido	P(3HB-co-HHx)	Materias primas	
Shantou Lianyi	1990s al	Escala piloto	Diversos	Envoltorios y	

Biotech, China	2005		PHAs	medicina
Shenzhen O'Bioer, China	2004 al presente	Desconocido	Diversos PHAs	Desconocido
Yikeman, Shandong, China	2008 al presente	3.000	P(3HB-co-4HB)	Materias primas
Shandong Lukang Pharmaceutical, China	2005 al presente	Escala piloto	Diversos PHAs	Materias primas y medicina
Shijiazhuang Pharmaceutical Group, China	2005 al presente	Desconocido	Desconocido	Desconocido

---

### 1.5. Producción de PHAs a partir del concepto de biorrefinerías integradas

Las biorrefinerías son instalaciones de procesamiento donde la biomasa se transforma en productos de alto valor agregado como biocombustibles, bioquímicos, bioenergía y biomateriales (Gnansounou, 2018). Este concepto es análogo a la refinería comúnmente conocida, la cual produce múltiples combustibles y productos a partir del petróleo (Cherubini, 2010). Diversos investigadores clasifican a las biorrefinerías en base al tipo de materia prima que utilizan. Es así que las biorrefinerías de primera generación son aquellas que obtienen sus productos a partir de aceites o azúcares comestibles provenientes de plantas como maíz, caña de azúcar girasol o soja, mientras que las de segunda generación emplean materias primas no aprovechables para alimentación humana, como residuos forestales y agrícolas con elevado contenido de celulosa y lignina (Dutta *et al.*, 2014). Por su parte, las biorrefinerías de tercera generación son aquellas que utilizan microorganismos, los cuales aumentan su biomasa a partir de energía solar y CO<sub>2</sub>. Por último, las de cuarta generación son muy similares a las de tercera generación, con la diferencia que se emplean organismos genéticamente modificados para la producción de biocombustibles, aceites y otros productos de valor agregado (Ramos *et al.*, 2016).

Uno de los biomateriales que pueden ser producidos bajo el concepto de biorrefinería es el PHA, que ha recibido especial interés tanto en el campo de la investigación como en la industria, debido a que posee una amplia versatilidad en sus propiedades. Sin embargo, el mayor inconveniente que presenta la utilización de los PHAs es el elevado costo de producción (Mozejko-Ciesielska & Kiewisz, 2016). Por este motivo, diversos autores proponen mejorar el rendimiento económico de este tipo de procesos mediante la idea de biorrefinerías integradas (Dietrich *et al.*, 2019; Dahiya *et al.*, 2018; Cardona Alzate *et al.*, 2018; El-Halwagi, 2017a; Dietrich *et al.*, 2017; García Prieto *et al.*, 2017; Jiang *et al.*, 2016; Koutinas *et al.*, 2014; Bao *et al.*, 2011; Singh & Gu, 2010.). En esta clase de estructuras productivas se busca integrar diversas tecnologías para la conversión de distintos tipos de biomasa, con el objetivo de generar múltiples productos que contribuyan a hacer más rentable el proceso global (Ng *et al.*, 2017).

En este sentido, surge la posibilidad de diseñar y optimizar biorrefinerías integradas basándose en un enfoque de Ingeniería en Sistemas de Procesos. En efecto, en la literatura se pueden encontrar diversos casos donde se aplican las herramientas de la Ingeniería en Sistemas de Procesos para diseñar biorrefinerías e integrarlas a otros tipos de plantas de procesamiento. Es el caso de Kasivisvanathan *et al.* (2012), quienes presentan un enfoque sistemático para la adaptación de una planta existente de aceite de palma a una biorrefinería integrada considerando aspectos económicos y medioambientales. Asimismo, Martín & Grossmann (2014a) optimizan un proceso en el cual se integra el uso de glicerol para producir etanol vía fermentación dentro de una planta de producción de biocombustibles a partir de algas. Kokossis *et al.* (2015) describen un enfoque sistemático dirigido al diseño de biorrefinerías integradas que pueden hallarse en la práctica. Por último, en el trabajo de Jin *et al.* (2018) se pueden encontrar numerosos casos donde se integran los residuos del procesamiento de plantas de maíz, arroz y oliva, entre otros, para darle un valor agregado a través del concepto de biorrefinería integrada.

## 1.6. Objetivos de la tesis

El trabajo desarrollado en esta tesis responde a los siguientes objetivos.

### 1.6.1. Objetivo general

Diseño y optimización de procesos destinados a la síntesis de bioproductos de alto valor agregado, en particular poli(hidroxialcanoato)s, mediante estudios experimentales y aplicación de técnicas de programación matemática.

### 1.6.2. Objetivos específicos

- Obtención de los parámetros cinéticos de crecimiento de *Bacillus megaterium* BBST4 para la biosíntesis de PHAs empleando glicerol como fuente de carbono.
- Análisis y caracterización físico-química de los biopolímeros obtenidos en el proceso de producción microbiano.
- Desarrollo de modelos matemáticos para la cinética de crecimiento y producción de PHAs. Calibración y validación de los modelos frente a datos experimentales obtenidos en distintas condiciones de trabajo.
- Desarrollo de modelos y optimización de biorrefinerías para la producción de biopolímeros.
- Modelado y optimización de biorrefinerías integradas para la producción simultánea de biocombustibles, bioenergía y bioproductos.

## 1.7. Estructura de la tesis

La presente tesis se encuentra estructurada en siete capítulos según se detalla a continuación.

En el Capítulo 1 se presenta una introducción al tema de los biopolímeros, donde se enuncian las principales propiedades y aplicaciones de los PHAs junto con la potencialidad que brinda su inclusión dentro del concepto de biorrefinería integrada.

En el Capítulo 2 se describe el trabajo experimental realizado durante una estadía en la Universidad Federal de Río de Janeiro (Brasil), donde se estudió



el crecimiento y la producción de PHAs a partir de *B. megaterium* BBST4 a escala laboratorio.

En el Capítulo 3 se presenta la caracterización y el análisis de las propiedades físicas y estructurales del biopolímero mediante la etapa experimental mencionada previamente.

En el Capítulo 4 se propone un modelo cinético de crecimiento y producción de PHA a partir de *B. megaterium* BBST4. Asimismo se realiza una estimación dinámica de parámetros frente a los datos experimentales obtenidos.

En el Capítulo 5 se presenta un problema de programación matemática mixto entero no lineal (MINLP) para el diseño óptimo de un proceso de producción de PHA, donde se incluyen ecuaciones detalladas de diseño para la maximización de objetivos económicos.

En el Capítulo 6, en un marco de optimización, se formula el modelo de una biorrefinería integrada como un problema MINLP donde se considera la producción simultánea de biodiesel, PHA y bioenergía.

En el Capítulo 7 se presentan las conclusiones finales y se discute el trabajo futuro que se desprende de esta tesis.



## CAPÍTULO 2

### PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA Y EXTRACCIÓN DE PHA

#### 2.1. Introducción

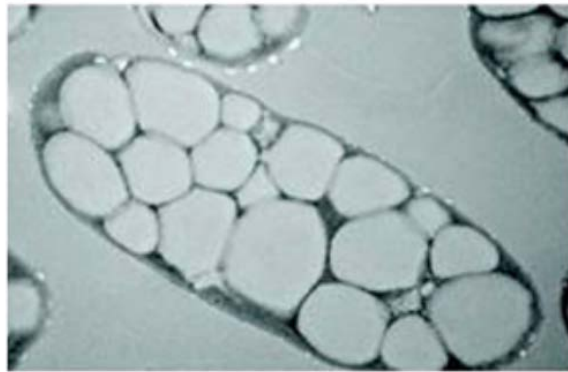
Los materiales plásticos cada vez son más utilizados en el ámbito doméstico e industrial, asociándose con el desarrollo de un estilo de vida más confortable. En el año 2013, su producción mundial alcanzó aproximadamente los 300 millones de toneladas siendo el 98 % producido en base a combustibles fósiles (Mozejko-Ciesielska & Kiewisz, 2016). En 2015, la producción alcanzó los 322 millones de toneladas y se espera una tendencia creciente del 1,5 % por año según un reporte de PlasticsEurope (PlasticsEurope, 2016).

El principal inconveniente con los materiales poliméricos a base de combustibles fósiles es que se encuentran limitados por la eventual escasez del petróleo como así también el aumento de su precio (Anjum *et al.*, 2016). Por otra parte, la explotación del petróleo para abastecer la existente demanda de materiales plásticos representa una preocupación medioambiental mediante el calentamiento global, riesgos para la salud humana y contaminación de los ecosistemas (Rodríguez-Perez *et al.*, 2018).

Una posible alternativa que puede contribuir a la reducción del uso de combustibles fósiles para la producción de materiales son los biopolímeros (Mohapatra *et al.*, 2017a). Estos polímeros orgánicos naturales son materiales que se encuentran en la naturaleza o se pueden producir a partir de fuentes renovables o corrientes de desecho. Asimismo, debido a su biodegradabilidad, pueden disminuir el impacto ambiental generado de la disposición final de los plásticos convencionales (Pittmann & Steinmetz, 2016).

Los poli(hidroxicanoato)s (PHAs) son materiales que pueden ser sintetizados completamente *in vivo* (Razza *et al.*, 2018; Tan *et al.*, 2017). Estos biopolímeros naturales, no tóxicos, completamente biodegradables son poliésteres hidrofóbicos cuyas propiedades físicas y térmicas resultan similares a los termoplásticos sintéticos (Mannina *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2017). Los PHAs son producidos intracelularmente por numerosos microorganismos

procariotas como inclusiones para almacenamiento de energía de forma granular como se observa en la Figura 2.1 (Kushwah *et al.*, 2016).



**Figura 2.1.** Célula productora de biopolímeros completa de gránulos blancos de PHA.  
Fuente: Gao *et al.* (2011).

Desde el descubrimiento del poli(3-hidroxiбутирато) por parte del científico francés Lemoigne en 1925 (Chee *et al.*, 2010), se han reportado cerca de 300 bacterias diferentes capaces de acumular diversos PHAs (Kosseva & Rusbandi, 2017; Muhammadi *et al.*, 2015). Habitualmente, estos microorganismos se clasifican en Gram negativos y Gram positivos. Los primeros, contienen lipopolisacáridos (LPS) como parte integral de su membrana exterior, los cuales resultan pirogénicos y su concentración en productos médicos se encuentra estrictamente regulada (Furrer *et al.*, 2007). Por otra parte, los Gram positivos, no poseen LPS en su estructura celular y, por lo tanto, se consideran potencialmente mejores productores de PHAs para ser empleados en aplicaciones biomédicas (Valappil *et al.*, 2007a). Dado que estos últimos tienen la particularidad de ingresar en un estado de latencia bajo ciertas condiciones específicas del medio, los microorganismos Gram negativos han sido los más utilizados a escala industrial como productores de biopolímeros (Porrás *et al.*, 2019).

En relación con los sustratos comúnmente empleados para la producción industrial de PHAs, se pueden mencionar los azúcares puros, los ácidos grasos o los aceites nobles. Sin embargo, su utilización puede implicar alrededor del 50 % del costo de producción (Pérez-Arauz *et al.*, 2019; Koller *et al.*, 2017), lo que convierte a este proceso productivo, como no competitivo en términos de costos cuando se lo compara con la mayoría de los plásticos convencionales

(Guerra-Blanco *et al.*, 2018). Por este motivo, en la actualidad, los investigadores han concentrado sus esfuerzos en la búsqueda de sustratos económicos y ricos en carbono que permitan volver atractiva económicamente la producción de PHAs.

En este sentido, el glicerol, principal subproducto de la industria del biodiesel, se muestra como una potencial fuente de carbono que puede ser utilizada para la biosíntesis de biopolímeros. Debido a que este subproducto representa el 10 % de la producción de biodiesel en el mundo (Burniol-Figols *et al.*, 2018), los significativos volúmenes generados cada año impactaron en el mercado del glicerol, derivando en la disminución drástica de su precio de venta (Luo *et al.*, 2016). Por lo tanto, un modo de agregar valor al glicerol y contribuir positivamente en la reducción del costo de producción de biomateriales, es emplearlo como sustrato en la biosíntesis de PHAs.

En este sentido, teniendo en cuenta las potenciales aplicaciones de los polímeros biosintetizados mediante bacterias Gram positivas y el contexto actual mundial de los biocombustibles, se plantea como objetivo de este capítulo, realizar un aporte al estudio de la producción de PHAs mediante *Bacillus megaterium* empleando glicerol como fuente de carbono. Si bien existen trabajos previos utilizando la misma cepa y fuente de carbono, debido a que un objetivo de esta tesis es el modelo matemático que represente la cinética de crecimiento y producción de PHA de este microorganismo (Capítulo 4), resulta de suma importancia contar con datos experimentales (biomasa, producto, fuente de carbono, nitrógeno y fósforo) de las principales variables del sistema en función del tiempo.

Por lo tanto, en el presente capítulo se exhiben los resultados experimentales obtenidos a partir del cultivo de *Bacillus megaterium* BBST4 en Erlenmeyers soportados sobre un agitador orbital y biorreactores con agitación. Se empleó glicerol como fuente de carbono para el crecimiento celular y la acumulación del biopolímero. A los diferentes cultivos se realizó un seguimiento del crecimiento de la biomasa mediante densidad óptica y peso seco, de la acumulación de polímero por cromatografía gaseosa y de las concentraciones de sustratos presentes en el medio utilizando cromatografía líquida de alto

desempeño (HPLC). De modo similar, se tomaron mediciones en línea del pH y oxígeno disuelto para los experimentos efectuados en biorreactores. Las metodologías empleadas para la medición de las variables a lo largo del tiempo del proceso se detallan y discuten a lo largo de este capítulo junto con los resultados obtenidos de la extracción del polímero acumulado intracelularmente; mientras que la caracterización del PHA obtenido se presenta en el capítulo siguiente.

## **2.2. Materiales y métodos**

### **2.2.1. Microorganismo**

La cepa bacteriana productora de PHA utilizada en el presente capítulo fue aislada de los sedimentos del estuario de Bahía Blanca (38° 45' y 39° 40' de latitud sur y 61° 45' y 62° 20' de longitud oeste) en un trabajo previo del grupo de investigación (López *et al.*, 2012). Se denominó BBST4 y luego de un análisis de secuenciación de regiones variables de RNA ribosomal 16S, se logró identificar como una cepa *Bacillus megaterium* (número de acceso a la base de datos GenBank: HM119600.1).

### **2.2.2. Reactivación del microorganismo**

Debido a que la bacteria se encontraba liofilizada al momento de iniciar los experimentos, se requirió un proceso de reactivación de la misma. Para tal fin, se empleó un medio rico líquido preparado a partir de peptona de caseína y harina de soja, denominado Caldo CASO (Merck, Alemania), con la siguiente composición: 17 g/L peptona de caseína, 3 g/L peptona de harina de soja, 2,5 g/L D(+)-glucosa, 5 g/L cloruro sódico y 2,5 g/L hidrogenofosfato dipotásico. Se disolvieron 30 g de Caldo CASO en 1 L de agua Milli-Q (agua ultra pura) y se esterilizó en autoclave durante 15 min a 121 °C.

Por otra parte, se preparó un medio sólido denominado CASO Agar (Fluka Analytical, Alemania) en cajas de Petri con la siguiente composición: 15 g/L peptona de caseína, 5 g/L peptona de soja, 5 g/L cloruro de sodio y 15 g/L agar. Se disuelven 40 g de CASO Agar en 1 L de agua Milli-Q y se esterilizó en autoclave durante 15 min a 121 °C.

El microorganismo liofilizado se incorporó junto con 100 mL del medio nutritivo líquido a un Erlenmeyer de 500 mL de volumen y se incubó en un agitador-incubador (New Brunswick Scientific, Excella E24, Estados Unidos) durante 22 h a 200 rpm y 30 °C. Luego, se realizó un extendido de una alícuota del cultivo reactivado en cajas de Petri con el medio sólido para observar la formación de colonias.

### **2.2.3. Determinación del microorganismo por tinción de Gram**

Con el objetivo de confirmar que la cepa reactivada mediante el medio de cultivo rico en nutrientes se trata de la requerida para realizar los ensayos biotecnológicos se aplicó el método de tinción Gram. Para ello, se extrajo una muestra bacteriana reactivada del medio de cultivo y se realizó un extendido sobre portaobjetos. Las células se dejaron secar a temperatura ambiente y se fijaron flameando la muestra con la ayuda de un mechero. A continuación, se agregó cristal violeta y se esperó aproximadamente un minuto para que el colorante penetre a través de la pared celular del microorganismo. Luego de un enjuague con agua, se agregó lugol para que durante un minuto actúe en la muestra y colabore a que el cristal violeta se fije con mayor intensidad en la pared de la bacteria. A continuación, se añadió una mezcla de alcohol y acetona, la cual actuó durante 30 s la cual se utiliza para decolorar en el caso de tener microorganismos Gram negativos. Finalmente, se realizó una tinción de contraste con safranina durante un minuto y luego se lavó en agua. Esto último brindará un color rojizo a las células que sean Gram negativas mientras que las Gram positivas se verán a microscopio en un color azul-violáceo.

Luego de la formación de colonias típicas de *Bacillus* sp. y la observación del microorganismo a través del microscopio, se almacenaron en un ultrafreezer, criotubos de la cepa en glicerol al 20 % en peso que serán utilizados en los experimentos de producción de PHA.

### **2.2.4. Medio de cultivo**

La composición del medio de cultivo para las diferentes experiencias realizadas empleando glicerol como fuente de carbono fue propuesta en la tesis de Ferreira (2013), la misma se detalla a continuación: 3 g/L urea, 0,2 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 3,56 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,05 g/L FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,01

g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g/L ácido cítrico y 1 mL de una solución de microelementos por cada litro de medio de cultivo preparado, con la siguiente composición: 0,3 g/L  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0,2 g/L  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,03 g/L  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,03 g/L  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,03 g/L  $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,028 g/L  $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y 0,01 g/L  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . La solución de microelementos se autoclavó separadamente y luego se añadió al medio mineral previo a la inoculación. Todas las soluciones se prepararon con agua Milli-Q. Cabe mencionar que todos los elementos necesarios para la biosíntesis de PHA se esterilizaron en un autoclave durante 15 min a 121 °C con la excepción del glicerol y la urea para evitar cualquier tipo de degradación. Estos sustratos se esterilizaron mediante filtración a través de una membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  de poro (Merck-Millipore, Brasil).

Para los experimentos en Erlenmeyer y biorreactor, la inoculación se llevó a cabo en un Erlenmeyer de 500 mL de capacidad empleando 100 mL de medio de cultivo con 20 g/L de glicerol como fuente de carbono. Se incubó a 33 °C (Naranjo *et al.*, 2013) y 250 rpm en un agitador-incubador (New Brunswick Scientific, Excella E24, Estados Unidos) durante 24 h.

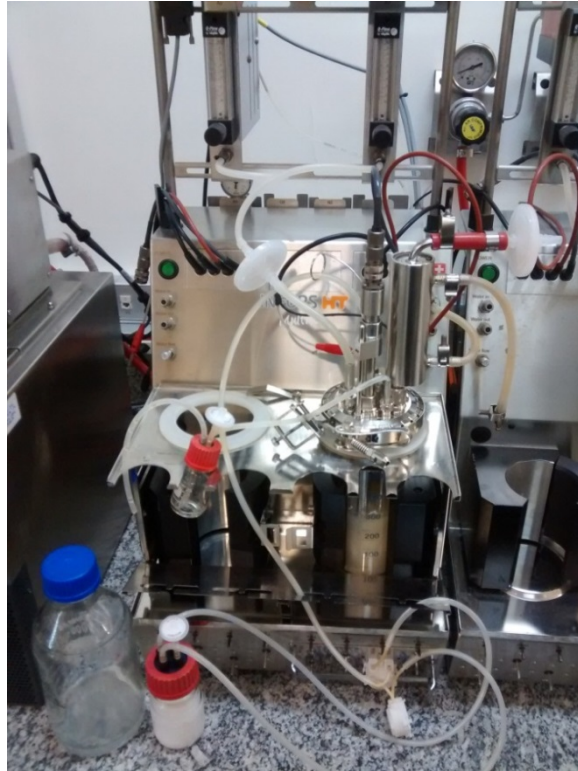
### **2.2.5. Cultivo en Erlenmeyer**

Los experimentos se realizaron utilizando 20 mL de inóculo y 380 mL del medio mineral descrito previamente en Erlenmeyers de 1 L de capacidad cerrados con tapones de algodón. De esta manera, los frascos se mantienen a un 40 % de su capacidad total con el fin de asegurar aireación constante a lo largo de todo el proceso de cultivo (Gambetta, 2006). Los cultivos en Erlenmeyer se incubaron en las mismas condiciones de temperatura y agitación que el inóculo (33 °C y 250 rpm, respectivamente) en un agitador-incubador (New Brunswick Scientific, Excella E24, Estados Unidos) durante aproximadamente 30 h. Todos los elementos utilizados en el experimento se esterilizaron en un autoclave durante 15 min a 121 °C. Las mediciones de las variables se realizaron por duplicado.



### 2.2.6. Cultivo en biorreactor

Para la realización de los cultivos en una escala mayor se utilizaron biorreactores (Multifors, Infors HT, Suiza) de 750 mL y 2,5 L de capacidad total como se muestran en la Figura 2.2 y Figura 2.3.



**Figura 2.2.** Biorreactor Multifors de 750 mL.



**Figura 2.3.** Biorreactor Multifors de 2,5 L.

Los mismos consisten en vasos de vidrio acoplados a un sistema de control digital integrado lo cual permite el control de algunas variables del proceso como la temperatura, la agitación, el pH, la cantidad de oxígeno disuelto y la eventual espuma formada debido a la agitación del medio. Este sistema también permite estipular una aeración determinada, sin embargo esta no puede ser controlada automáticamente, sino que debe realizarse manualmente mediante la apertura o cierre de una válvula que permite el ingreso de aire al biorreactor.

La temperatura se controla a través de una camisa que envuelve el recipiente. El aire, proveniente de una línea de aire comprimido, se filtra por una membrana de politetrafluoroetileno para evitar la contaminación del medio de cultivo. En ninguna de las experiencias se reguló el pH del medio lo cual podría llevar a la obtención de mayores productividades (Luvizetto Faccin *et al.*, 2012; Luvizetto Faccin *et al.*, 2009).

El procedimiento de esterilización consiste básicamente en autoclavar todo el sistema completo (frascos, condensador, filtros de aire, mangueras y sensores) a 121 °C durante 15 min, manteniéndolo aislado del medio externo hasta el inicio de la experiencia.

Para todos los experimentos en biorreactor se realizó la calibración del electrodo de pH previamente a la esterilización colocándolo durante 6 h en el medio mineral preparado. Por otra parte, la calibración del electrodo de oxígeno disuelto se efectuó posteriormente a la esterilización y adición de la solución concentrada del medio mineral en los frascos. Dicha calibración se realizó con aire hasta lograr saturar el medio de cultivo.

Para las experiencias llevadas a cabo en el biorreactor de 750 mL se preparó un preinóculo colocando el contenido de un criotubo de 1 mL y 100 mL de medio mineral en un Erlenmeyer de 500 mL el cual se cultivó en el agitador a 33 °C y 250 rpm durante 24 h para la adaptación del metabolismo del microorganismo al medio. Luego, se realizó una segunda adaptación de la bacteria. Para ello, se toman dos muestras de 20 mL del cultivo del Erlenmeyer de 500 mL y se trasvasan separadamente a un Erlenmeyer de 1 L con 380 mL de medio mineral cada uno. Finalmente, luego de transcurridas 24 h de agitación

a 250 rpm y 33 °C, se toma una muestra de 20 mL del cultivo con mejor crecimiento y se coloca en el biorreactor junto con 380 mL del medio mínimo. El proceso de biosíntesis de PHA se lleva a cabo durante aproximadamente 25 h a 33 °C. La concentración de oxígeno disuelta se controló manteniendo un nivel de saturación del 80 % (Naranjo *et al.*, 2013) el cual se reguló mediante agitación (entre 300 rpm y 1200 rpm) y un caudal de aire entre 0,1 L/min y 0,5 L/min. Las mediciones de las variables se realizaron por duplicado.

### **2.2.7. Preparación de las muestras**

Para realizar las diferentes determinaciones de biomasa, consumo de sustrato y producción de PHB se tomaron muestras de 10 mL tanto de los Erlenmeyer como de los biorreactores. Una vez extraídas las muestras, se midieron rápidamente en un espectrofotómetro (Agilent 8453 UV-vis, Agilent Technologies, Alemania) a 600 nm. Luego, se centrifugaron a 9.500 rpm durante 10 min en una centrífuga (Sorvall Legend XT Centrifuge, ThermoFisher Scientific, Estados Unidos). El sobrenadante se almacenó en tubos y se refrigeró para el posterior análisis de las variables de interés. Por su parte, el material celular remanente se lavó con agua ultrapura y se centrifugó nuevamente. Este procedimiento se lleva a cabo tres veces. Las células se colocaron en una estufa de vacío con una temperatura de 80 °C para la remoción de toda el agua y posterior análisis del biopolímero.

### **2.2.8. Métodos analíticos**

#### **2.2.8.1. Determinación de la biomasa**

La concentración celular se obtuvo por medidas gravimétricas de peso seco y por densidad óptica. Las mediciones gravimétricas se llevaron a cabo con las muestras extraídas del cultivo, posteriormente centrifugadas y secadas en estufa a 80 °C hasta alcanzar peso constante. Por otro lado, se midió la densidad óptica mediante lecturas de absorbancia a una longitud de onda de 600 nm. Para ello, se mantuvo la muestra lo suficientemente diluida para que la lectura de absorbancia permanezca dentro de la región lineal de lectura (0,1 a 0,5 de absorbancia).

A partir del análisis de peso seco y absorbancia de una misma muestra, considerando el volumen de muestra extraído del medio de cultivo, es posible construir una curva de calibrado que permite correlacionar la densidad óptica con la concentración de la biomasa (ANEXO A).

#### **2.2.8.2. Determinación del biopolímero**

La cuantificación del biopolímero se llevó a cabo conforme a la metodología descrita por Braunegg *et al.* (1978) y posteriormente modificada por Riis & Mai (1988).

Se pesaron aproximadamente 40 mg de biomasa seca (o de 2 a 50 mg de PHB comercial en caso de realizar la curva de calibrado) y se incorporaron a un tubo sellado. Luego, se añadieron 2 mL de una solución de ácido clorhídrico en propanol (1 volumen de ácido clorhídrico y 4 volúmenes de 1-propanol), 2 mL de 1,2-dicloroetano y 200  $\mu\text{L}$  de ácido benzoico en propanol (40 g/L). Los tubos se cerraron con teflón para evitar cualquier pérdida por evaporación, se agitaron en vórtex y se colocaron en un baño a 100 °C por 3 h para que ocurra la reacción de propanólisis. Durante los primeros 30 min se realizaron agitaciones adicionales de los tubos al menos una vez cada 5 min. Una vez transcurridas las 3 h, los tubos se retiraron del baño, se dejaron enfriar y se añadieron 4 mL de agua Milli-Q para reducir las impurezas de la fase orgánica. Los tubos se centrifugaron durante 3 min a 13.000 rpm en una centrífuga (Sorvall legend micro 21r centrifuge, ThermoFisher Scientific, Estados Unidos) y luego se transfirió la fase orgánica, que queda en la parte inferior del tubo (debido a la densidad del 1,2-dicloroetano de 1,2 g/cm<sup>3</sup>), a un vial Eppendorf mediante filtrado a través de una membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  de poro. Una vez realizado esto, 1  $\mu\text{L}$  de la fase orgánica se analizó mediante un cromatógrafo gaseoso (Agilent 7890 A GC System, Agilent Technologies, Estados Unidos) equipado con una columna DB-5 (5 % fenil-metilsiloxano). Dicho análisis se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: gas de arrastre: Helio (0,8 mL/min); temperatura del inyector: 250 °C; temperatura del detector: 300 °C; sistema de detección: ionización de llama (FID); programa de temperatura del horno: 100 °C durante 1 minuto, aumento de la temperatura hasta 210 °C a 8 °C/min y 210 °C durante 15 minutos.

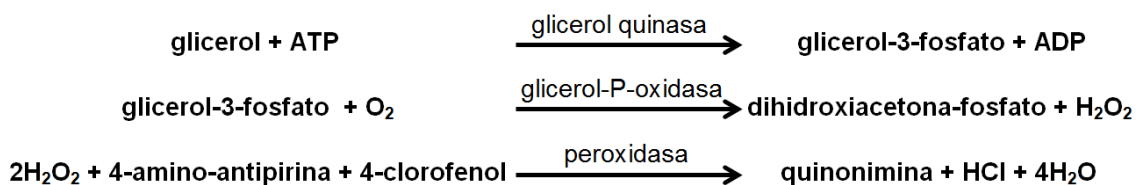
Por su parte, la curva de calibrado para la determinación del PHB presente en la biomasa celular se construyó a través de la relación de áreas obtenidas por cromatografía gaseosa del PHB y un estándar interno (ácido benzoico) con la correspondiente masa del polímero (ANEXO A).

### 2.2.8.3. Determinación de glicerol

La cuantificación de glicerol remanente en el medio de cultivo se determinó a partir de un kit enzimático (BioTécnica, Brasil) para la determinación de triglicéridos en medio acuoso.

En primer lugar, se combinan ambos reactivos del kit enzimático y se adiciona 1 mL de la mezcla resultante con 100  $\mu$ L de la muestra que se quiere cuantificar. A continuación, la solución obtenida se homogenizó e incubó durante 5 min en un baño de María a 37 °C. Finalmente, se retiró la muestra del baño y se realiza una medida de la absorbancia en el espectrofotómetro utilizando una longitud de onda de 505 nm.

El principio del método involucra en primera instancia a la enzima glicerol quinasa, la cual cataliza la fosforilación del glicerol libre por el ATP formando glicerol-3-fosfato que en presencia de oxígeno bajo la acción catalítica de la enzima glicerol-P-oxidasa, produce peróxido de hidrógeno. La enzima peroxidasa cataliza la oxidación del reactivo fenólico (4-clorofenol) por el peróxido de hidrógeno formado, en presencia de 4-amino-antipirina, produciendo un compuesto rosa (quinonimina), que presenta un máximo de absorción en 505 nm.



**Figura 2.4.** Reacciones involucradas en la cuantificación de glicerol.

Para la construcción de la curva de calibración del glicerol en el medio de cultivo relativo a un estándar, se aplicó la misma metodología descrita previamente. Como muestra estándar, se utilizó glicerol con una concentración de 5 g/L al que se le realizaron diluciones sucesivas y posteriormente se lo hizo

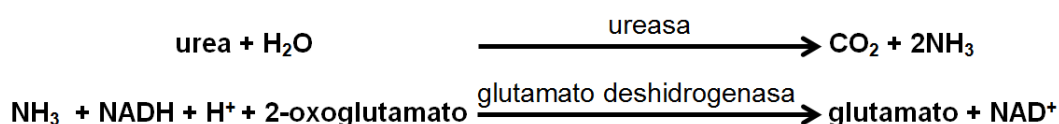
reaccionar con los reactivos del kit enzimático. La curva de calibrado para el glicerol se muestra en el ANEXO A.

#### 2.2.8.4. Determinación de urea

La urea no reaccionada se cuantificó empleando un kit enzimático (Doles, Brasil) para la determinación de urea en medio acuoso. El kit contiene dos reactivos: el reactivo 1 que posee 100 mmol/L de Tris, 5,6 mmol/L de 2-oxoglutamato, 140 U/mL de glutamato deshidrogenasa y 140 U/mL de ureasa y el reactivo 2 que contiene 1,5 mmol/L de NADH.

Los dos reactivos del kit enzimáticos deben mezclarse en una proporción 4/1 (reactivo 1/reactivo 2) en cantidades suficientes para el análisis. En tubos Eppendorf se coloca 1 mL del reactivo de trabajo (reactivo 1 y 2 en proporción 4/1) y se dejan en un baño termostatizado a 37 °C durante 5 min. Luego, se adicionan 50 µL de la muestra, se agita en un vórtex y se vuelve a dejar en el baño para que ocurra la reacción enzimática durante 60 s. Pasado el tiempo en el baño, la muestra se coloca en un espectrofotómetro y al momento que el cronómetro llega a 90 s, debe ser analizada utilizando una longitud de onda de 340 nm, obteniendo así una primera absorbancia. Se esperan 30 s más y se vuelve a analizar nuevamente la muestra en el espectrofotómetro con la misma longitud de onda, obteniéndose una segunda medida de absorbancia. Debido a que el análisis espectrofotométrico se efectúa en la región del ultravioleta, se recomienda utilizar cubetas de cuarzo, ya que este material es transparente a la radiación UV.

En resumen, en este método, la urea se hidroliza por la enzima ureasa liberando amoníaco y dióxido de carbono. Posteriormente, el amoníaco reacciona con 2-oxoglutamato y NADH catalizado por el glutamato deshidrogenasa para la formación de glutamato y oxidación de NADH a NAD<sup>+</sup>.



**Figura 2.5.** Reacciones involucradas en la cuantificación de urea.

La muestra estándar que se emplea para realizar la curva de calibrado de este método es urea con una concentración de 5 g/L, la cual se diluyó apropiadamente y se hizo reaccionar con el reactivo de trabajo.

Con las absorbancias obtenidas en el análisis de las muestras y el estándar, se realizó una curva de calibración para la cuantificación de la urea (ANEXO A), destacando que la disminución de la absorbancia en el tiempo transcurrido entre las mediciones, medida a 340 nm, es proporcional a la concentración de urea en la muestra.

#### **2.2.8.5. Determinación de fósforo**

La cuantificación de fósforo en el medio de cultivo se lleva a cabo siguiendo los pasos de la metodología descrita a continuación.

En primer lugar, se lava y se deja en remojo todo el material de vidrio (balones volumétricos, tubos de ensayos y probetas) con una solución de HCl al 10 % en peso durante al menos 12 h y luego se enjuaga con agua destilada.

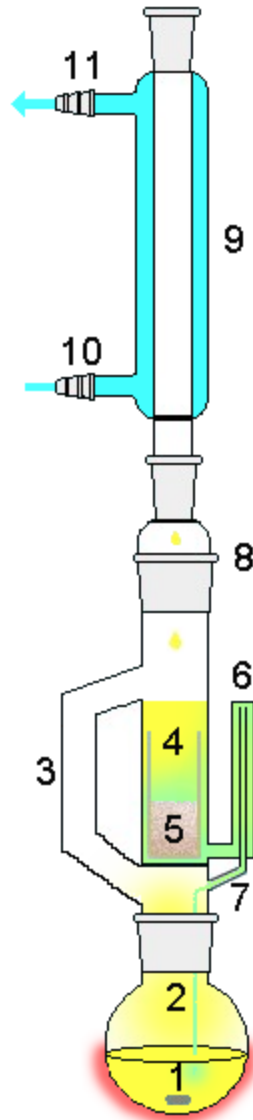
Mientras tanto, se deben preparar las soluciones que se utilizan en el ensayo cuantitativo: ácido sulfúrico 6 N, molibdato de amonio 2,5 % p/v, ácido ascórbico al 10 % p/v y ácido clorhídrico 0,05 N. Asimismo, se prepara una solución de 5 µg P/mL que se utiliza como estándar para armar la curva de calibrado, la misma se forma a partir de fosfato de sodio monobásico anhidro con HCl 0,05 N para su disolución. Por último, el reactivo colorimétrico de trabajo se obtiene mediante la adición de 1 volumen de los reactivos que se mencionan a continuación, con dos volúmenes de agua deionizada en cantidades suficientes para todas las muestras y patrones: ácido sulfúrico 6 N, molibdato de amonio al 2,5 % p/v y ácido ascórbico al 10 % p/v. Es importante destacar que el reactivo de trabajo no puede ser almacenado por más de dos horas.

Una vez transcurridas las 12 h correspondientes al lavado de todo el material de vidrio, se añadió 1 mL de cada muestra en un tubo de ensayo y a continuación se adicionó 1 mL del reactivo de trabajo, se agitó en vórtex, se cubrió cada tubo con papel film y se dejó en estufa a 37 °C durante 1 h. Finalmente, se lleva a cabo el análisis en el espectrofotómetro a 820 nm

Con las absorbancias obtenidas en los análisis de los estándares, se puede generar una curva de calibrado para la cuantificación de fósforo la cual se presenta en el ANEXO A.

### 2.2.9. Extracción del biopolímero

En la Figura 2.6 se puede observar un esquema del equipo de extracción empleado para realizar la extracción del PHA.



**Figura 2.6.** Esquema del extractor Soxhlet. Fuente: wikipedia.org

Las células liofilizadas se pesan y se colocan en un envoltorio sellado (5) el cual puede fabricarse a partir de una hoja de papel y se coloca en el cartucho Soxhlet (4) el cual se llena con cloroformo por debajo de la línea que forma la



entrada del sifón (6). Asimismo, se añade al balón (2) que se encuentra instalado sobre una manta calefactora (1), la cantidad necesaria de cloroformo. Una vez alcanzada la temperatura de ebullición del solvente, éste ascenderá por el brazo de ascenso (3) hasta el condensador (9) que se encuentra en la parte superior conectado al cartucho Soxhlet por un adaptador (8). Debido a la circulación de agua en el condensador, la cual ingresa al sistema por (10) y sale por (11), el vapor se encuentra con una temperatura tal que produce su condensación y éste desciende hasta el cartucho. Una vez que se supera el nivel de la entrada del sifón, el líquido comenzará a descender nuevamente al balón por el tubo de descarga del sifón (7) como se muestra en la Figura 2.6.

El PHA contenido en las células se extrae mediante el procedimiento de cloroformo en ebullición descrito durante 48 h consecutivas. El biopolímero depositado en el balón junto con el solvente se transvasa a un recipiente con mayor área superficial con el objetivo de permitir la evaporación total del cloroformo y obtener el biopolímero.

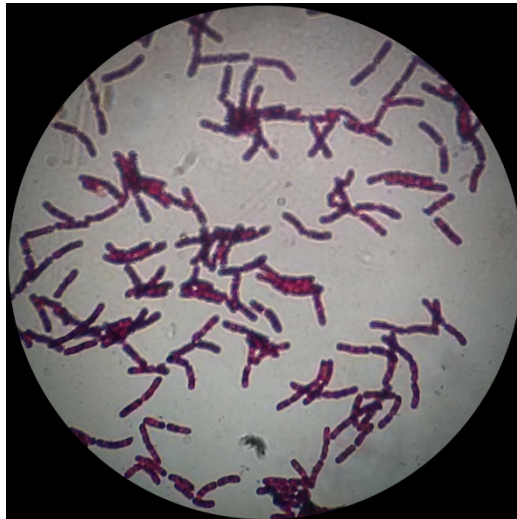
## **2.3. Resultados y discusión**

### **2.3.1. Reactivación e identificación de *Bacillus megaterium***

Las características de las colonias formadas a partir del cultivo de la bacteria reactivada, obtenida a partir del aislamiento de López *et al.* (2011), en un medio rico sólido (Figura 2.7), la reacción positiva a la tinción Gram y posterior observación a microscopio óptico (Figura 2.8), confirman la presencia de un microorganismo Gram positivo consistente con la cepa *Bacillus megaterium*.

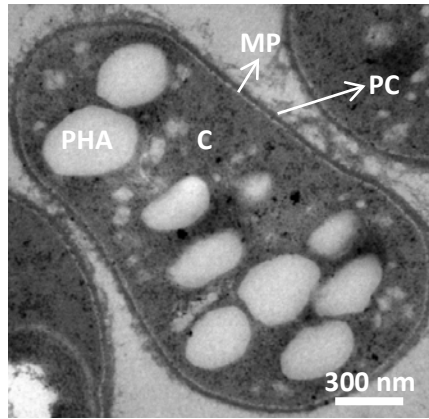


**Figura 2.7.** Colonias formadas en medio sólido.



**Figura 2.8.** Imagen de la bacteria reactivada al microscopio óptico (NIKON YS100, Japón) con un aumento 1000x luego de la aplicación de la tinción de Gram.

Asimismo, se verificó la capacidad de producción de PHA por parte de la cepa reactivada mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM) siguiendo la metodología presentada por Tian *et al.* (2005) en su trabajo. Como se muestra en la Figura 2.9, se puede confirmar que el microorganismo utilizado en este capítulo presenta el metabolismo necesario para llevar a cabo la biosíntesis intracelular de PHA.

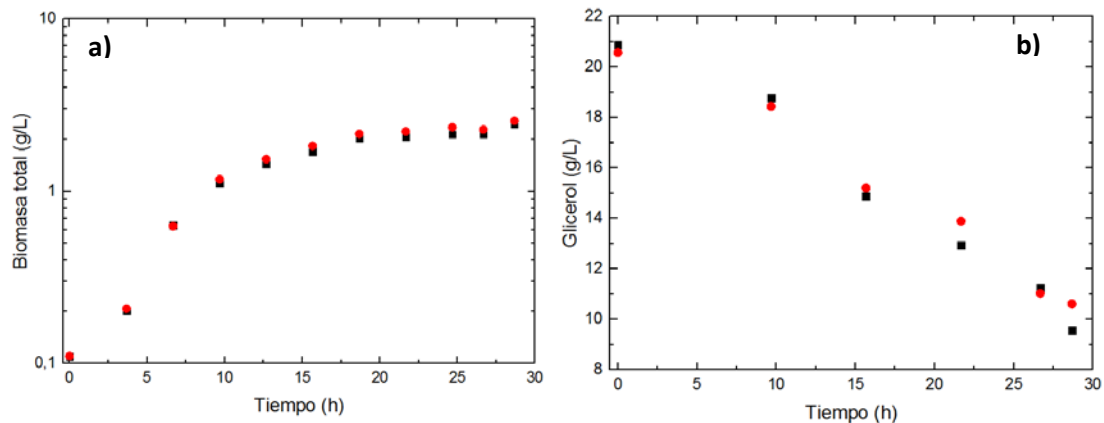


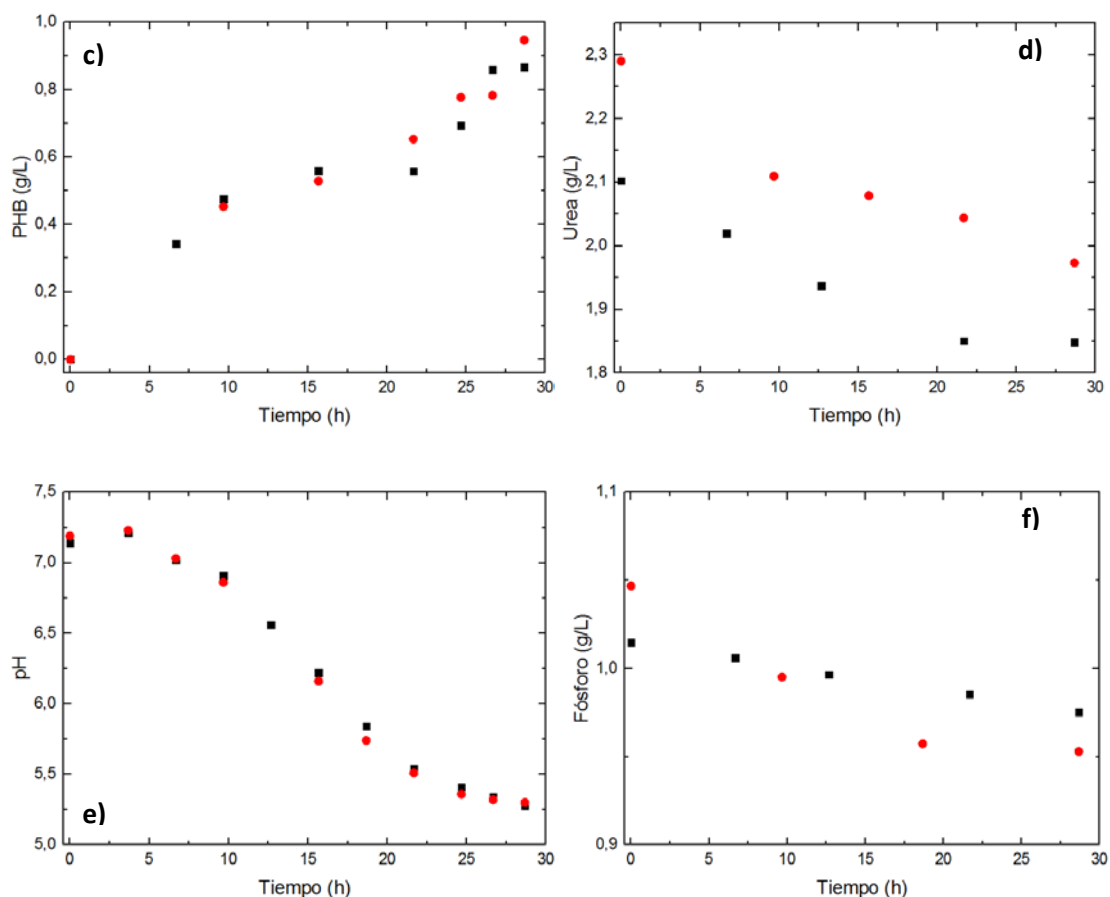
**Figura 2.9.** Micrografía TEM (50000 x) de *B. megaterium* donde pueden observar los gránulos de PHA en su citoplasma. Pared celular (PC), membrana plasmática (MP), citoplasma (C) y gránulos de PHA (PHA).

### 2.3.2. Cultivo en Erlenmeyer

Los cultivos bacterianos a escala Erlenmeyer se llevan a cabo con el objetivo de efectuar mediciones en los cambios dinámicos de las principales variables involucradas en la cinética de crecimiento y producción de la cepa analizada.

La Figura 2.10 muestra los perfiles de concentración en función del tiempo de cultivo de la biomasa en peso seco, el PHB acumulado, de los sustratos consumidos (glicerol, urea y fósforo) y el pH. Con el objetivo de asegurar reproducibilidad en los resultados, se llevaron a cabo dos experimentos en Erlenmeyer bajo las mismas condiciones.





**Figura 2.10.** Evolución en función del tiempo de la biomasa en peso seco (a), producción de PHB (c), consumo de sustratos (b, d, f) y variación del pH (e) para un cultivo en Erlenmeyer con 20 g/L de glicerol y 2 g/L de urea.

Símbolos: (■) Experimento 1 y (●) Experimento 2

Como se puede observar a partir de la Figura 2.10 (a), la duración de la fase lag, periodo en el cual la bacteria se adapta a las condiciones del medio, no puede establecerse con precisión. Si bien un tiempo de adaptación menor a 5 h resulta aceptable a escala laboratorio, debería reducirse aún más en vistas de trasladar el bioproceso a una escala comercial (Swinnen *et al.*, 2004).

Respecto del PHB, a partir de la Figura 2.10 (c) se observa que su producción adopta un mecanismo asociado al crecimiento exponencial, como así también a la fase estacionaria del microorganismo. Esta producción mixta es típica del género *Bacillus*, el cual, a diferencia de otros microorganismos, no solo puede biosintetizar PHB en la fase estacionaria por la escases de algún nutriente, sino que también lo hace en la fase exponencial de su crecimiento (Mohapatra *et al.* (2017b); Kumar *et al.* (2015)).

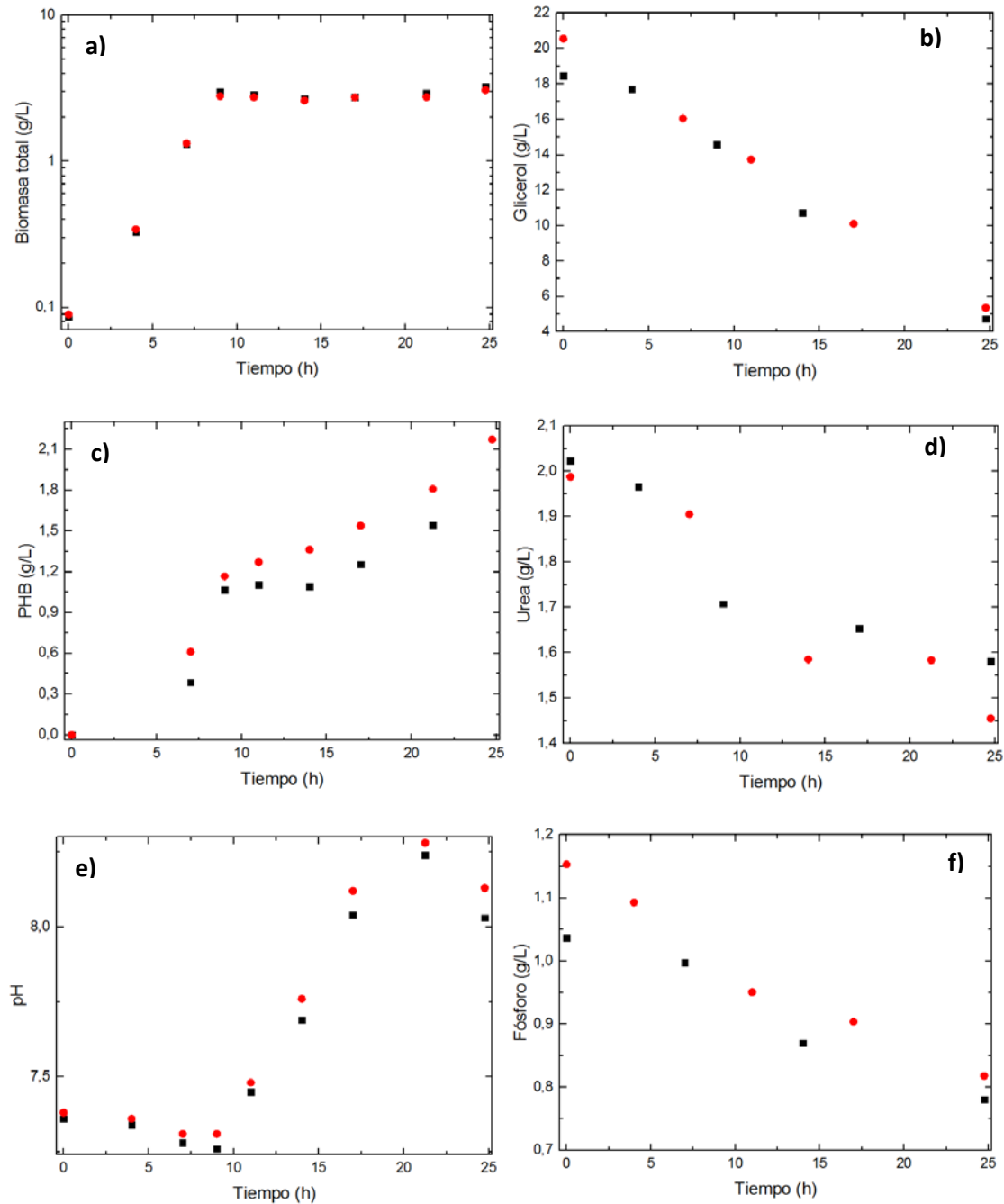
La productividad de PHB obtenida luego de 28 h de cultivo en Erlenmeyer resultó de 0,032 g/L h. Este valor se encuentra dentro de los esperados para cepas silvestres de *Bacillus* en Erlenmeyer. Por caso, Porras *et al.* (2019), empleando la misma cepa, obtuvieron un valor semejante, de 0,023 g/L h, en un medio definido con almidón soluble y extracto de levadura. Por otro lado, Kulpreecha *et al.* (2009) reportaron niveles de productividad de PHB entre 0,02 y 0,04 g/L h para *B. megaterium* BA-019, aislada del suelo de Tailandia, empleando sacarosa como fuente de carbono. Asimismo, Thirumala *et al.* (2010) obtuvieron un valor de 0,026 g/L h mediante la cepa *Bacillus* sp. 112A, aislada del suelo de Hyderabad, en India, utilizando almidón como fuente de carbono. Del mismo modo, Moreno *et al.* (2015), alcanzaron niveles de productividad del orden de 0,031 g/L h mediante la utilización de *B. megaterium* aislado de una corriente de glicerol crudo proveniente de una planta de biocombustibles en Colombia.

Finalmente, en concordancia con Luvizetto Faccin *et al.* (2009), la acidificación del medio de cultivo, da un indicio del crecimiento celular por parte del microorganismo. Esta acidificación puede ser atribuida a la producción de ácido láctico, ácido tartárico y ácido acético por parte de *B. megaterium* debido a la utilización de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  como fuente de fósforo (Zhong *et al.*, 2017). Consistentemente, como se observa en la Figura 2.10 (e), existe un punto de inflexión a las 21 h en la curva que reporta el pH del medio, siendo coincidente este tiempo con el ingreso a la fase estacionaria del *B. megaterium*. Del mismo modo, se puede observar que el gradiente de producción de ácidos disminuye a las 21 h, debido a que también lo hace el consumo de la fuente de fósforo en este momento (Figura 2.10 (f)).

### 2.3.3. Cultivo en biorreactor

Al igual que para el caso de los experimentos realizados en Erlenmeyer, los bioprocesos que se efectúan en biorreactores se llevan a cabo con el objetivo de tomar mediciones de las variables involucradas en la cinética de crecimiento y producción de *B. megaterium* a una mayor escala. Asimismo, para certificar la reproducibilidad de los resultados, el experimento se realizó en dos biorreactores diferentes bajo las mismas condiciones de operación. En este

sentido, la Figura 2.11 muestra los perfiles de concentración de las principales variables del sistema en función del tiempo. En este caso, los biorreactores se iniciaron con una concentración de la fuente de carbono y nitrógeno de 20 g/L y 2 g/L, respectivamente, y el experimento se denominó Biorreactor 1.



**Figura 2.11.** Evolución en función del tiempo de la biomasa en peso seco (a), producción de PHB (c), consumo de sustratos (b, d, f) y variación del pH (e) para un cultivo en Biorreactor 1 con 20 g/L de glicerol y 2 g/L de urea.

Símbolos: (■) Experimento 1 y (●) Experimento 2.

De manera similar a lo que sucede en la experiencia en Erlenmeyer, se puede observar que el biopolímero es sintetizado tanto en la fase de crecimiento exponencial como en la fase estacionaria. Esto se corresponde con las experiencias llevadas a cabo por Naranjo *et al.* (2013) con la misma cepa en biorreactores empleando glicerol como principal fuente de carbono. Para el caso estudiado en este capítulo, la cantidad de biopolímero que se produce en fase exponencial y estacionaria resulta muy similar como se observa en la Figura 2.11 (c), 1,06 g/L y 1,11 g/L, respectivamente.

Por otro lado, el nivel de productividad que se alcanza en esta experiencia resulta de 0,081 g/L h, valor superior al obtenido con el cultivo en Erlenmeyer (0,032 g/L h) e idéntico al reportado por López *et al.* (2012) en un biorreactor. Esto demostraría el beneficio que aporta la implementación de un escalado en este tipo de bioprocesos (Luvizetto Faccin *et al.*, 2013).

Por su parte, la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) posee un valor de 0,329 h<sup>-1</sup>, un 64 % mayor que la correspondiente a la experiencia en Erlenmeyer ( $\mu = 0,201$  h<sup>-1</sup>). Este incremento en la tasa de crecimiento se muestra consistente con el menor tiempo en alcanzar la fase estacionaria de los cultivos en biorreactores (10 h aproximadamente, Figura 2.11 (a)) frente a los desarrollados en Erlenmeyer (18 h aproximadamente).

Otro aspecto destacable del cultivo en biorreactor es el mayor porcentaje de acumulación de PHA en las células. Para el caso mencionado, este valor es de aproximadamente el 68 % en peso seco de la célula, mientras que, para el cultivo en Erlenmeyer, se logró alcanzar aproximadamente un 37 % de acumulación de biopolímero en la biomasa seca. Asimismo, se puede mencionar que el porcentaje de acumulación obtenido en la experiencia realizada resulta uno de los más elevados en comparación con los reportados en la literatura para *Bacillus megaterium* (Tabla 2.1). Si bien se obtienen mayores porcentajes de acumulación de PHA empleando glicerol, el cual se encuentra en una forma menos reducido que la glucosa, su productividad hacia biopolímero es menor respecto de los azúcares como sacarosa (0,117 g/L h) reportado por Luvizetto Faccin *et al.* (2009).

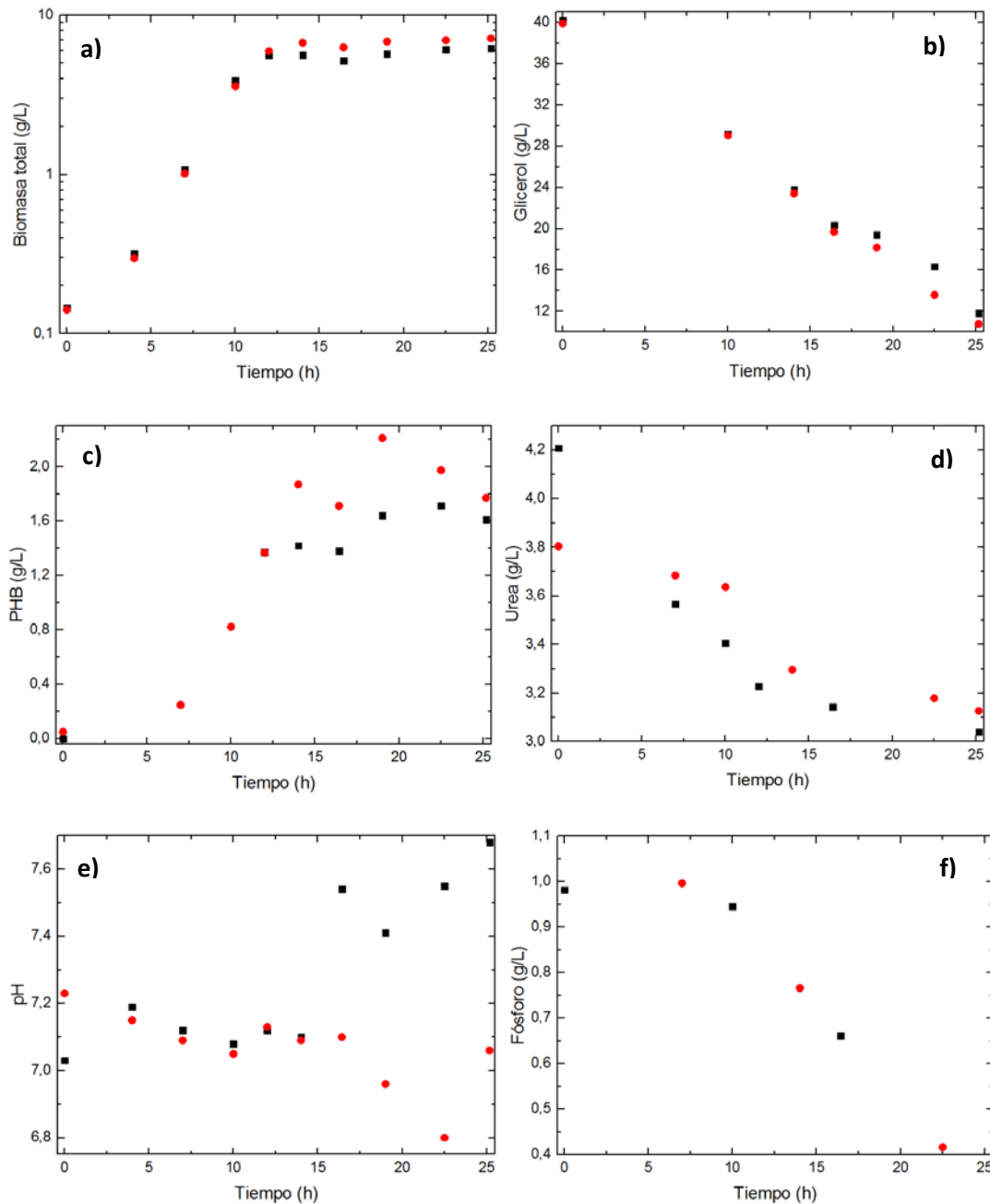
Asimismo, se observa que la producción del biopolímero no es sensible al valor de pH del medio de cultivo, ya que el microorganismo puede producirlo en un amplio rango de pH (Figura 2.11 (e)).

**Tabla 2.1.** Comparación del porcentaje de acumulación de PHA entre distintas cepas de *Bacillus megaterium*.

Bacteria	Fuente de carbono	PHA (%)	Referencia
<i>B. megaterium</i> BBST4	glicerol	68	Este trabajo
<i>B. megaterium</i> BBST4	glicerol	60	Naranjo <i>et al.</i> (2013)
<i>B. megaterium</i> BBST4	glucosa	59	Naranjo <i>et al.</i> (2013)
<i>B. megaterium</i> KM	glucosa	40	Macrae & Wilkinson (1958)
<i>B. megaterium</i> P7	Peptona y extracto de levadura	14	Yilmaz <i>et al.</i> (2005)
<i>B. megaterium</i> OU303A	glicerol	62	Reddy <i>et al.</i> (2009)
<i>B. megaterium</i> OU303A	glucosa	63	Reddy <i>et al.</i> (2009)
<i>B. megaterium</i> DSM 90	glicerol	54	Shahid <i>et al.</i> (2013)
<i>B. megaterium</i> DSM 509	glicerol	49	Shahid <i>et al.</i> (2013)
<i>B. megaterium</i> DSM 32 <sup>T</sup>	sacarosa	34	Luvizetto Faccin <i>et al.</i> (2009)
<i>B. megaterium</i> ATCC 6748	Melaza de caña de azucar	43	Chaijamrus & Udpuay (2008)



Por último, con el objetivo de contar con un conjunto de datos experimentales independiente, se realizó otro experimento en dos biorreactores con las mismas condiciones iniciales empleando esta vez 40 g/L de glicerol y 4 g/L de urea, denominando en este caso al experimento como Biorreactor 2. Los valores de las variables de interés medidos en función del tiempo se muestran en la Figura 2.12.



**Figura 2.12.** Evolución en función del tiempo de la biomasa en peso seco (a), producción de PHB (c), consumo de sustratos (b, d, f) y variación del pH (e) para un cultivo en Biorreactor 2 con 40 g/L de glicerol y 4 g/L de urea. Símbolos: (■) Experimento 1 y (●) Experimento 2.

Uno de los principales cambios que se encuentran con relación a las experiencias anteriores es que el PHA se produce sólo en la fase exponencial de crecimiento del microorganismo, resultando ser un metabolito primario. Si bien este comportamiento no se había reportado para las experiencias en Erlenmeyer y Biorreactor 1, autores como Israni & Shivakumar (2015) y Yüksekdag *et al.* (2004), han encontrado que ciertas cepas de *Bacillus sp.* tienen la particularidad de acumular el biopolímero en la fase exponencial cesando la producción en la fase estacionaria temprana.

Otra característica que se destaca en este cultivo es la mayor concentración de biomasa total acumulada durante el tiempo de la experiencia, aumentando en una proporción de aproximadamente el doble en relación al Biorreactor 1 (6,5 g/L a 3,0 g/L). Esto podría atribuirse a la mayor disponibilidad de sustratos disponibles en el medio para el consumo. Sin embargo, la concentración de PHA no sigue la misma tendencia que la biomasa. Efectivamente, el porcentaje de acumulación del biopolímero en el citoplasma celular ronda el 27 % de la biomasa total expresada en peso seco, resultando en una concentración no superior a 2 g/L de PHA en promedio y una productividad de 0,068 g/L h, inferior al obtenido con el Biorreactor 1 (0,081 g/L h). Sin embargo, si se compararan las productividades de las experiencias llevadas a cabo empleando 20 g/L y 40 g/L de glicerol, considerando sólo el material polimérico formado en la fase exponencial, ambas productividades resultan muy similares (0,118 g/L h para Biorreactor 1 y 0,121 g/L h para Biorreactor 2).

Uno de los factores influyentes que podría explicar este comportamiento podría ser la relación carbono/nitrógeno (C/N) (Kulpreecha *et al.*, 2009). Sin embargo, al calcular las relaciones C/N de las experiencias efectuadas en biorreactores, se observan que ambas son muy similares. Inicialmente, C/N es de 9,1 y 9,8 para Biorreactor 1 y Biorreactor 2, respectivamente. A pesar de que al inicio de la fase estacionaria la primera experiencia alcanza una relación C/N de 8,5 frente a 7,2 de la segunda experiencia en biorreactor, esto no resulta una diferencia considerable para establecer un límite admisible en el comportamiento del PHA como metabolito primario en lugar de mixto.

Por esta razón, se observó la relación carbono/fósforo (C/F), encontrándose esta vez valores con diferencias más representativas. Para el caso del Biorreactor 1, inicialmente, C/F resultó de 16,2, mientras que en la fase estacionaria tomó un valor de 15,4. Por su parte, en la experiencia realizada en el Biorreactor 2, se inició con un una relación C/F de 40,8 alcanzando la fase estacionaria con un valor de 30,5. Esto último podría justificar la dificultad en la producción de biopolímero, ya que elevados valores en la relación de C:F dificultan la acumulación de PHA en las cepa *Bacillus* sp (Wu *et al.*, 2001).

Del mismo modo, Luvizetto Faccin *et al.* (2009) encontraron que la acumulación del biopolímero se incrementa con un aumento en la concentración inicial de sacarosa hasta 30 g/L, pero a concentraciones superiores no se encontró una mayor producción de PHA. Asimismo, en este trabajo, se puede resaltar que la biosíntesis se detuvo aproximadamente a las 14 h de iniciado el cultivo. Esto coincide con el momento en el que el microorganismo deja de consumir la fuente de nitrógeno. Este mismo comportamiento fue reportado por Luvizetto Faccin *et al.* (2012) y Moreno *et al.* (2015) para *B. megaterium*.

Por otra parte, se calcularon valores de rendimiento que complementan lo observado en las Figuras 2.10 a 2.12. En este sentido, se destaca el rendimiento de biomasa residual (R) con respecto a la fuente de carbono (S1)  $Y_{R/S1}$ , el cual toma valores promedios de 0,141 y 0,169 g R/g S1 para Erlenmeyer y Biorreactor 2, respectivamente, los cuales resultan aproximadamente un orden de magnitud superior al obtenido en el Biorreactor 1 (0,075 g R/g S1). Contrariamente, el rendimiento del biopolímero frente a la fuente de carbono ( $Y_{P/S1}$ ) es mayor en el Biorreactor 1 que en los medios de cultivo asociados al Erlenmeyer y Biorreactor 2, con valores medios de 0,0139 g P/g S1 frente a 0,086 y 0,059 g P/g S1, respectivamente. Estas diferencias reflejan, en el caso de la experiencia en el Biorreactor 2, que la fuente de carbono se utiliza en mayor proporción para la producción de PHA, mientras que para Erlenmeyer y Biorreactor 1, el consumo de glicerol se destina en mayor medida para el crecimiento celular.

De manera similar, el rendimiento de la biomasa residual a fuente de nitrógeno ( $Y_{R/S2}$ ) y de PHA a urea ( $Y_{P/S2}$ ) poseen la misma tendencia que la mencionada

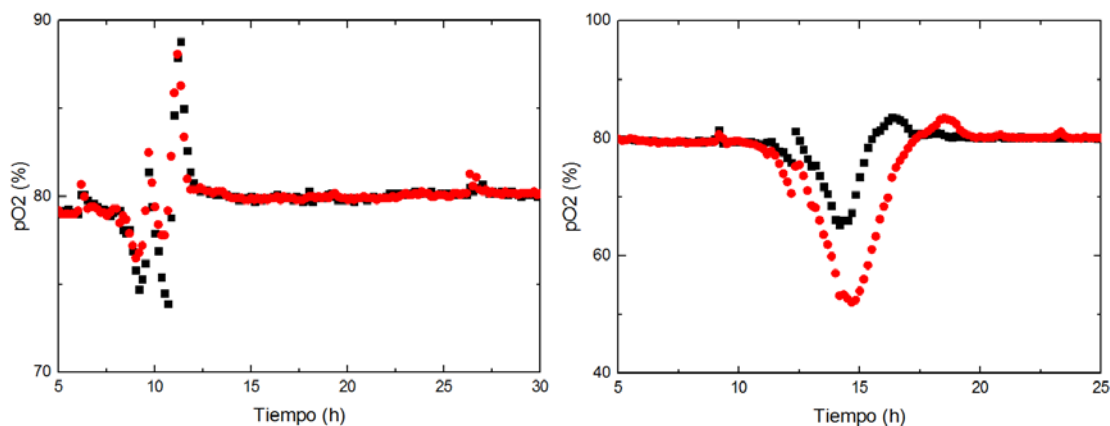
para el glicerol. En Erlenmeyer y Biorreactor 2 se alcanzan valores elevados de  $Y_{R/S2}$  de 5,280 y 5,795 g R/g S2, respectivamente, comparados con el calculado para Biorreactor 1 de 2,246 g R/g S2. Por el contrario,  $Y_{P/S2}$  para el Biorreactor 1 toma un valor de 4,138 g P/g S2, ligeramente superior al del Erlenmeyer (3,2 g P/g S2) y Biorreactor 2 (1,996 g P/g S2). Esto último, se muestra en concordancia con lo mencionado para el caso de la fuente de carbono, pudiendo establecer una relación entre los valores de rendimiento de biomasa residual y polímero a las fuentes de carbono y nitrógeno. En resumen, se podría decir que la experiencia realizada en el biorreactor con 20 g/L de glicerol y 2 g/L de urea (Biorreactor 1) resulta más atractiva en términos de producción de PHA ya que posee mejores índices de performance tales como una mayor cantidad de polímero biosintetizado en función de los g de biomasa residual formados ( $Y_{P/R} = 2,048$  g P/ g R) y una mayor productividad (0,081 g/L h). Los valores de rendimiento junto con las productividades y porcentajes de acumulación de PHA anteriormente mencionados, se reportan en la Tabla 2.2.

**Tabla 2.2.** Resumen de los resultados obtenidos para *B. megaterium* BBST4.

Variables	Erlenmeyer	Biorreactor 1	Bioreactor 2
Productividad P (g P/L h)	0,032 ± 0,002	0,081 ± 0,006	0,068 ± 0,004
Productividad R (g R/L h)	0,056 ± 0,001	0,043 ± 0,010	0,194 ± 0,017
% P	37 ± 3	68 ± 8	27 ± 2
$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0,201 ± 0,050	0,329 ± 0,015	0,334 ± 0,003
$Y_{R/S1}$	0,141 ± 0,001	0,075 ± 0,021	0,169 ± 0,012
$Y_{R/S2}$	5,280 ± 0,54	2,246 ± 0,725	5,795 ± 1,977
$Y_{X/S1}$	0,227 ± 0,019	0,214 ± 0,017	0,228 ± 0,014
$Y_{P/R}$	0,608 ± 0,021	2,048 ± 0,636	0,349 ± 0,012
$Y_{P/S1}$	0,086 ± 0,009	0,139 ± 0,004	0,059 ± 0,002
$Y_{P/S2}$	3,200 ± 0,21	4,138 ± 0,058	1,996 ± 0,618

Finalmente, en la Figura 2.13 se muestra la evolución de la presión parcial de oxígeno disuelto ( $p_{O_2}$ ) para el caso de los Biorreactores 1 y 2. Como puede

observarse, existe una marcada perturbación en el oxígeno del sistema, el cual resulta coincidente con el momento en que el microorganismo alcanza la fase estacionaria temprana. Este mismo comportamiento fue reportado por Kulpreecha *et al.* (2009), Luvizetto Faccin *et al.* (2009) y Luvizetto Faccin *et al.* (2013) para *Bacillus megaterium*, quienes atribuyen las variaciones en el  $O_2$ , a cambios en el metabolismo de los microorganismos debido al paso de la fase exponencial a estacionaria.



#### 2.3.4. Extracción del biopolímero

Debido a restricciones de tiempo, el proceso de liofilización se llevó a cabo a partir de la mezcla de biomasa obtenida en los diferentes experimentos. Esto último impide realizar el cálculo del porcentaje de recuperación de PHA a partir de la cantidad conocida de PHA acumulado en las células (medido mediante cromatografía gaseosa) y el peso de biopolímero recuperado mediante la extracción. Por esta razón, para estimar el porcentaje del PHA acumulado en una muestra de biomasa liofilizada, se emplea la técnica de determinación del PHA extraíble propuesta por Porras *et al.* (2016) a partir de células liofilizadas y FTIR (espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier).

Específicamente, esta alternativa para la determinación del PHA intracelular potencialmente extraíble, se basa en el empleo de un sólido pulverizable (material de preextracción) como material de referencia, y mediante la determinación estadística de picos característicos de un espectro de FTIR de las muestras analizadas, se puede predecir la concentración de PHA que

contienen. La ventaja de este método es que el material de referencia es producido por la misma cepa y no se necesita PHA puro para su calibración, solo contando con un equipo de FTIR, se puede aplicar esta metodología para estimar la cantidad de PHA extraíble presente en la biomasa liofilizada.

Aplicando esta técnica de determinación de PHA al material celular, se obtuvo un valor del porcentaje de PHA contenido en la biomasa de  $21,5 \pm 1,4$  %. A esa misma muestra de material celular liofilizado se le extrajo el biopolímero mediante extracción con cloroformo en Soxhlet hallando un rendimiento de extracción de aproximadamente 95 % (Figura 2.14). Este valor resulta notablemente superior al obtenido por López (2011), quien reporta un rendimiento de extracción en Soxhlet con cloroformo del 56 %. Sin embargo, el microorganismo empleado por este autor para la biosíntesis de PHA es *Alcaligenes latus* DSMZ, el cual, al ser Gram negativo, posee características estructurales diferentes en su membrana celular, lo que podría manifestarse en un menor rendimiento del método de extracción.

Por último, es importante mencionar que se emplea este método de extracción ya que la recuperación con solvente es la más utilizada a escala laboratorio (Heinrich *et al.*, 2012). Si bien otros autores proponen la recuperación empleando un pretratamiento de la biomasa con hipoclorito de sodio (Valappil *et al.*, 2007b; Manna *et al.*, 1999; Hahn *et al.*, 1994), este compuesto puede degradar de manera considerable el PHA obtenido (Ramsay *et al.*, 1990). Por esta razón, entre todos los métodos de extracción por solvente, se eligió el Soxhlet con cloroformo en ebullición, ya que proporciona una elevada pureza en la obtención del PHA (Jiang *et al.*, 2015)



**Figura 2.14.** Biopolímero extraído mediante extracción Soxhlet.

## 2.4. Conclusiones

En este capítulo se estudió la capacidad de producción y acumulación de PHA por parte de la cepa autóctona *Bacillus megaterium* BBST4, aislado previamente por el grupo del estuario de Bahía Blanca. Se llevaron a cabo experiencias en Erlenmeyer y biorreactor con el objetivo de recopilar datos dinámicos de las principales variables cinéticas del bioproceso, los cuales serán utilizados en el Capítulo 4 para desarrollar y validar un modelo matemático del crecimiento de la biomasa y la producción del biopolímero.

En los experimentos en Erlenmeyer se empleó una concentración inicial de la fuente de carbono (glicerol) y fuente de nitrógeno (urea) de 20 g/L y 2 g/L, respectivamente. Se obtuvo una acumulación del biopolímero del 37 % en peso de la biomasa seca y una productividad de 0,032 g P/L h. De esta manera se confirmó la capacidad de esta cepa para acumular PHAs y los datos pertenecientes al consumo de los sustratos (glicerol, urea y fósforo), la evolución del pH y el incremento de la biomasa celular junto con el biopolímero en función del tiempo serán utilizados en el Capítulo 4 para calibrar y validar un modelo matemático capaz de reproducir la cinética de esta cepa.

Con respecto a los ensayos efectuados en biorreactores, se tomaron medidas de las variables mencionadas para el esquema en Erlenmeyer con la particularidad que también se llevó a cabo una modificación en las concentraciones iniciales de las fuentes de carbono y nitrógeno. De este modo el experimento denominado Biorreactor 1 contó con las mismas

concentraciones que el Erlenmeyer, mientras que en el Biorreactor 2 se comenzó con una concentración de glicerol de 40 g/L y de urea de 4 g/L. Para el caso del Biorreactor 1 se obtuvo un porcentaje de acumulación respecto a la biomasa seca del 68 % y una productividad de 0,081 g P/L h. En la experiencia Biorreactor 2, se alcanzó un porcentaje de biopolímero notablemente menor a los casos anteriormente mencionados, siendo este del 27 %. Esto último se atribuiría a la elevada relación C/F en el medio de cultivo, la cual podría actuar como un inhibidor en la producción de PHAs, sin embargo, son necesarios más estudios para corroborar estos resultados. Una observación destacable que surge de comparar las experiencias Biorreactor 1 y 2 es que, si bien una mayor concentración inicial de glicerol promueve una mayor generación de biomasa, esto no se refleja de manera proporcional en un incremento de la biosíntesis de polímero. Industrialmente, esto debe ser considerado de modo tal que no exista un desaprovechamiento de la fuente de carbono empleada en este tipo de bioproceso.

Finalmente, el polímero biosintetizado se extrajo mediante un proceso de extracción Soxhlet utilizando cloroformo en ebullición como solvente, obteniendo un rendimiento de la extracción del 95 %. La caracterización del biopolímero recuperado del interior de las células del microorganismo se desarrolla en el siguiente capítulo.



## CAPÍTULO 3

### CARACTERIZACIÓN DE LOS PHAs EXTRAÍDOS

#### 3.1. Introducción

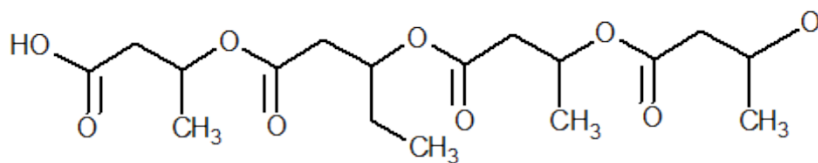
Los poli(hidroxicanoato)s, PHAs, están dentro del grupo de biopolímeros más conocidos y estudiados. Fueron observados por primera vez en 1888 por Beijerinck (Mozejko-Ciesielska & Kiewisz, 2016). Sin embargo, no fue hasta el año 1926 que el científico francés Lemoigne pudo obtener y caracterizar el poli(3-hidroxi-butirato), P(3-HB), a partir de *Bacillus megaterium* (Lemoigne, 1926).

Hasta 1974 el P(3-HB) era el único PHA identificado, no obstante, a partir del trabajo de Wallen & Rohwedder (1974) se lograron identificar otros miembros de esta familia de biopolímeros. La primera cadena copolimérica de PHAs contenía 3-hidroxi-valerato (3-HV) y 3-hidroxi-butirato (3-HB) como componentes principales junto con 3-hidroxi-hexanoato (3-HHx) y 3-hidroxi-heptanoato (3-HHp).

Este último descubrimiento resultó de suma importancia ya que el P(3-HB) posee ciertas características que limitan su procesamiento y por lo tanto sus aplicaciones. El P(3-HB) homopolímero es un poliéster altamente cristalino con una temperatura de fusión entre 173-180 °C y una temperatura de transición vítrea alrededor de 5 °C (Ten *et al.*, 2015). Tiene la desventaja de ser un polímero con elevada fragilidad y rigidez y con una ventana de procesamiento muy angosta cuando se lo compara con polímeros sintéticos derivados del petróleo (Ng & Sudesh, 2016). Por lo tanto, la inclusión de monómeros como (3-HV) o (3-HHx), entre otros, puede resultar en un mejoramiento de las propiedades.

Como se ha mencionado, una posible clasificación de los PHAs puede ser en homopolímeros o copolímeros. Mientras que los homopolímeros contienen una única unidad repetitiva del monómero (P(3-HB) o P(3-HHx)), los copolímeros poseen más de un tipo de unidad monomérica como el poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato), P(3-HB-co-HV) o el poli(3-hidroxi-hexanoato-co-3-

hidroxiocetanoato), P(3-HHx-co-3-HO) (Basnett *et al.*, 2017) como puede observarse en la Figura 3.1.



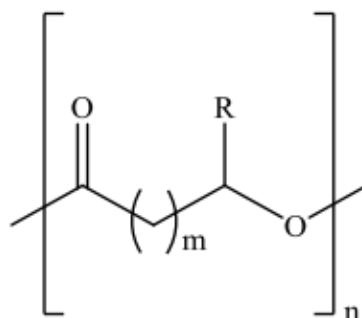
**Figura 3.1.** Fórmula estructural de una molécula de P(3-HB-co-HV).

De modo similar, basado en el largo de la cadena de los monómeros, los PHAs pueden clasificarse en tres grupos: monómeros de cadena corta (SCL) con 3-5 átomos de carbono, monómeros de cadena media (MCL) con 6-14 átomos de carbono y monómeros de cadena larga (LCL) con 15 o más átomos de carbono (Cha *et al.*, 2016; Tan *et al.*, 2014; Höfer *et al.*, 2011).

En la actualidad se conocen alrededor de 150 diferentes tipos de monómeros que pueden constituir los PHAs y como consecuencia de esto, las propiedades de los polímeros pueden resultar muy amplias (Kosseva & Rusbandi, 2017; Urtuvia *et al.*, 2014).

En términos generales, los PHAs-SCL presentan propiedades termoplásticas mientras que los PHAs-MCL tienen características similares a los elastómeros. Los primeros se consideran rígidos y frágiles, con un elevado índice de cristalinidad entre 60-80 %. Por otro lado, los PHAs-MCL son más flexibles con baja cristalinidad (25 %), baja resistencia a la tracción, alta elongación a la ruptura, baja temperatura de fusión y temperatura de transición vítrea inferior a la temperatura ambiente (Albuquerque & Malafaia, 2018; Anjum *et al.*, 2016).

Evidentemente, las propiedades de los PHAs se ven enormemente influenciadas por la longitud de las cadenas y el tipo de grupo funcional que presentan (Martin & Williams, 2003). La Figura 3.2 muestra la estructura química general de los poli(hidroxicanoato)s, donde m puede variar entre 1 y 4 y n entre 100 y 30.000 unidades de monómero (Philip *et al.*, 2007). Por su parte, en la Tabla 3.1 se reportan algunas de las fórmulas estructurales más habituales de los PHAs conocidos en la actualidad.



**Figura 3.2.** Fórmula estructural general de una molécula de PHA.

**Tabla 3.1.** Fórmula estructural de PHAs de cadena corta, media y larga.

m=1	PHA-SCL	R=H	Poli(3-hidroxiopropionato)	P(3-HP)
		R=CH <sub>3</sub>	Poli(3-hidroxiбутirato)	P(3-HB)
		R=C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Poli(3-hidroxi valerato)	P(3-HV)
	PHA-MCL	R=C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	Poli(3-hidroxi hexanoato)	P(3-HHx)
		R=C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	Poli(3-hidroxi octanoato)	P(3-HO)
R=C <sub>7</sub> H <sub>15</sub>		Poli(3-hidroxi decanoato)	P(3-HD)	
R=C <sub>11</sub> H <sub>23</sub>		Poli(3-hidroxi tetradecanoato)	P(3-HTD)	
PHA-LCL	R=C <sub>15</sub> H <sub>31</sub>	Poli(3-hidroxi octadecanoato)	P(3-HOD)	
m=2	PHA-SCL	R=H	Poli(4-hidroxi butirato)	P(4-HB)
		R=CH <sub>3</sub>	Poli(4-hidroxi valerato)	P(4-HV)
m=3	PHA-SCL	R=H	Poli(5-hidroxi valerato)	P(5-HV)
		R=CH <sub>3</sub>	Poli(5-hidroxi hexanoato)	P(5-HHx)

En el presente capítulo, los PHAs obtenidos fueron caracterizados estructuralmente mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y se determinaron sus propiedades térmicas a través de calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis termogravimétrico (TGA). A partir de los biopolímeros sintetizados se desarrollaron películas por termocompresión cuya estructura fue estudiada por microscopía electrónica de barrido (SEM) y se evaluaron sus propiedades ópticas tales como capacidad de absorción de radiación UV mediante espectrometría UV-vis y color utilizando un colorímetro.

## 3.2. Materiales y métodos

### 3.2.1. Materiales

Para la caracterización estructural, térmica y morfológica del PHA se empleó el biopolímero extraído por Soxhlet con cloroformo en ebullición del interior de la biomasa celular obtenida en los experimentos descritos en el Capítulo 2, en Erlenmeyers y biorreactores. Del mismo modo, con el objetivo de realizar una

comparación con un PHA comercial, se utilizó un PHB provisto por la empresa brasilera PHB Industrial S.A.

### 3.2.2. Determinación de la estructura química

#### 3.2.2.1. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros de FTIR se obtuvieron utilizando un espectrofotómetro (Thermo Nicolet Nexus, Estados Unidos) empleando una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$ , realizando 100 escaneos en el rango de  $400$  a  $4000\text{ cm}^{-1}$  en el modo transmitancia. Se utilizaron pastillas de KBr empleando muestras sólidas de PHA obtenido a partir de *Bacillus megaterium* y PHB comercial, PHB Industrial S.A.

### 3.2.3. Determinación de las propiedades térmicas

#### 3.2.3.1. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El análisis térmico se llevó a cabo mediante DSC en un calorímetro Discovery (TA Instruments, Estados Unidos) utilizando aproximadamente  $5\text{ mg}$  de muestra en una atmósfera de nitrógeno. En un primer calentamiento se borró la historia térmica de la muestra realizando un barrido inicial desde  $-50\text{ °C}$  hasta  $190\text{ °C}$  con una rampa de temperatura de  $10\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$ . A continuación se enfriaron las muestras hasta  $-50\text{ °C}$  a  $10\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$  y posteriormente se realizó un segundo calentamiento hasta  $190\text{ °C}$  también a  $10\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$ . Las propiedades térmicas, como temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), temperatura de fusión ( $T_f$ ) y entalpía de fusión ( $\Delta H_f$ ) se obtuvieron del segundo calentamiento. El grado de cristalinidad ( $X_c$ ) de las películas se estimó mediante la siguiente ecuación:

$$X_c(\%) = \frac{\Delta H_f}{\Delta H_f^0} \cdot 100 \quad (3.1)$$

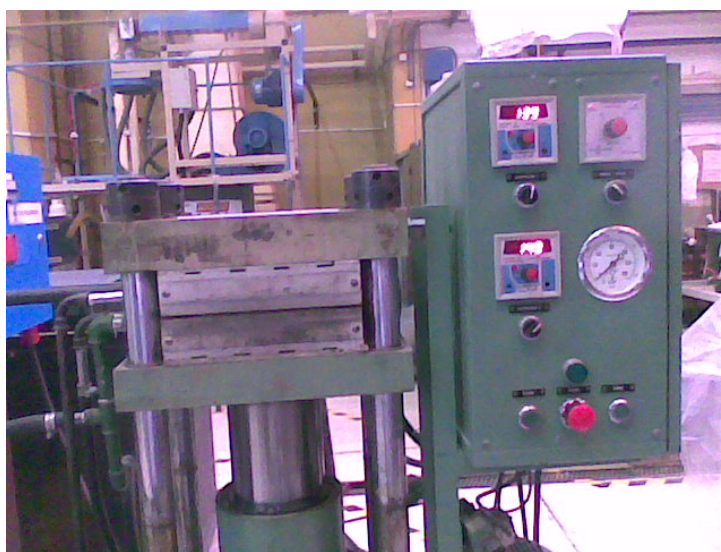
donde  $\Delta H_f$  es la entalpía de fusión de la muestra, en  $\text{J/g}$  y  $\Delta H_f^0$  es la entalpía de fusión, en  $\text{J/g}$ , de una muestra  $100\%$  cristalina de PHB con un valor de  $146\text{ J/g}$  (Barham *et al.*, 1984).

### 3.2.3.2. Análisis termogravimétrico (TGA)

La estabilidad térmica se evaluó a través de TGA para determinar los rangos de temperaturas de degradación. Las muestras se calentaron en atmósfera de aire desde temperatura ambiente hasta 800 °C con una velocidad de calentamiento de 10 °C.min<sup>-1</sup> en una balanza termogravimétrica Discovery (TA Instruments, Estados Unidos) empleando un flujo de aire de 25 mL.min<sup>-1</sup>. El termograma que se obtiene permite evaluar los cambios de masa que ocurren a diferentes temperaturas. En estos ensayos es posible obtener también la derivada de la curva (DTGA), mediante la cual es posible calcular la masa asociada a cada etapa de la degradación.

### 3.2.4. Formación de las películas

Las películas de PHA se obtuvieron por termocompresión en cuatro etapas utilizando una prensa hidráulica de platos calefaccionados (Modelo AMS 160/33) a 170 °C durante 8 min (Figura 3.3). La primera etapa consistió en mantener inicialmente los platos de la prensa durante 2 min sobre el material para permitir un mejor ablandamiento del mismo. A continuación, se aplicó una presión de 50 kg.cm<sup>-2</sup> durante 2 min y en una tercera etapa se elevó la presión a 100 kg.cm<sup>-2</sup> durante otros 2 min. Finalmente se aplicó una presión de 150 kg.cm<sup>-2</sup> durante 2 min y posteriormente se enfrió la película hasta temperatura ambiente mediante recirculación de agua por los platos del equipo.



**Figura 3.3.** Prensa hidráulica de platos calefaccionados Modelo AMS 160/33.

### 3.2.5. Caracterización morfológica de las películas

#### 3.2.5.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La apariencia de las películas se examinó utilizando un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-35 CF, Japón) con un detector de electrones secundarios y con un sistema de microanálisis acoplado, EDAX 2000. Ambas películas se criofracturaron por inmersión en nitrógeno líquido y posteriormente se cubrieron con una capa de oro de aproximadamente 30 nm utilizando una metalizadora por plasma de argón (sputter coater PELCO 91000).

#### 3.2.5.2. Propiedades ópticas

La opacidad y la capacidad de barrera a la radiación UV se estimaron a partir de un espectro de absorbancia (200-700 nm) utilizando un espectrofotómetro UV-visible (PG Instruments, T60, Inglaterra). Las películas se cortaron de forma rectangular y se colocaron en el interior de una cubeta de cuarzo. La opacidad de las películas (UA.nm) se estimó como el área debajo de la curva de absorbancia (400-700 nm) acorde a la norma ASTM D1003-00.

Las medidas de color de las películas se obtuvieron en un colorímetro (Hunterlab, UltraScan XE, Estados Unidos) en modo transmitancia. Los parámetros de color  $L$ ,  $a$  y  $b$  se registraron de acuerdo a la escala Hunter y varían desde  $L = 0$  (negro) a  $L = 100$  (blanco),  $-a$  (verdoso) a  $+a$  (rojizo), y  $-b$  (azulado) a  $+b$  (amarillento). La diferencia de color ( $\Delta E$ ) del PHA obtenido mediante biosíntesis bacteriana se calculó en base a la película de PHB comercial mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta E = \sqrt{\Delta a^2 + \Delta b^2 + \Delta L^2} \quad (3.2)$$

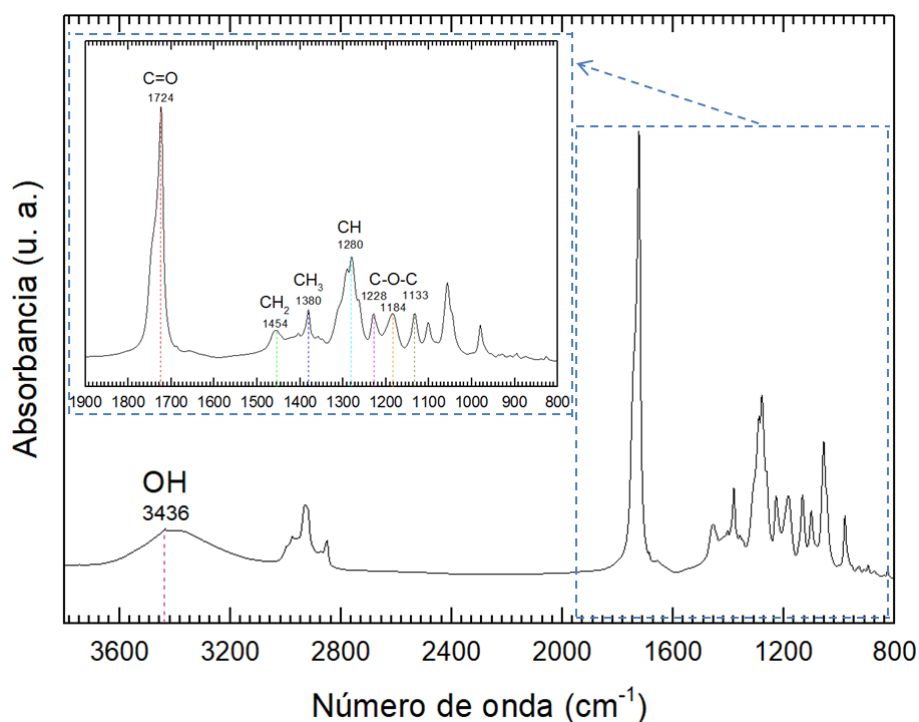
donde,  $\Delta a$ ,  $\Delta b$  y  $\Delta L$  son la diferencia de los parámetros de cromaticidad y luminosidad entre ambos biopolímeros.

### 3.3. Resultados y discusión

#### 3.3.1. Determinación de la estructura química

##### 3.3.1.1. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros FTIR de las muestras del PHA obtenido y del PHB comercial se presentan en la Figuras 3.4 y 3.5 y como puede observarse ambos espectros resultan muy similares. Las bandas observadas a  $3436\text{ cm}^{-1}$  son originadas por los H pertenecientes al grupo OH terminal (López *et al.*, 2012). Las bandas a  $1724\text{ cm}^{-1}$  y  $1722\text{ cm}^{-1}$  son asignadas a las señales de estiramiento del carbonilo del grupo éster para PHA a partir de *Bacillus megaterium* y PHB comercial (Luo *et al.*, 2006), respectivamente. Las bandas a  $1454\text{ cm}^{-1}$  corresponden a la deformación asimétrica del enlace C-H en los grupos  $\text{CH}_2$  (Porrás *et al.*, 2016). Por otra parte, las bandas a  $1380\text{ cm}^{-1}$  y  $1280\text{ cm}^{-1}$  son originadas por vibraciones de estiramiento de los grupos  $\text{CH}_3$  y  $\text{CH}_2$ , respectivamente (Gahlawat & Soni, 2017). Estas últimas dos bandas junto con las encontradas a  $1724\text{-}1722\text{ cm}^{-1}$ , confirman que la cepa utilizada es una productora de PHA (Porrás *et al.*, 2019). Finalmente, las bandas a  $1228\text{ cm}^{-1}$  corresponden a la conformación de cadenas helicoidales, mientras que las localizadas en  $1184\text{ cm}^{-1}$  ( $1182\text{ cm}^{-1}$  para el caso de PHB comercial) y  $1133\text{ cm}^{-1}$  determinan la vibración asimétrica y simétrica del grupo C-O-C, respectivamente (Xu *et al.*, 2002). El resto de las bandas ubicadas entre  $1100\text{ cm}^{-1}$  y  $1000\text{ cm}^{-1}$  se corresponden con la vibración del enlace C-O del grupo éster presente en los PHAs.



**Figura 3.4.** Espectro FTIR de muestra de PHA obtenido a partir de *Bacillus megaterium*.

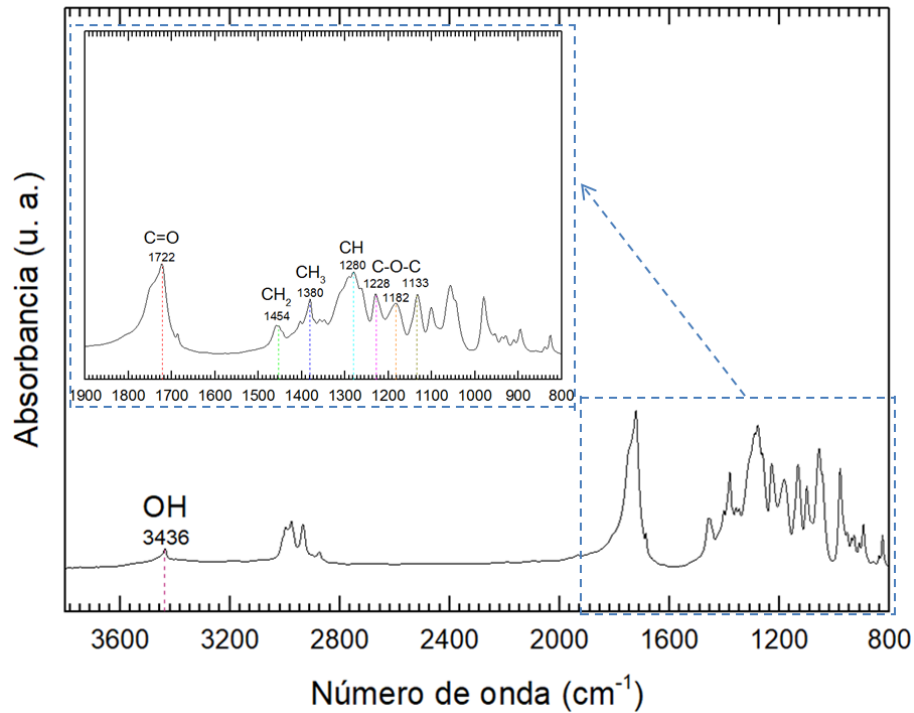


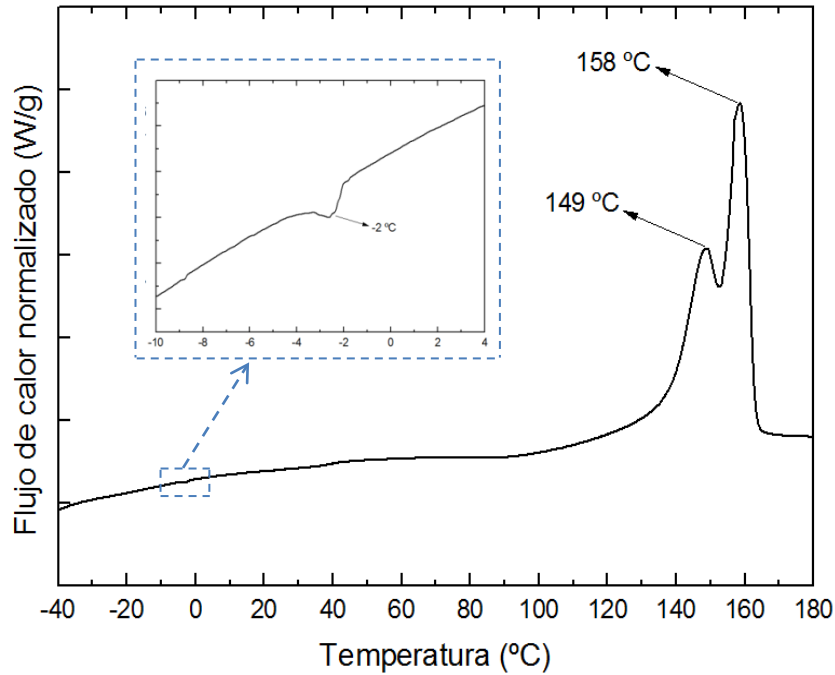
Figura 3.5. Espectro FTIR de muestra de PHB comercial.

### 3.3.2. Determinación de las propiedades térmicas

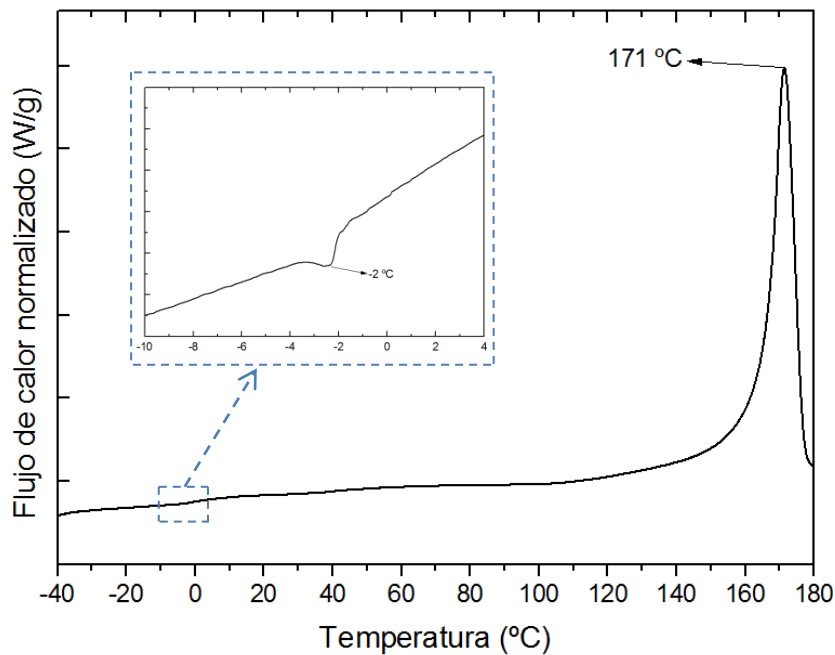
#### 3.3.2.1. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

En la Figura 3.6 y Figura 3.7 se muestran los termogramas correspondientes al segundo calentamiento de las muestras de PHA obtenido a partir de *B. megaterium* y PHB comercial, respectivamente. Ambos biopolímeros poseen una temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) de  $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , no obstante, existe un importante cambio en el perfil de fusión, el cual varía de dos picos a  $149\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $158\text{ }^{\circ}\text{C}$  para el PHA biosintetizado a simplemente uno en  $171\text{ }^{\circ}\text{C}$  para el PHB comercial. La presencia de dos picos en el termograma y los valores de temperatura de fusión obtenidos para el PHA son un indicio de la producción de un copolímero por parte de *B. megaterium* (Gahlawat & Soni, 2017; Porras, 2016).





**Figura 3.6.** Termograma correspondiente a la muestra de PHA obtenido a partir de *Bacillus megaterium*.



**Figura 3.7.** Termograma correspondiente a la muestra de PHB comercial.

Bloembergen *et al.* (1986) demostraron que existe una relación entre la temperatura de fusión ( $T_f$ ) del copolímero poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato), P(3HB-co-3HV), y el contenido de 3HV en el mismo. En su trabajo, dichos autores mencionan que la inclusión de unidades de HV dentro de la red cristalina del PHB provoca una disminución en la temperatura de

fusión del polímero. Siguiendo este concepto, se podría estimar la concentración de 3HV en el biopolímero producido mediante *B. megaterium* a partir de los resultados presentados por Anjum *et al.* (2016) que se muestran en la Tabla 3.2. Considerando la temperatura de fusión de la muestra biosintetizada y en base a lo reportado por dicho autor, se puede estimar que el biopolímero producido contiene en su estructura aproximadamente un 11 % de 3HV.

**Tabla 3.2.** Variación del contenido de copolímero en función de la temperatura y entalpía de fusión de P(3HB-co-3HV) (Anjum *et al.*, 2016).

Contenido de P(3HB-co-3HV) (mol% HV)	Temperatura de fusión (°C)
3	170
9	162
14	150
20	145
25	137

En la Tabla 3.3 se reportan la temperatura de fusión ( $T_f$ ), la temperatura de cristalización ( $T_c$ ), la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), la entalpía de fusión ( $\Delta H_f$ ) y el grado de cristalinidad ( $X_c$ ) de las muestras mencionadas comparadas con otros PHAs reportados en la literatura.

En acuerdo con lo observado por diversos autores que trabajaron con P(3HB-co-3HV), se obtuvieron dos picos que caracterizan la temperatura de fusión del copolímero (Thiré *et al.*, 2011; López-Rubio & Lagaron, 2010; Reddy *et al.*, 2009). Por otra parte, los valores de  $T_f$  medidos en el PHA producido en esta tesis, de 149 °C y 158 °C coinciden con lo reportado por Modi (2010), quien encontró valores similares para un P(3HB-co-3HV) comercial suministrado por la empresa Sigma-Aldrich con un contenido de 3HV del 12 %.

La temperatura de transición vítrea del biopolímero sintetizado y del comercial se mantuvo en aproximadamente -2 °C en concordancia con lo reportado por Thiré *et al.* (2011). Esto último, no coincide con la tendencia que menciona

Kaplan (1998) en su libro, donde se espera que la presencia de unidades del monómero HV disminuya la  $T_g$  del copolímero y le permita ser utilizado a temperaturas menores sin convertirse en un material frágil y vítreo.

Sin embargo, el PHA biosintetizado mostró una disminución en su temperatura de fusión (158 °C) en comparación con el PHB comercial analizado (171 °C). En consecuencia, se puede resaltar la ampliación de la ventana de procesamiento del biopolímero el cual puede ser fundido a menores temperaturas sin ser degradado (Marlina *et al.*, 2018). Por otro lado, el grado de cristalinidad del polímero biosintetizado resulta menor que el calculado para el PHB comercial. Esta información, toma importancia al momento de determinar las potenciales aplicaciones del biomaterial, ya que la disminución de la temperatura de fusión del PHA producido permite incrementar el rango de procesamiento sin que ocurra su degradación. Adicionalmente, el menor índice de cristalinidad comparado con el de PHB, implica un incremento en la velocidad de degradación ya que las regiones amorfas del polímero pueden ser degradadas más rápidamente que las regiones cristalinas (Porrás *et al.*, 2017).

La potencial capacidad de producir el copolímero P(3-HB-co-HV) por parte de la cepa autóctona *Bacillus megaterium* BBST4 plantea la posibilidad de aplicar este material biocompatible, biodegradable y no cancerígeno (Ali & Jamil, 2016) con fines médicos (Salgaonkar & Bragança, 2015). Algunos ejemplos que se pueden encontrar en la literatura son la implementación con propósitos ortopédicos (Chen & Zhang, 2017), suturas que puedan ser absorbidas por el cuerpo (He *et al.*, 2013) y regeneración de nervios neuronales (Ali & Jamil, 2016), entre otras aplicaciones relacionadas con la ingeniería de tejidos (Wang *et al.*, 2013).

**Tabla 3.3.** Propiedades térmicas de PHAs biosintetizados.

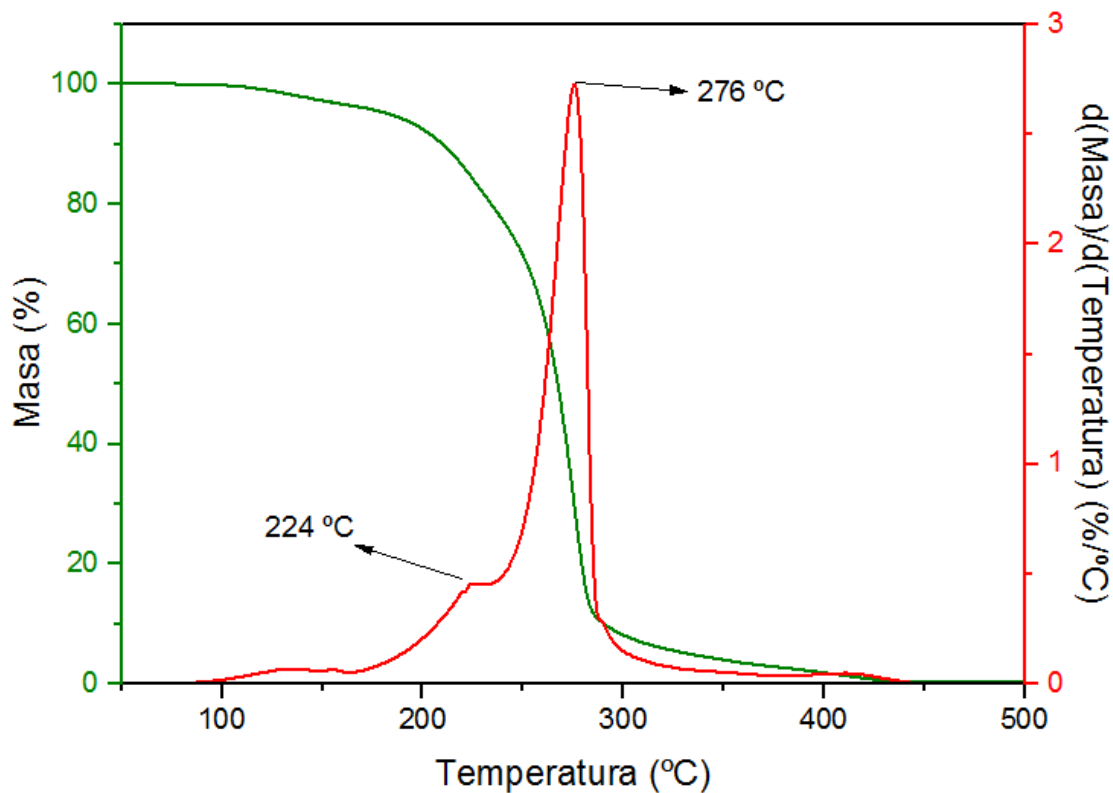
Biopolímero	$T_f$ (°C)	$T_c$ (°C)	$T_g$ (°C)	$\Delta H_f$ (J/g)	$X_c$ (%)	Referencia
PHA biosintetizado	148,9 158,5	89,0	-2,1	70,83	48,5	Este trabajo
PHV	112,3	58,4	-15,1	73,37	50,3	Wang <i>et al.</i> (2011)

P(3HB-co-3HV) (4,07 %HV)	152 168,58	46,2	-2,03	75,2	51,5	Thiré <i>et al.</i> (2011)
P(3HB-co-3HV) (5% HV)	147 164	-	-	69	47,3	Reddy <i>et al.</i> (2009)
P(3HB-co-3HV) (12% HV)	139 153,9	89,5	-	69,7	47,7	López-Rubio & Lagaron (2010)
PHB comercial	171,4	100,8	-2,2	77,45	53,0	Este trabajo
PHB	185,5	-	-	72,71	49,1	Wellen <i>et al.</i> (2013)
PHB	163,3	91,5	-3,1	70,64	48,4	Wang <i>et al.</i> (2011)
PHB	172	84	-	80	55,4	Asby <i>et al.</i> (2012)
PHB	170,6	91,8	-	89,8	61,5	López Jiménez (2011)

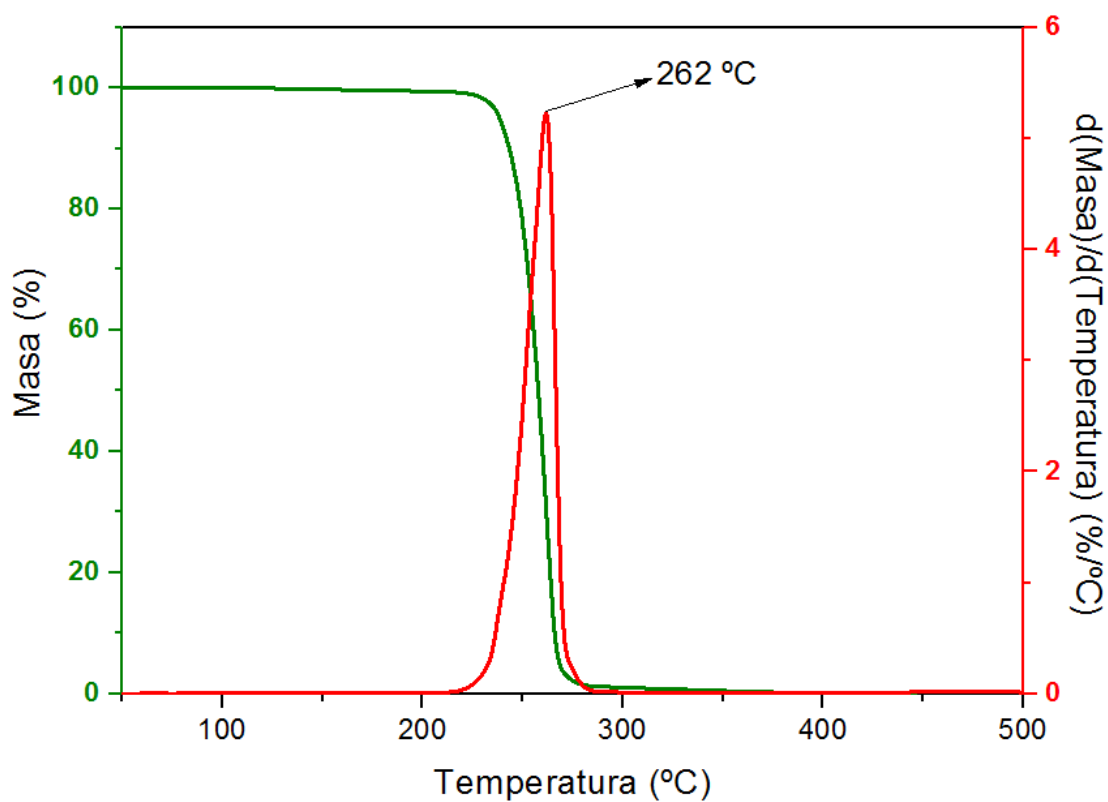
$T_f$ : Temperatura de fusión,  $T_c$ : Temperatura de cristalización,  $T_g$ : Temperatura de transición vítrea,  $\Delta H_f$ : Entalpía de fusión,  $X_c$ : Grado de cristalinidad.

### 3.3.2.2. Análisis termogravimétrico (TGA)

En las Figuras 3.8 y 3.9 se presentan los termogramas correspondientes a las muestras de PHA obtenido mediante biosíntesis a partir de *Bacillus megaterium* BBST4 y el PHB comercial, respectivamente. Se observa que el PHB comercial posee una temperatura de degradación,  $T_{d(50\%)}=262$  °C, menor que el biopolímero obtenido mediante la biosíntesis efectuada experimentalmente ( $T_{d(50\%)}=276$  °C). El incremento en la  $T_d$ , podría indicar la presencia de hidroxivalerato en el PHA biosintetizado. En este sentido, Carrasco *et al.* (2006) demostraron que la presencia de hidroxivalerato en el copolímero conduce a un material térmicamente más estable, ampliando su ventana de procesamiento.



**Figura 3.8.** TGA de la muestra de PHA obtenido a partir de *Bacillus megaterium*.



**Figura 3.9.** TGA de la muestra de PHB comercial.

El perfil correspondiente al PHA a partir de *B. megaterium* evidencia tres etapas de degradación que pueden observarse de mejor manera mediante las

curvas de DTGA. La primera de ellas ubicada entre 100 y 140 °C puede ser asociada a la pérdida de humedad remanente en el material, atribuida principalmente al proceso de extracción empleado (López *et al.*, 2015). La segunda etapa situada entre 170 y 240 °C (pico a 224 °C) probablemente se presenta debido a la descomposición de los componentes de bajo peso molecular presente en los enlaces del polímero (López García, 2012; López Jiménez, 2011; Eroğlu *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2001), mientras que, en la tercera etapa, comprendida entre 240 °C y 450 °C, se lleva a cabo la mayor pérdida de masa debido a la degradación térmica del biopolímero (pico 276 °C) (Höfer *et al.*, 2011).

En la Tabla 3.4 se presentan las temperaturas de degradación de los biopolímeros obtenidas en este capítulo mediante TGA como así también las correspondientes a PHB y P(3HB-co-3HV) reportadas por otros autores. Puede observarse que los resultados obtenidos en este análisis son similares a los reportados por diversos autores en la literatura para los polímeros estudiados.

Por otra parte, los termogramas corroboraron que las muestras del polímero biosintetizado, como así también del comercial, no contuvieron residuos inorgánicos. Esto último, resulta un punto favorable frente a lo reportado por otros autores que también obtuvieron experimentalmente el PHA (Rojas Fernández *et al.*, 2016; Han *et al.*, 2010; Gambetta, 2006) quienes hallaron un remanente de compuestos que no pudieron ser degradados.

**Tabla 3.4.** Temperatura de degradación de PHB y P(3HB-co-3HV) reportados en la literatura.

Biopolímero	HV(mol %)	Atmósfera	$T_{d(50\%)} (°C)$	Referencia
P(3-HB)	-	Aire	262	Este trabajo
P(3-HB)	-	Helio	267	Carrasco <i>et al.</i> (2006)
P(3-HB)	-	Aire	269	Aoyagi <i>et al.</i> (2002)
P(3-HB)	-	Nitrógeno	273	Höfer <i>et al.</i> (2011)
P(3HB-co-3HV)	11	Aire	276	Este trabajo
P(3HB-co-3HV)	12	Nitrógeno	271	López Garcia (2012)

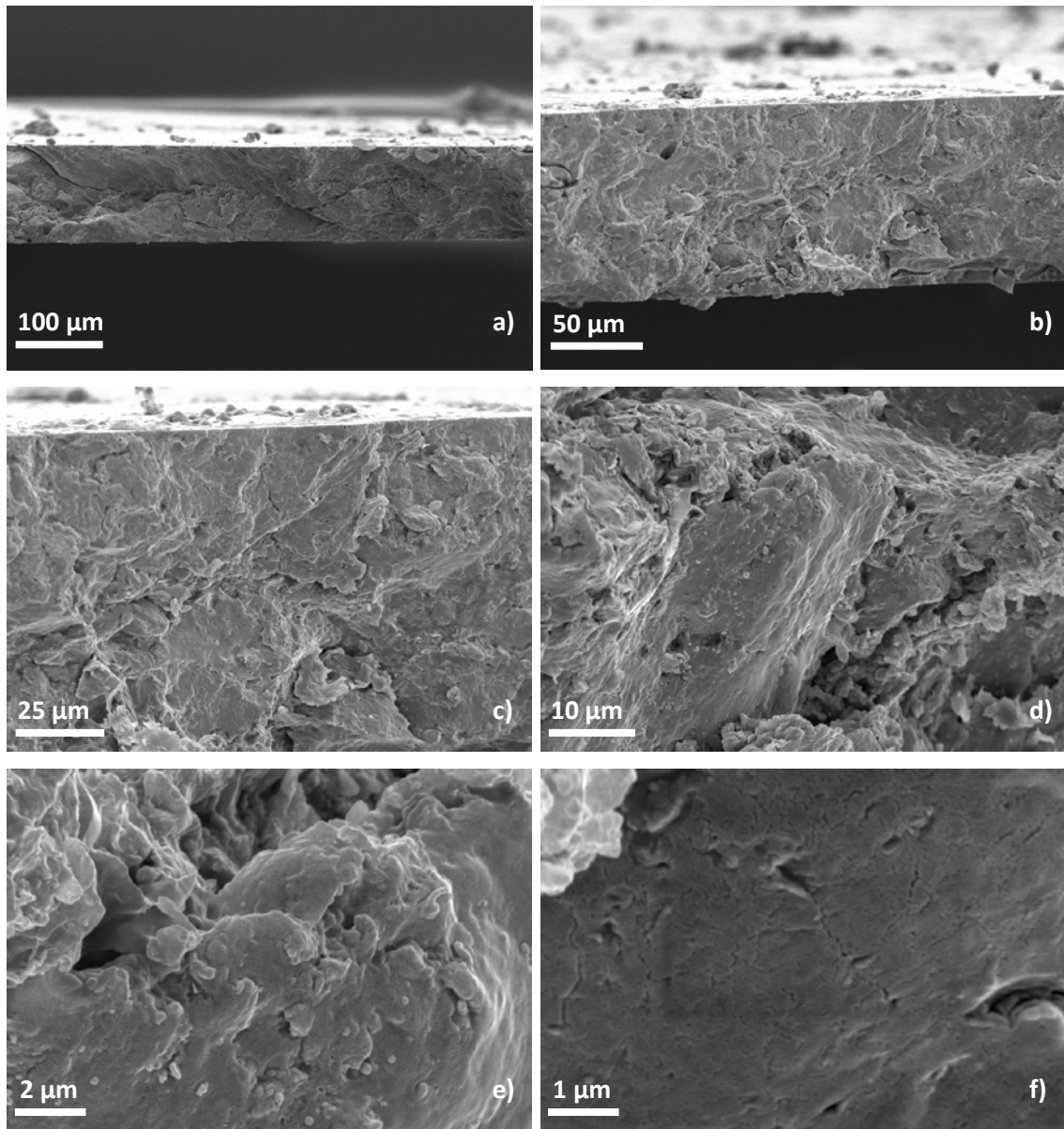
P(3HB-co-3HV)	4	Nitrógeno	274	Han <i>et al.</i> (2010)
P(3HB-co-3HV)	10	Aire	282	Carrasco <i>et al.</i> (2006)
P(3HB-co-3HV)	5	-	286	Tao <i>et al.</i> (2009)
P(3HB-co-3HV)	-	Nitrógeno	286	Thiré <i>et al.</i> (2011)

### 3.3.3. Caracterización morfológica de las películas generadas

#### 3.3.3.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las micrografías SEM correspondientes a las superficies criofracturadas de las películas se muestran en las Figuras 3.10 y 3.11. El método de termocompresión permitió la obtención de una película delgada de espesor aproximadamente constante ( $110,4 \pm 1,8 \mu\text{m}$ ) como puede observarse en la Figura 3.10 (a) para la película de PHA biosintetizado a partir de *B. megaterium*. La muestra estudiada presenta una superficie rugosa e irregular (Figura 3.10 (b) y Figura 3.10 (c)) con la presencia de grietas (Figura 3.10 (d)). Esto último podría ser el resultado de la poca concentración de monómero HV en la película de PHA estudiado. Choi *et al.* (2005) afirman que a mayores concentraciones de HV, la superficie criofracturada se vuelve muy regular y lisa. Estos autores observan que muestras con 17 % de HV poseen una rugosidad notoriamente superior en la superficie de fractura al compararla con muestras de P(HB-co-HV) que contienen 60 % de HV.

En la Figura 3.10 (e) puede visualizarse la existencia de pequeños poros, los cuales resultaron de aproximadamente 86,0 nm de diámetro, en coincidencia con los diámetros de orificios de 100 nm hallados en las películas de Arslan *et al.* (2007). Los diámetros de los poros fueron medidos luego de magnificar la imagen a 40000 x (Figura 3.10 (f)) y al realizarlo se pudo advertir la aparición de una marca rectangular luego de enfocar, indicando una mayor susceptibilidad a la irradiación por parte de esta película.



**Figura 3.10.** Micrografías SEM de la película de PHA biosintetizado.

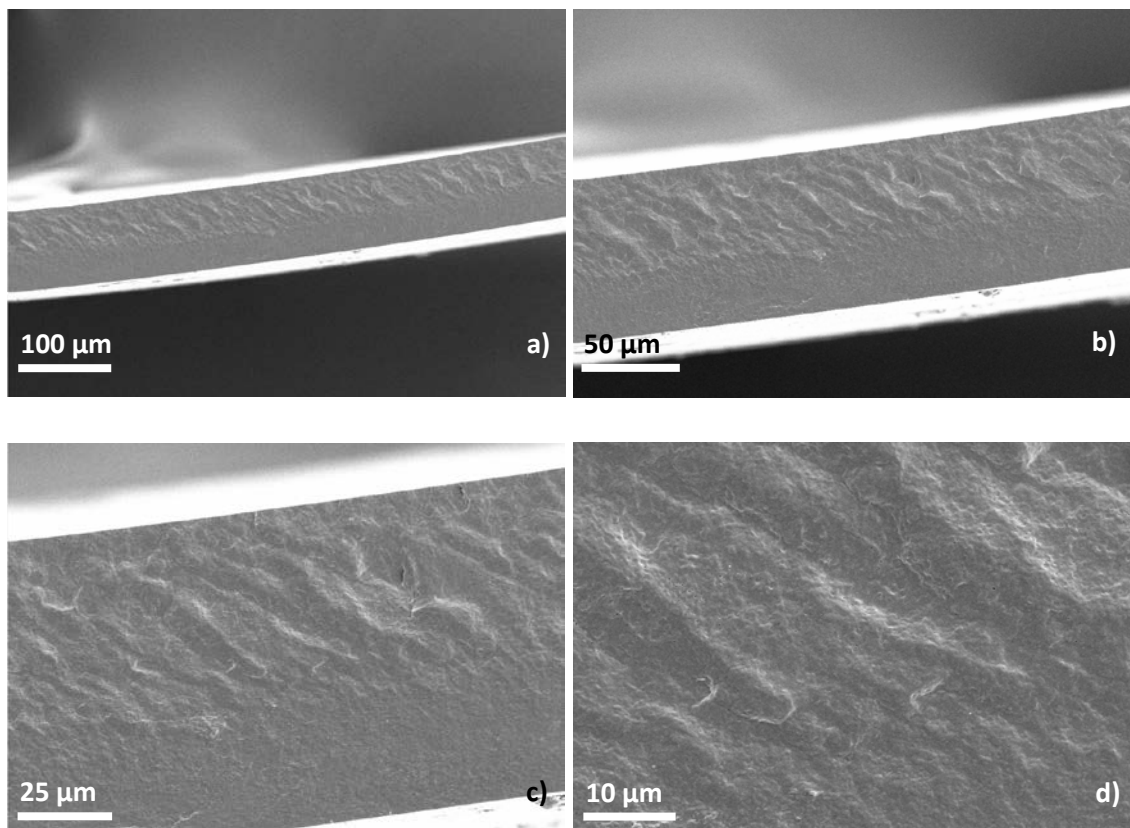
Magnificación: a) 500 x, b) 1000 x, c) 2000 x, d) 5000 x, e) 20000 x, f) 40000 x

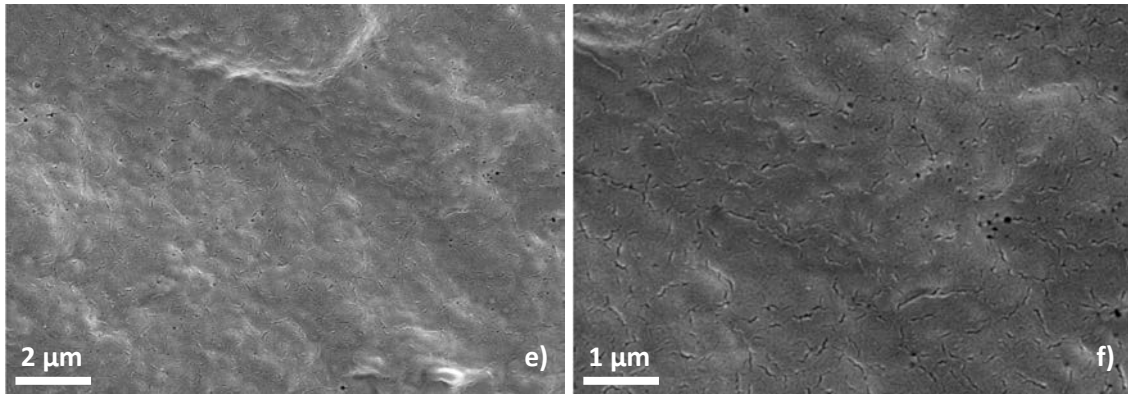
Por otra parte, en la Figura 3.11 se muestran las micrografías SEM de la superficie criofracturada correspondiente a la película de PHB comercial. El espesor de las misma resultó también en este caso ser uniforme ( $88,35 \pm 0,42 \mu\text{m}$ ) como se observa en la Figura 3.11 (a). A diferencia de las películas de PHA biosintetizado por *B. megaterium*, la superficie de la muestra de PHB comercial resulta más lisa (Figura 3.11 (b)) al igual que lo reportado por Romo-Uribe *et al.* (2017). Sin embargo, la Figura 3.11 (c) muestra una zona irregular característica del PHB, debido a su estructura cristalina (Abdelwahab *et al.*, 2012). Se requiere una amplificación de 5000 x (Figura 3.11 (d)) para comenzar



a percibir la presencia de diminutos poros los cuales se encuentran distribuidos uniformemente a lo largo de toda la superficie de la película. En este punto, vale destacar que Arslan *et al.* (2007) atribuyeron la existencia de poros en la matriz polimérica a la presencia de poli(metilmetakrilato). Sin embargo, no sería esa la razón por la cual este biopolímero los contiene en su topografía, ya que este en este trabajo se utilizó un PHB puro.

En la Figura 3.11 (e), además de apreciar las irregularidades del material, se puede distinguir una zona granulosa blanca, probablemente debido a que no todo el PHB alcanzó a fundirse completamente en las condiciones establecidas en la termocompresión. Finalmente, el tamaño de poros se midió al magnificar la imagen 40000 x (Figura 3.11 (e)) obteniendo diámetros de  $65,0 \pm 21,0$  nm, resaltando que su presencia se encuentra de manera localizada y no en toda la extensión de la superficie criofracturada como se observaba en la Figura 3.10.





**Figura 3.11** Micrografías SEM de la película de PHB comercial.

Magnificación: a) 500 x, b) 1000 x, c) 2000 x, d) 5000 x, e) 20000 x y f) 40000 x.

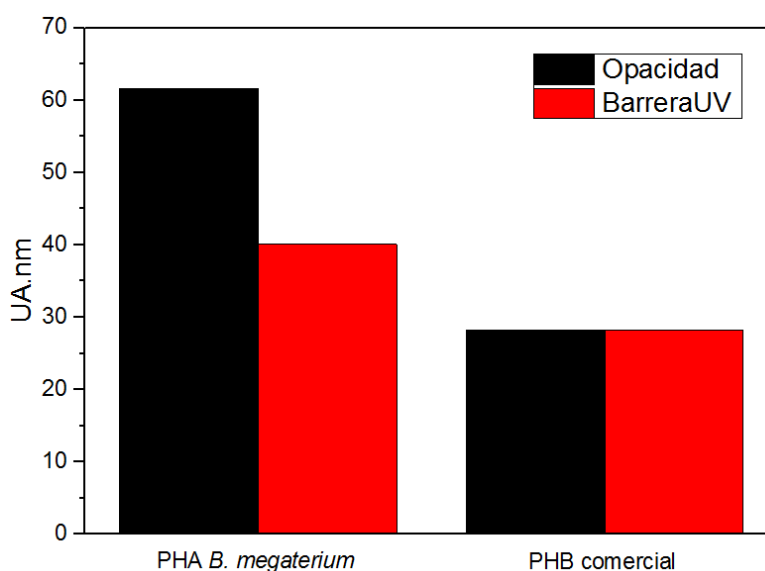
### 3.3.3.2. Propiedades ópticas

Uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta para los polímeros a la hora de definir sus potenciales aplicaciones es la determinación de sus propiedades ópticas. Por ejemplo, en el caso de emplearlos para envoltorios de alimentos, junto con la funcionalidad específica requerida, la apariencia visual del envase se convierte en un requisito muy importante por parte de los consumidores (D'Amico *et al.*, 2016). En consecuencia, en esta tesis se evalúan la opacidad y la capacidad de barrera a la radiación ultravioleta (UV) de las películas junto con el color de las mismas.

En la Figura 3.12 se presentan los resultados obtenidos a partir de las mediciones realizadas por espectrometría UV-vis. Como se puede observar, existe una marcada diferencia en la opacidad que presenta la película del PHA obtenido empleando *B. megaterium* frente a la correspondiente a PHB comercial. Esto último, sería un resultado desalentador para el caso que se quisiera emplear el polímero obtenido para aplicaciones como el envasado de alimentos. En este sentido, uno de los aspectos más importantes para la fabricación de materiales utilizados como envoltorios es su transparencia (Datta *et al.*, 1995).

Sin embargo, lo anteriormente mencionado podría relativizarse considerando que el PHA obtenido muestra un leve incremento de la habilidad para absorber radiación UV comparado con el PHB comercial. Esto último, es un resultado relevante en vistas de definir las potenciales aplicaciones de estos biomateriales. En este sentido, es conocido el agregado de PHB a las matrices

de otros biopolímeros para envases alimenticios debido a que este actúa como una apropiada barrera a la luz en la región del UV (250-400 nm) (Arrieta *et al.*, 2017). Por lo tanto, se podría pensar en desarrollar películas a partir de mezclas con otros biopolímeros transparentes, donde PHAs similares al obtenido en esta tesis sean utilizados para incrementar la capacidad de protección al UV (Tănase *et al.*, 2015).



**Figura 3.12.** Opacidad y capacidad de barrera al UV de la película de PHA obtenidas mediante *Bacillus megaterium* y PHB comercial.

Los parámetros de cromaticidad  $a$  y  $b$  junto con el de luminosidad  $L$  de las muestras estudiadas se resumen en la Tabla 3.5. La tonalidad ámbar que mostró la película de PHA generada coincide con lo reportado por Arrieta *et al.* (2014). Este color característico de los biopolímeros estudiados se determina a partir de valores positivos en los parámetros  $a$  y  $b$ , mostrando una leve tendencia al color rojo amarillento. Por otra parte, el PHA biosintetizado resultó más oscuro en relación al comercial, siendo esto evidenciado mediante un valor menor del parámetro de luminosidad  $L$ . Finalmente, la diferencia total de color  $\Delta E$  hallada entre ambos polímeros resultó ser de 45,6.

**Tabla 3.5.** Parámetros de color para las películas de biopolímero.

Biopolímero	Parámetros de color Hunter Lab			
	L	a	b	$\Delta E$
PHA <i>B. megaterium</i>	42,8	1,76	15,61	45,6
PHB comercial	79,3	-0,02	6,5	-

### 3.4. Conclusiones

En este capítulo se estudiaron las propiedades del PHA producido a partir de la cepa *Bacillus megaterium* durante los ensayos experimentales descritos en el Capítulo 2. Se emplearon distintas técnicas de caracterización de polímeros y las propiedades obtenidas se compararon con las correspondientes a un PHB comercial y a valores reportados en la literatura.

Los resultados de la caracterización estructural y térmica sugieren que el PHA producido podría ser identificado como P(3HB-co-HV) con un 11 % de HV. Esto último indica la biosíntesis de un material con propiedades mejoradas respecto al PHB, ampliando así el campo de sus potenciales aplicaciones.

Asimismo, la posibilidad de formar películas con el biopolímero producido permitió evaluar las características morfológicas de las mismas. En particular, las películas del copolímero se destacan por una mayor capacidad de barrera al UV en comparación al PHB comercial, lo cual resulta de especial interés para aplicaciones como el envasado de alimentos.

## CAPÍTULO 4

### MODELADO CINÉTICO Y ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS DE LA PRODUCCIÓN DE PHAs A PARTIR DE FUENTES DE CARBONO ALTERNATIVAS

#### 4.1. Introducción

En los últimos años, ha habido una creciente atención por el estudio del modelado de la producción de biopolímeros a través de diferentes bioprocesos. Esto se atribuye principalmente a la imperiosa necesidad de satisfacer los intereses relacionados con la producción de polímeros biodegradables. Específicamente, los biopoliésteres como el PHA, que pertenece a esta clase de materiales, han recibido especial atención debido a la similitud de sus propiedades mecánicas con las de los plásticos sintéticos convencionales como el polietileno y polipropileno (Spoljaric *et al.*, 2013a; Chen, 2009).

Numerosos autores han propuesto diferentes modelos para la biosíntesis de PHAs (Mozumder *et al.*, 2014), con el fin de mejorar los rendimientos y productividades de los biopolímeros y lograr una reducción de los costos de producción. Algunos de los modelos que se pueden encontrar en la literatura son los mencionados a continuación: cinéticos (Spoljaric *et al.*, 2013b), metabólicos (Lasry Testa *et al.*, 2019), cibernéticos (Gadkar *et al.*, 2003) e híbridos (Zafar *et al.*, 2012). Los modelos matemáticos simplificados como los cinéticos no estructurados o semi estructurados, constituyen una herramienta útil que puede ser empleada en investigaciones tanto a nivel laboratorio como con fines industriales, donde se requieren rápidas verificaciones de las propuestas de trabajo (Shahhosseini, 2004). En efecto, Novak *et al.* (2015) presentan un estado del arte de los modelos matemáticos existentes para la producción de PHA y concluyen que, para cultivos bacterianos estándares, los modelos cinéticos resultan en la mayoría de los casos lo suficientemente precisos y eficientes.

En este sentido, en la literatura se pueden encontrar modelos como el que presentan Mulchandani *et al.* (1989), calibrados con sus datos experimentales obtenidos en la producción batch de PHB mediante *Alcaligenes eutrophus* a partir de fructosa y sulfato de amonio como fuentes de carbono y nitrógeno,

respectivamente. Estos autores observan que la velocidad específica de crecimiento del microorganismo depende fuertemente de la fuente de nitrógeno, por lo tanto, proponen una expresión cinética que tiene en cuenta un término de inhibición por sustrato. En pos de lograr mejoras en la producción de PHB, Raje & Srivastava (1998) sugieren un modo semibatch para la operación del biorreactor. Para esto, en primer lugar estudian la cinética de *Alcaligenes eutrophus* en un cultivo batch y luego presentan una modificación al modelo presentado por Mulchandani *et al.* (1989). Esto se debe a que las ecuaciones cinéticas deben considerar no solo la limitación por nitrógeno, sino también la relación carbono/nitrógeno (C/N). Con esta modificación, los autores realizan una estimación de parámetros con los datos provistos por los experimentos en modo batch para luego desarrollar un modelo que represente la operación del biorreactor en modo semibatch. Finalmente, usan este modelo para realizar simulaciones de las distintas estrategias de alimentación de los nutrientes para este último caso.

De modo similar, Khanna & Srivastava (2006) extienden su modelo cinético previo (Khanna & Srivastava, 2005) del cultivo de *Ralstonia eutropha* hacia un modelo semibatch. Posteriormente, estos investigadores realizan simulaciones computacionales offline implementando dos estrategias de alimentación diferentes. De este modo, verifican un incremento significativo en la productividad del biopolímero en relación al modo de operación del batch. Más recientemente, Muzumder *et al.* (2014) desarrollan un modelo matemático para la producción de PHB mediante un cultivo heterotrófico de *Cupriavidus necator*. El objetivo es describir las fases relacionadas con el crecimiento de la biomasa y la etapa correspondiente a la biosíntesis del polímero. Para ello realizan un análisis de sensibilidad seguido de una calibración del modelo para estimar los valores de los parámetros más sensibles. Luego de evaluar varias estructuras del modelo, reconocen la importancia de ciertos aspectos como la inhibición por densidad celular y consumo de PHB para el crecimiento de la biomasa, los cuales no habían sido previamente considerados en cultivos para la producción de PHB.

Para contar con un mejor entendimiento del comportamiento del microorganismo productor de PHAs a lo largo del tiempo, es sumamente

recomendable la implementación de modelos mecanísticos de los bioprocesos. Estos modelos determinísticos basados en los balances de masa para los sustratos, producto y biomasa son un requisito indispensable para describir de manera eficiente la dinámica de un bioproceso (Wang *et al.*, 2015). Al mismo tiempo, pueden ser utilizados para predecir el desarrollo del proceso en diferentes condiciones operativas, proporcionando los perfiles de concentración temporal de las principales componentes del sistema. Entre sus aplicaciones, se encuentra la posibilidad de efectuar una extrapolación hacia cultivos semibatch mediante el agregado de un término de dilución, lo cual permitiría el estudio de estrategias de alimentación en vistas a lograr mejoras en la producción de biopolímeros (Patwardhan & Srivastava, 2004). Asimismo, industrias que posean una carencia de sensores apropiados para el seguimiento de este tipo de bioprocesos, podrían emplear esta clase de modelos para efectuar optimizaciones dinámicas a fin de mejorar la productividad (López *et al.*, 2010). Finalmente, esta herramienta predictiva podría contribuir a minimizar tiempo experimental y, consecuentemente, reducir los costos de llevar a cabo múltiples pruebas de laboratorio para lograr optimizar el proceso (Porras *et al.*, 2019).

Si bien existen antecedentes de modelado matemático para la descripción de la cinética de un cultivo de *Bacillus megaterium* (Luvizetto Faccin *et al.*, 2012), no se ha encontrado en la literatura un modelo cinético para esta cepa que tenga en cuenta, para su crecimiento, fuentes de carbono alternativas como el almidón y el glicerol en un medio mineral mínimo. Por este motivo, en este capítulo se propone un modelo matemático que considera la producción de biopolímeros mediante la cepa autóctona *Bacillus megaterium* BBST4 empleando como sustratos principales almidón, en un primer caso, y glicerol, en un segundo proceso. El bioproceso se representa mediante un sistema de ecuaciones diferenciales algebraicas. Este modelo se basa en las cinéticas de bioreacción del cultivo de *B. megaterium* y se consideran las principales variables de estado (biomasa, sustratos y producto). Para calibrar el modelo implementado, considerando almidón como fuente de carbono, se utilizan los datos experimentales presentados en el marco de la tesis doctoral del Dr. Mauricio Porrás (Porrás, 2016), formulando un problema de estimación

dinámica de parámetros en un entorno de optimización orientado a ecuaciones, en gPROMS (PSEnterprise, 2017). Para ajustar el modelo en el caso donde se emplea glicerol como sustrato, se utiliza parte de los datos presentados en el Capítulo 2 de esta tesis, obtenidos durante la estadía realizada en la Universidad Federal de Rio de Janeiro, Brasil. En este caso, se emplea un enfoque de optimización simultánea donde las ecuaciones diferenciales y algebraicas se discretizan por colocación ortogonal sobre elementos finitos, en GAMS (McCarl *et al.*, 2017) en el marco de un problema de estimación de parámetros.

## **4.2. Materiales y métodos**

### **4.2.1. Determinaciones experimentales**

Los datos experimentales del cultivo discontinuo (*batch*) de *B. megaterium* que se emplean en este capítulo para la estimación de parámetros corresponden a dos experiencias llevadas a cabo con diferentes condiciones de cultivo.

La primera de ellas pertenece al trabajo realizado por el Dr. Mauricio Porras en su tesis doctoral (Porras, 2016) y posteriormente publicados en un trabajo presentado en conjunto (Porras *et al.*, 2019). En este caso, se evalúa la producción de biopolímero a partir de *B. megaterium* empleando almidón como fuente de carbono en presencia de bajas concentraciones de extracto de levadura a fin de fomentar la ruptura de las cadenas del sustrato. Luego de optimizar el medio de cultivo mediante una metodología de superficie de respuesta (MSR) y deseabilidad en base a un diseño experimental central compuesto (DCC), se establecen las condiciones iniciales de las experiencias que se emplean para la estimación de parámetros. A continuación se reportan las concentraciones iniciales de los experimentos denominados DCA y DCB. DCA: 15 g/L y 0,02 g/L de almidón y extracto de levadura, respectivamente; y DCB: 5 g/L y 0,08 g/L de almidón y extracto de levadura, respectivamente. Asimismo, se llevaron a cabo experiencias adicionales con el objetivo de contar con un set de datos independientes y realizar una validación del modelo. Los experimentos empleados para este fin se denominan DCAVal y DCBVal con las mismas condiciones iniciales de sustrato que DCA y DCB, respectivamente.



Por otro lado, para el modelado matemático del proceso de biosíntesis de PHA con *B. megaterium* a partir de glicerol, se emplea la información obtenida mediante los ensayos experimentales presentados en el Capítulo 2, particularmente, aquellos que se llevan a cabo en Erlenmeyer con 20 g/L y 2 g/L de glicerol y urea, respectivamente. En este sentido, el conjunto de datos utilizado para la calibración del modelo se denomina ERL.

#### 4.2.2. Modelo cinético

En este capítulo se tiene en cuenta una combinación de los diferentes aspectos de los modelos matemáticos previamente desarrollados por otros autores, presentados en la revisión bibliográfica realizada por Novak *et al.* (2015).

El objetivo principal es formular un modelo mecanístico apropiado que ayude a comprender la relación que existe entre las principales variables de estado (crecimiento de la biomasa total, producción de PHA, consumo de la fuente de carbono, nitrógeno y fósforo; y la variación de pH) y proveer información sobre el comportamiento del sistema microbiológico. La formulación de los balances de masa de cada uno de los componentes principales del bioproceso da lugar a un sistema de ecuaciones diferencial algebraico (DAE) no lineal. La resolución del mismo determina los perfiles temporales de las concentraciones de las mencionadas variables de estado. A continuación se presentan las ecuaciones consideradas en este modelo.

Teniendo en cuenta las suposiciones realizadas por Patwardhan & Srivastava (2004), la biomasa total ( $X$ ), en  $g_X/L$ , se expresa como la contribución de dos componentes: la biomasa residual ( $R$ ), en  $g_R/L$ , que es el componente catalítico activo de las células; y la concentración del biopolímero ( $P$ ), en  $g_P/L$ , el cual se considera como un componente inerte.

$$X = R + P \quad (4.1)$$

Dado que la cepa *B. megaterium* es un productor de PHAs para el caso donde existe un exceso de la fuente de carbono (Rehm, 2003; Lee, 1996), la ecuación de la cinética de crecimiento ( $\mu$ ) empleada solo tiene en cuenta un término de limitación por la fuente de nitrógeno basado en el modelo de Monod (1942) y

un término que considera la influencia del pH de acuerdo a la formulación presentada por Akerberg *et al.* (1998).

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \left( \frac{S_2}{K_{S_2} + S_2} \right) \left( 1 - \frac{k_{1H}}{H} + k_{2H} \cdot H \right)^{-1} \quad (4.2)$$

donde  $\mu_{m\acute{a}x}$  es la tasa máxima de crecimiento del microorganismo, en  $h^{-1}$ ;  $K_{S_2}$  es la constante de saturación basada en la concentración de nitrógeno, en  $g_{S_2}/L$ ;  $k_{1H}$  y  $k_{2H}$  son constantes asociadas a la producción de iones hidrógeno, en  $g_{H^+}/L$  y  $L/g_{H^+}$ , respectivamente.

La biomasa residual ( $R$ ) se puede considerar principalmente como proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares de los microorganismos (exceptuando la acumulación intracelular de polímero). Asimismo, la ecuación de la variación de biomasa residual en función del tiempo presenta un término de muerte celular ( $k_d$ ), en  $h^{-1}$ , para tener en cuenta la situación donde la bacteria alcance la fase de muerte.

$$\frac{dR}{dt} = (\mu - k_d)R \quad (4.3)$$

Las ecuaciones de los balances de masa empleadas para la producción del biopolímero ( $P$ ), y los consumos de las fuentes de carbono ( $S_1$ ), nitrógeno ( $S_2$ ) y fósforo ( $S_3$ ), corresponden a las presentadas por Delpino *et al.* (2014), Luvizetto Faccin *et al.* (2012) y Khanna & Srivastava (2008).

$$\frac{dP}{dt} = (\mu \cdot k_1 \cdot \Phi - k_2)R \quad (4.4)$$

$$\frac{dS_1}{dt} = - \left( k_3 \frac{dR}{dt} + k_4 \frac{dP}{dt} + k_5 \cdot R \right) \quad (4.5)$$

$$\frac{dS_2}{dt} = - \left( \frac{\mu}{Y_{R/S_2}} + m_{S_2} \right) R \quad (4.6)$$

$$\frac{dS_3}{dt} = - \frac{\mu}{Y_{R/S_3}} R \quad (4.7)$$

donde  $k_1$  es una constante asociada a la formación de producto en la fase de crecimiento, en  $g_P/g_R$ ;  $k_2$  es una constante asociada a la formación de producto

en la fase estacionaria, en  $g_P/(g_R \cdot h)$ ;  $k_3$  es un parámetro asociado a la velocidad de crecimiento en el consumo de la fuente de carbono, en  $g_{S1}/g_R$ ;  $k_4$  es una constante asociado a la tasa de producción del biopolímero debido al consumo de la fuente de carbono, en  $g_{S1}/g_P$ ;  $k_5$  es un parámetro del consumo de la fuente de carbono asociado a la fase estacionaria del microorganismo, en  $g_{S1}/(g_R \cdot h)$ ;  $Y_{R/S2}$  e  $Y_{R/S3}$  son rendimientos de la biomasa residual en función de la fuente de nitrógeno y fósforo, en  $g_R/g_{S2}$  y  $g_R/g_{S3}$ , respectivamente;  $m_{S2}$  es un coeficiente de mantenimiento celular basado en la fuente de nitrógeno, en  $g_{S2}/(g_R \cdot h)$  y  $\Phi$  es un factor de corrección debido a la formación de producto la cual tiene una expresión propuesta por Luvizetto Faccin *et al.* (2012) que viene dada por la siguiente ecuación:

$$\Phi = \frac{R}{R + R_{half}} \quad (4.8)$$

donde  $R_{half}$  es la concentración de la biomasa residual en el momento que la tasa de acumulación de producto decrece a la mitad, en  $g_R/L$ .

Finalmente, para representar el pH del medio de cultivo se incluyen dos ecuaciones a fin de obtener un ajuste eficiente de los datos experimentales. La primera de ellas, ecuación (4.9), considera la concentración de iones hidrógeno ( $H$ ), en  $g_H^+/L$ , mientras que la segunda, ecuación (4.10), es la inversa del logaritmo decimal de esta concentración, el pH.

$$\frac{dH}{dt} = (k_{ph1} \cdot \mu \cdot \Phi + k_{ph2}) X \cdot H \quad (4.9)$$

$$pH = -\log_{10}(H) \quad (4.10)$$

donde  $k_{ph1}$  y  $k_{ph2}$  son parámetros asociados a los cambios de acidez en el medio de cultivo debido al microorganismo empleado, en  $L/g_X$  y  $L/(g_X \cdot h)$ .

El modelo matemático propuesto incluye 6 ecuaciones diferenciales, 4 ecuaciones algebraicas, 11 variables y 16 parámetros.

### 4.2.3. Problema de estimación dinámica de parámetros

El problema de estimación de parámetros planteado con los datos DCA y DCB se formula en el marco de una optimización dinámica en gPROMS (PSEnterprise, 2017) con una función objetivo de máxima verosimilitud (*Maximum likelihood*) sujeto al modelo propuesto que describe el comportamiento cinético de *B. megaterium* BBST4. El algoritmo de optimización determina los valores de los parámetros cinéticos inciertos ( $\mathbf{p}$ ) y los correspondientes al modelo de la varianza ( $\sigma$ ), tal que se maximice la probabilidad que el modelo prediga los valores de las mediciones obtenidas experimentalmente. Asumiendo varianza constante para las mediciones, la función objetivo corresponde a la de cuadrados mínimos ponderados y el problema de optimización restringido por un sistema diferencial algebraico (DAE, por sus siglas en inglés) resultante se formula como se muestra a continuación:

$$\phi = \min_{\mathbf{p}} \left( \sum_{i=1}^{NM} \sum_{j=1}^{NT} \left[ \ln(\sigma_{ij}^2) + \frac{(\mathbf{z}_{ij}^M - \mathbf{z}_{ij})^2}{\sigma_{ij}^2} \right] \right) \quad (4.11)$$

s. t.

Modelo DAE (Ecuaciones 4.1-4.10)

$$\mathbf{z}_i(0) = \mathbf{z}_i^0$$

$$\mathbf{z}^L \leq \mathbf{z} \leq \mathbf{z}^U$$

$$\mathbf{p}^L \leq \mathbf{p} \leq \mathbf{p}^U$$

donde las sumatorias en la función objetivo ( $\phi$ ) se realizan sobre  $NM$  variables de estado medidas ( $i$ ) y  $NT$  puntos experimentales para cada variable medida;  $\sigma_{ij}^2$  es la varianza del error en la medición  $j$  de la variable  $i$  la cual se determina por el modelo de varianza de las variables medidas (varianza constante);  $\mathbf{z}_{ij}^M$  es la medición  $j$ -ésima de la variable  $i$ ; y  $\mathbf{z}_{ij}$  es la predicción  $j$ -ésima por parte del modelo de la variable  $i$ . El vector  $\mathbf{z}_i(0)$  incluye los valores iniciales de las variables diferenciales y el vector  $\mathbf{p}$  representa el set de parámetros a ser estimados por el modelo. Los valores de las variables de estado (vector  $\mathbf{z}$ )

pueden variar entre las cotas inferiores ( $z^L$ ) y superiores ( $z^U$ ). Asimismo, los valores de los parámetros estimados por el modelo deberán encontrarse dentro de los límites inferiores ( $p^L$ ) y superiores ( $p^U$ ) establecidos según información de la literatura (Pérez Rivero *et al.*, 2016; Luvizetto Faccin *et al.*, 2012; Somashekara *et al.*, 2009).

Por otra parte, el problema de estimación de parámetros para la experiencia ERL se formula también como un problema de cuadrados mínimos ponderados, en un entorno de optimización restringido por el modelo DAE que incluye la cinética de crecimiento y producción de *B. megaterium*. Dicho problema se resuelve con un enfoque simultáneo, en GAMS.

El desempeño del modelo se evalúa mediante métodos cualitativos y cuantitativos (Rodríguez Reartes *et al.*, 2016). Para las pruebas cualitativas, se comparan los resultados obtenidos mediante el modelo propuesto con los datos experimentales y se analizan ambos teniendo en cuenta aspectos conceptuales, junto con la capacidad del modelo de representar la tendencia que posee el comportamiento del sistema en estudio. Por otro lado, se realizan tres medidas cuantitativas calculadas en base a los valores medios de las principales variables de estado del modelo. El primero de ellos es el error medio ( $EM$ ), ecuación (4.13), que calcula la media de los residuales (la cual debería ser cercana a cero) e indica la tendencia del modelo a sobre o subestimar una variable. El segundo estadístico que se aplica es el índice de concordancia ( $d$ ), ecuación (4.14), el cual varía entre 0 y 1, donde valores cercanos a la unidad implican una mayor concordancia de las simulaciones del modelo con los datos que se obtienen experimentalmente (Willmott, 1981). En último lugar, se emplea una medida del error relativo ( $ER$ ), ecuación (4.15), el cual caracteriza la exactitud del modelo propuesto.

$$EM = \frac{\sum_{n=1}^{k=1} (y_k^* - y_k)}{n} \quad (4.13)$$

$$d = \frac{\sum_{n=1}^{k=1} (y_k^* - y_k)^2}{\sum_{n=1}^{k=1} (|(y_k - \bar{y})| + |(y_k^* - \bar{y})|)^2} \quad (4.14)$$

$$ER = \frac{\sum_{n=1}^{k=1} |y_k^* - y_k|}{\sum_{n=1}^{k=1} y_k} \quad (4.15)$$

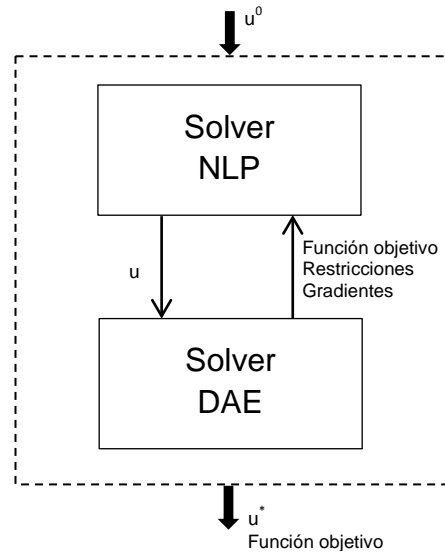
donde  $y_k^*$  e  $y_k$  son los valores medidos y calculados por el modelo, respectivamente;  $\bar{y}$  es la media de los valores medidos; y  $n$  es el número total de mediciones de la variable que se está analizando.

Los datos de entrada necesarios para resolver el problema de estimación de parámetros son: (i) valores de los parámetros cinéticos calculados o conocidos, (ii) condiciones iniciales para las variables diferenciales, (iii) cotas inferiores y superiores para las variables diferenciales y para los parámetros a estimar, (iv) perfiles experimentales de las concentraciones de las variables diferenciales del modelo presentado.

A continuación de la resolución del problema de estimación de parámetros en base a la información experimental, se lleva a cabo una validación del modelo con un conjunto de datos independiente.

#### 4.2.4. Algoritmos de optimización

El problema de optimización dinámico para la producción de PHAs a partir de almidón y extracto de levadura (DCA y DCB) se formula y resuelve en un entorno de optimización dinámica secuencial, en gPROMS (PSEnterprise, 2017) mediante la utilización de la herramienta gEST para estimación de parámetros (ver Figura 4.1). El solver empleado es MXLKHD, el cual utiliza una estrategia BDF (*Backward Differentiation Formulae*), con técnicas de matrices ralas, en la rutina DASOLV para la resolución del sistema de ecuaciones diferencial algebraico y el cálculo de derivadas. La información de las ecuaciones del modelo (gradientes de las restricciones y función objetivo respecto de los parámetros en cada instante de tiempo) se emplea en el problema de programación no lineal (NLP) del lazo exterior para determinar la dirección de búsqueda en el espacio de los parámetros a determinar. El problema NLP se resuelve mediante un algoritmo de Programación Cuadrática Sucesiva el cual se encuentra implementado en el solver SRQPD.



**Figura 4.1.** Enfoque de resolución secuencial en gPROMS.

\$u\$: vector de variables de optimización. Modificada de Diaz & Biegler (2015).

Asimismo, y con el objetivo de estudiar estrategias de optimización dinámica simultánea, el problema de optimización para la producción de PHAs a partir de glicerol (ERL) se formula mediante discretización de todas las variables utilizando colocación ortogonal sobre elementos finitos (Zavala *et al.*, 2008). De este modo, el problema de optimización sujeto al sistema DAE se transforma en un problema de programación no lineal (NLP) de mayor tamaño. Esta formulación NLP resultante se resuelve en GAMS (McCarl *et al.*, 2017) utilizando algoritmos de Programación Cuadrática Sucesiva (SQP), dentro de un método de Punto Interior o de Barrera (Wächter & Biegler, 2006) en el programa IPOPT (Diaz & Biegler, 2015; Zavala & Biegler, 2006;).

#### 4.2.4.1 Colocación ortogonal sobre elementos finitos en problemas de optimización dinámica

Al emplear un enfoque simultáneo, las variables de estado diferenciales y algebraicas se discretizan por colocación ortogonal con respecto al tiempo sobre un dado número de elementos finitos (NF) (Biegler *et al.*, 2002) como se muestra a continuación:

$$z(t) = z_{f-1} + h_f \sum_{q=1}^{NC} \Omega_q \left( \frac{t - t_{f-1}}{h_f} \right) \frac{dz}{dt_{f,q}} \quad (4.16)$$

donde  $z_{f-1}$  es el valor de la variable de estado diferencial al principio del elemento  $f$ ;  $h_f$  es la longitud del elemento  $f$ ;  $dz/dt_{f,q}$  es el valor de su derivada primera en el elemento  $f$  y el punto de colocación  $q$ ; y  $\Omega_q$  es el polinomio de grado  $NC$  que satisface las siguientes condiciones:

$$\Omega_q(0) = 0 \quad q = 1, \dots, NC \quad (4.17)$$

$$\Omega'_q(\rho_r) = \delta_{q,r} \quad q, r = 1, \dots, NC \quad (4.18)$$

donde  $\delta_{q,r} \in [0,1]$  es la ubicación del  $r$ -ésimo punto de colocación dentro de un elemento normalizado (relacionado a  $t_{fr} = t_{f-1} + h_f \rho_r$ ).

En este punto, vale resaltar que  $z_0$  (al comienzo del primer elemento) se especifica por la condición inicial para el sistema DAE, mientras que la continuidad de las variables de estado diferenciales entre el elemento  $f$  y  $f + 1$  se mantiene mediante la siguiente definición de  $z_f$ :

$$z_f = z_{f-1} + h_f \sum_{q=1}^{NC} \Omega_q(1) \frac{dz}{dt_{f,q}} \quad (4.19)$$

De manera similar, los perfiles de las variables de estado algebraicas se aproximan como se muestra a continuación, resaltando que, a diferencia de las variables de estado diferenciales, estos pueden tener discontinuidades en las fronteras de los elementos finitos:

$$y_f = \sum_{q=1}^{NC} \Psi_q \left( \frac{t - t_{i-1}}{h_i} \right) y_{f,q} \quad (4.20)$$

donde  $y_{f,q}$  representa los valores de las variables de estado algebraicas en el elemento  $f$  y el punto de colocación  $q$ ;  $\Psi_q$  es el polinomio de Lagrange de orden  $NC - 1$  que satisface:

$$\Psi_q(\rho_r) = \delta_{q,r} \quad q, r = 1, \dots, NC \quad (4.21)$$

Por lo tanto, la sustitución de estos polinomios en el sistema DAE, conduce a las siguientes ecuaciones algebraicas:



$$z_{f,q} = z_{f-1} + h_f \sum_{q=1}^{NC} \Omega_q(\rho_q) \frac{dz}{dt_{f,q}} \quad (4.22)$$

$$z_f = z_{f-1} + h_f \sum_{q=1}^{NC} \Omega_q(1) \frac{dz}{dt_{f,q}} \quad (4.23)$$

$$\frac{dz}{dt_{f,q}} = f(z_{f,q}, y_{f,q}, p) \quad (4.24)$$

De esta manera, el problema de optimización dinámica se puede reformular como el siguiente NLP:

$$\text{Min } F(x) \quad (4.25)$$

s. t.

$$h(x) = 0$$

$$x^L \leq x \leq x^U$$

donde  $x = (dz/dt_{f,q}, z_f, y_{f,q}, p)^T$ ,  $F: \mathfrak{R}^n \rightarrow \mathfrak{R}$ ;  $z: \mathfrak{R}^n \rightarrow \mathfrak{R}^m$

En el enfoque simultáneo, la solución del sistema DAE se acopla directamente con el problema de optimización y, por lo tanto, este sistema DAE se resuelve una única vez, en el punto óptimo, evitando soluciones intermedias que pueden no existir o requieran un esfuerzo computacional excesivo (Biegler *et al.*, 2002).

### 4.3. Resultados y discusión

#### 4.3.1. Cultivo de *B. megaterium* empleando almidón y extracto de levadura como sustratos

El problema de estimación de parámetros sujeto al modelo cinético propuesto posee 5 ecuaciones diferenciales y 4 ecuaciones algebraicas. En la Tabla 4.1 se resumen las métricas del problema de estimación de parámetros para las experiencias DCA y DCB. Como puede observarse, la resolución del problema de optimización para ambos casos resulta comparable, ya que el tiempo total de resolución, el número de iteraciones y los estadísticos calculados que indican la bondad del ajuste ( $\chi^2$  y residuos ponderados) reflejan un nivel de complejidad muy similar.

**Tabla 4.1.** Principales métricas del problema de estimación de parámetros para las experiencias DCA y DCB.

Métrica	DCA	DCB
Valor inicial de la función objetivo	486,8	969,0
Valor final de la función objetivo	16,9	7,8
Iteraciones	24	26
Tiempo total de CPU (s)	1,5	1,9
$\chi^2$ <sup>a</sup>	22,4	24,9
Residuos ponderados	17,4	18,5

<sup>a</sup>Buen ajuste: Residuos ponderados menores que el valor de chi-cuadrado

En la Tabla 4.2 se muestran los valores óptimos de los parámetros estimados para el modelo propuesto, en base a los datos experimentales de las experiencias DCA y DCB. Los parámetros señalados con un asterisco (\*) se asumen con un valor igual al de los empleados por Luvizetto Faccin *et al.* (2012).

**Tabla 4.2.** Set de parámetros óptimos para el modelo de producción de PHA a partir de *B. megaterium* BBST4 (Experiencia DCA y DCB).

Parámetros	Unidades	Valores óptimos	
		DCA	DCB
$\mu_{m\acute{a}x}$	$h^{-1}$	1,996	3,100*
$K_{S2}$	$g_{S2}/L$	7,002	5,384
$k_d$	$h^{-1}$	0	0
$k_1$	$g_P/g_R$	0,222	0,189
$k_2$	$g_P/(g_R \cdot h)$	$8,39 \cdot 10^{-5}$	$1,49 \cdot 10^{-3}$
$k_3$	$g_{S1}/g_R$	0,9894*	0,9894*
$k_4$	$g_{S1}/g_P$	22,9601	5,983
$k_5$	$g_{S1}/(g_R \cdot h)$	$4,92 \cdot 10^{-3}$	0,010
$Y_{R/S2}$	$g_R/g_{S2}$	2,895	2,798

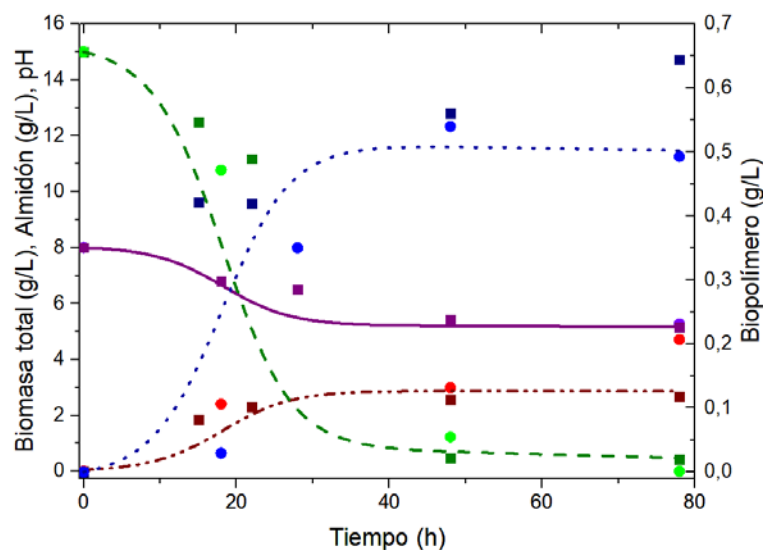
$m_{S2}$	$g_{S2}/(g_R \cdot h)$	$1,73 \cdot 10^{-6*}$	$1,73 \cdot 10^{-6*}$
$k_{ph1}$	$L/g_X$	$2,2873^*$	$1,398$
$k_{ph2}$	$L/(g_X \cdot h)$	$8,07 \cdot 10^{-4}$	$1,95 \cdot 10^{-3}$
$k_{1H}$	$g_H^+/L$	$0$	$0$
$k_{2H}$	$L/g_H^+$	$0$	$0$
$R_{half}$	$g_R/L$	$0$	$0$

Los resultados obtenidos se corresponden con los fenómenos físicos explicados por numerosos autores. Asimismo, los valores de los parámetros estimados se encuentran comprendidos dentro de los desvíos estándar de los parámetros reportados en literatura (Faccin *et al.*, 2012; Khanna & Srivastava, 2005; Raje & Srivastava, 1998; Mulchandani *et al.*, 1989). Una excepción a esto último se encuentra en el parámetro  $Y_{R/S2}$ . No obstante ello, el valor estimado se encuentra en el orden de los valores calculados en esta tesis, a partir del trabajo experimental presentado en el Capítulo 2 (entre 2,246 y 5,795  $g_R/g_{S2}$ ).

A partir de los resultados obtenidos, se confirma que el consumo de la fuente de carbono se atribuye al crecimiento de la biomasa residual y a la formación de biopolímero, como muestra la ecuación (4.5) (Patwardhan & Srivastava, 2004). La producción de PHA, representada por la ecuación (4.4), considera la posibilidad de biosintetizar polímero en la fase de crecimiento exponencial como así también en la fase estacionaria (Mulchandani *et al.*, 1989), sin la necesidad del parámetro de corrección ( $\Phi$ ). Esto último se refleja en el hecho de que el parámetro  $R_{half}$  toma un valor nulo, y como consecuencia  $\Phi=1$ . El término negativo de la ecuación (4.4) brinda la posibilidad de representar el mecanismo del microorganismo mediante el cual el biopolímero puede ser también consumido como una fuente de carbono bajo situaciones eventuales de estrés (Luvizetto Faccin, 2009; Khanna & Srivastava, 2005). Un caso particularmente conocido que ocurre en este tipo de microorganismos Gram +, es la obtención de energía mediante el consumo del PHA acumulado para desarrollar mecanismos de esporulación (López *et al.*, 2012).

Con respecto a los restantes valores nulos de los parámetros, se puede mencionar que el parámetro de muerte de la biomasa ( $k_d$ ) en la ecuación (4.3) no sería necesario debido a que en el horizonte de tiempo para el cual transcurren las experiencias DCA y DCB no se percibe una disminución de la biomasa total. El leve crecimiento de la biomasa residual y la disminución de la concentración de material biopolimérico (ecuación (4.1)) contribuyen a que la biomasa total permanezca invariante. De manera similar, se puede observar que  $k_{1H} = k_{2H} = 0$  proponen que la tasa de crecimiento de este microorganismo a partir de almidón y extracto de levadura solo tenga un término de inhibición por nitrógeno y no se vea afectado por el pH del medio de cultivo. Finalmente, se debe mencionar que en el modelo de optimización no se incluyó la ecuación (4.7) debido a la falta de información para el consumo de la fuente de fósforo en estas experiencias. Por lo tanto, el rendimiento de la biomasa a fósforo ( $Y_{R/S3}$ ) no se estimó mediante la resolución del problema planteado.

La Figura 4.2 muestra los datos experimentales de las experiencias DCA y DCAVal comparados con los perfiles de las principales variables de estado obtenidos luego de la calibración del modelo. Las experiencias DCA proporcionan los datos empleados para la estimación de parámetros, mientras que las experiencias DCAVal determinan los datos empleados en la validación del modelo.



**Figura 4.2.** Perfiles de simulación y datos observados de las experiencias DCA (■) y DCAVal (●) como función del tiempo para *B. megaterium* BBST4. (---) Biomasa total, (---) Almidón, (—) pH y (---) Biopolímero: Perfiles simulados para las variables de estado.

Se puede observar que el modelo propuesto, calibrado mediante estimación de parámetros con los datos experimentales DCA (■), logra reproducir adecuadamente los perfiles de concentración y pH del medio de cultivo. La Tabla 4.3 presenta los valores de los errores medio ( $EM$ ) y relativo ( $ER$ ) junto con el índice de concordancia ( $d$ ) para la estimación de parámetros (DCA). Los menores errores se presentan para la concentración de biomasa total ( $X$ ) y  $pH$ . Las mayores discrepancias entre las predicciones y los datos observados se encuentran en el consumo de almidón ( $S_1$ ) y la acumulación de PHA ( $P$ ), donde se alcanzaron errores relativos cercanos al 20 %. Los menores errores asociados a la fuente de carbono comparados con la producción de biopolímero, quien muestra el error relativo más elevado ( $ER=24,9$  %), se pueden explicar mediante la presencia de más parámetros en la ecuación (4.5) (relacionada a consumo de la fuente de carbono) en comparación a la ecuación (4.4) (asociada a la acumulación de polímero). Este hecho, permite lograr un mejor ajuste de la variable  $S_1$  en comparación con  $P$ . Puede observarse que el punto experimental correspondiente a  $t=22$  h ( $S_1=11,2$   $g_{S_1}/L$ ) se encuentra alejado del predicho por el modelo ( $S_1=5,1$   $g_{S_1}/L$ ) para ese mismo tiempo (Figura 4.2), lo cual aporta la mayor contribución al  $ER$ , a pesar del hecho que el resto de los datos experimentales se encuentren muy cercanos a los valores predichos por el modelo. El valor del índice  $d=0,943$ , próximo a la unidad, revelaría esta última aseveración, sugiriendo que si se lograra representar de una manera más indicada el valor de  $S_1$  correspondiente a  $t=22$  h, el error medio y relativo para esta variable disminuiría considerablemente.

**Tabla 4.3.** Error medio ( $EM$ ), error relativo ( $ER$ ) e índice de concordancia ( $d$ ) de las variables de estado de la experiencia DCA empleando *B. megaterium* BBST4.

Variables	$EM$	$ER$	$d$
$P$ (PHA)	0,102	24,9 %	0,900
$X$ (Biomasa)	0,121	18,2 %	0,953
$S_1$ (Almidón)	1,574	21,4 %	0,943
$pH$	0,049	0,8 %	0,999

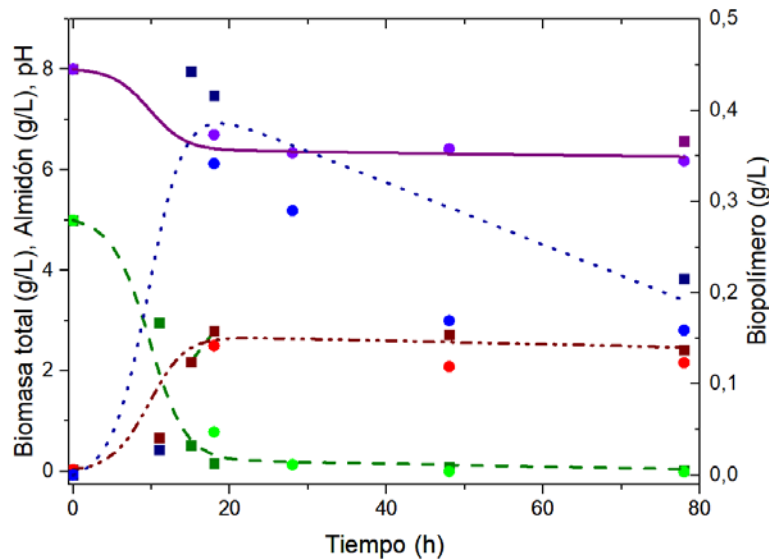
El modelo propuesto se validó usando un set de datos experimentales independientes como se muestra en la Figura 4.2 (DCAVal (●)). En

comparación con el set de parámetros empleado para la calibración del modelo, se puede señalar que los errores relativos resultan levemente superiores para todas las variables involucradas en DCAVal (Tabla 4.4). Una excepción se halló para la biomasa total ( $X$ ), que muestra notables incrementos de los valores estadísticos en relación a los obtenidos en el proceso de calibrado (el  $EM$  ascendió desde 0,121 a 0,722 y el  $ER$  desde 18,2 % hasta 29,5 %). Esto puede atribuirse a la producción de PHA en la fase estacionaria tardía, lo cual genera como consecuencia una mayor concentración de biomasa total (Ecuación 4.1) y por lo tanto la existencia del valor observado de biomasa  $X=4,7$  g<sub>X</sub>/L en  $t=78$  h que se encuentra alejado de lo predicho por el modelo ( $X=2,9$  g<sub>X</sub>/L en  $t=78$  h). En este sentido, si bien el modelo mecanístico propuesto logra representar apropiadamente el comportamiento general de la cepa bajo las condiciones de cultivo estudiadas, se puede determinar que el modelo cinético encuentra ciertas dificultades para predecir el comportamiento mixto que este microorganismo adopta en ciertas ocasiones.

**Tabla 4.4.** Error medio ( $EM$ ), error relativo ( $ER$ ) e índice de concordancia ( $d$ ) de las variables de estado de la experiencia DCAVal empleando *B. megaterium* BBST4.

Variables	$EM$	$ER$	$d$
$P$ (PHA)	-0,062	26,5 %	0,929
$X$ (Biomasa)	0,722	29,5 %	0,869
$S_1$ (Almidón)	1,413	23,9 %	0,957
$pH$	0,271	4,4 %	0,952

La Figura 4.3 muestra los valores de las variables de estado observados de las experiencias realizadas con mayor concentración de extracto de levadura y menor concentración de almidón, DCB y DCBVal (para estimación de parámetros y validación, respectivamente), junto con los perfiles obtenidos a partir del modelo, luego de la estimación de parámetros correspondiente.



**Figura 4.3.** Perfiles de simulación y datos observados de las experiencias DCB (■) y DCBVal (●) como función del tiempo para *B. megaterium* BBST4. (---) Biomasa total, (—) Almidón, (—) pH y (---) Biopolímero: Perfiles simulados para las variables de estado.

Se puede observar que el modelo logra representar efectivamente la tendencia de cada una de las variables medidas. Del mismo modo, a partir de los estadísticos presentados en la Tabla 4.5, se destaca un buen compromiso entre los datos observados y las salidas del modelo, siendo un claro indicador de esto, los valores de *EM* cercanos a 0. Las principales discrepancias se encuentran en la concentración de PHA producido, a la cual se asocia el mayor error relativo reportado ( $ER=32,9\%$ ) junto con un índice de Willmott ( $d=0,880$ ) que demuestra una menor correlación de los datos experimentales por parte del modelo calibrado.

**Tabla 4.5.** Error medio (*EM*), error relativo (*ER*) e índice de concordancia (*d*) de las variables de estado de la experiencia DCB empleando *B. megaterium* BBST4.

Variables	<i>EM</i>	<i>ER</i>	<i>d</i>
<i>P</i> (PHA)	-0,021	32,9 %	0,880
<i>X</i> (Biomasa)	-0,176	15,9 %	0,945
<i>S</i> <sub>1</sub> (Almidón)	0,108	15,3 %	0,987
<i>pH</i>	0,155	2,13 %	0,981

La validación del modelo calibrado, al igual que para la experiencia anterior, se llevó a cabo empleando un set de datos independientes (DCBVal (●)). Para

este caso, se encontraron mejoras notables en  $ER$  y  $d$ , mientras que solo se hallaron variaciones mínimas en los  $EM$ , mejorando para el caso del almidón y  $pH$  (desde 0,108 a 0,04 y desde 0,155 hasta 0,052 para  $S_1$  y  $pH$ , respectivamente) e incrementándose levemente para el PHA y la biomasa (desde -0,021 a -0,055 y desde -0,176 hasta -0,227 para  $P$  y  $X$ , respectivamente). Por su parte, los valores negativos del  $EM$  calculados para  $P$  y  $X$  indican una sobrestimación por parte del perfil predicho por el modelo (ecuación 4.13). Particularmente, para el caso del biopolímero ( $P$ ), esto se evidencia claramente para la experiencia DCBVal (●) a partir de la Figura 4.3, donde todos los valores observados se encuentran por debajo del perfil simulado. Asimismo, si bien en la experiencia DCB (■), la mayoría de los valores de concentración de PHA se hallan por encima del perfil simulado, la concentración correspondiente a  $t=11$  h ( $P=0,03$  g<sub>P</sub>/L) se encuentra muy alejada del valor predicho para ese instante de tiempo ( $P=0,26$  g<sub>P</sub>/L), dando como resultado un sesgo negativo para esta variable ( $EM < 0$ ). Como conclusión parcial de este análisis, se puede mencionar nuevamente que el modelo calibrado para el medio de cultivo con concentraciones iniciales de 5 g/L de almidón y 0,08 g/L de extracto de levadura permite un ajuste muy satisfactorio, encontrándose algunas pequeñas dificultades para reproducir la disminución que se produce en la concentración de PHA a partir de  $t=19$  h, como se observa en la Figura 4.3. Sin embargo, la disminución de la concentración de  $P$ , puede ser bien representada por el modelo, que mediante un mayor valor (en relación a la experiencia DCA) del parámetro  $k_2$  de la ecuación (4.4), logra reproducir de manera aceptable el consumo intracelular de PHA.

**Tabla 4.6.** Error medio ( $EM$ ), error relativo ( $ER$ ) e índice de concordancia ( $d$ ) de las variables de estado de la experiencia DCBVal empleando *B. megaterium* BBST4.

Variables	$EM$	$ER$	$d$
$P$ (PHA)	-0,055	28,4 %	0,933
$X$ (Biomasa)	-0,227	13,3 %	0,979
$S_1$ (Almidón)	0,044	11,6 %	0,997
$pH$	0,052	1,42 %	0,989



### 4.3.2. Cultivo de *B. megaterium* empleando glicerol como sustrato

El problema de optimización dinámica para la producción de PHA a partir de la cepa *B. megaterium* BBST4 posee 6 ecuaciones diferenciales y 4 ecuaciones algebraicas. Como se mencionó anteriormente, este problema se resuelve con un enfoque simultáneo. Para ello, se considera una discretización del tiempo con 20 elementos finitos y 3 puntos de colocación. De este modo, el problema de estimación de parámetros resultante tiene 1904 variables continuas y 1889 restricciones de igualdad. En este punto, resulta importante destacar que, con el propósito de reducir la cantidad de parámetros a estimar, se reemplazó la ecuación (4.5) por la siguiente ecuación (Khanna & Srivastava, 2005):

$$\frac{dS_1}{dt} = -\left(\alpha \frac{dR}{dt} + \gamma \cdot R\right) \quad (4.26)$$

donde  $\alpha$  tiene unidades de  $g_{S1}/g_R$  y  $\gamma$  de  $g_{S1}/(g_R \cdot h)$ . Sus expresiones se representan mediante las ecuaciones (4.27) y (4.28).

$$\alpha = k_3 + k_1 \cdot k_4 \quad (4.27)$$

$$\gamma = k_2 \cdot k_4 + k_5 \quad (4.28)$$

Los valores de los parámetros estimados y propuestos (señalados con el símbolo \*) se muestran en la Tabla 4.7. En relación a los parámetros que se fijaron en el modelo, se puede mencionar que  $\mu_{m\acute{a}x}$ ,  $Y_{R/S2}$  y  $Y_{R/S3}$  fueron calculados a partir de los datos experimentales recopilados para las experiencias ERLLEN A y ERLLEN B presentadas en el Capítulo 2 de esta tesis. Por su parte,  $m_{S2}$ , queda establecido a partir de los resultados reportados por Khanna & Srivastava (2005).

En comparación con los valores de los parámetros calculados en la Sección anterior, se puede mencionar que existen ciertas diferencias respecto de las obtenidas para este caso. En primer lugar, el valor no nulo de la constante de muerte de la biomasa ( $k_d=0,007 \text{ h}^{-1}$ ), propone la utilización de la ecuación (4.3) con una estructura levemente diferente a la empleada en la sección 4.3.1. En este caso, el valor no nulo que toma este parámetro, es necesario para representar la desaceleración del crecimiento de la biomasa residual que existe hacia el final del bioproceso. Sin embargo,  $k_d$  mantiene un valor de  $0,007 \text{ h}^{-1}$ ,

indicando en cierto aspecto que la tasa de muerte de la biomasa no es tan elevada como sucede en los experimentos realizados por Luvizetto Faccin *et al.* (2012), quienes reportan un valor de  $k_d=0,011 \text{ h}^{-1}$  para lograr ajustar la pronunciada caída de la concentración de biomasa hacia el final del proceso de crecimiento y biosíntesis.

Por otro lado, con respecto a la tasa de producción de PHA, se puede señalar que la principal diferencia en relación al modelo de la sección anterior, se encuentra en el parámetro  $\Phi$  de la ecuación (4.4). En este caso, el valor de la constante  $R_{half}=1,130 \text{ g}_R/\text{L}$  (valor que a su vez coincide con lo obtenido experimentalmente: concentración de biomasa residual al momento que la tasa de producción de PHA se reduce a la mitad), permite que el factor de corrección  $\Phi$  tome valores diferentes a 1. Asimismo, se observa que, si bien los valores de los parámetros  $k_1$  y  $k_2$  son mayores a los obtenidos para el caso anterior, se sigue la tendencia que  $k_1 > k_2$ , demostrando que el término de producción de PHA asociado al crecimiento de la biomasa tiene una mayor relevancia que aquél relacionado con el consumo intracelularmente por la bacteria (por ejemplo para esporulación). Asimismo, resulta importante resaltar, que diversos autores obtuvieron valores muy similares para  $k_2$ :  $0,0110 \text{ g}_P/(\text{g}_R \cdot \text{h})$  (Luvizetto Faccin *et al.*, 2012),  $0,0123 \text{ g}_P/(\text{g}_R \cdot \text{h})$  (Khanna & Srivastava, 2005) y  $0,0118 \text{ g}_P/(\text{g}_R \cdot \text{h})$  (Mulchandani *et al.*, 1989).

En cuanto a la ecuación (4.9), que involucra la concentración de iones hidrógeno en el medio de cultivo, se destaca la estructura diferente que adopta en relación a la empleada para ajustar los datos DCA y DCB. Esto se atribuye principalmente al valor de  $k_{ph2}=0$ , lo cual elimina un término de la expresión de  $H$ . Una posible explicación podría ser que el término  $\Phi$ , el cual ahora toma un valor diferente a 1, permite la posibilidad de ajustar mejor el modelo sin que  $k_{ph2}$  tome valores distintos a 0.

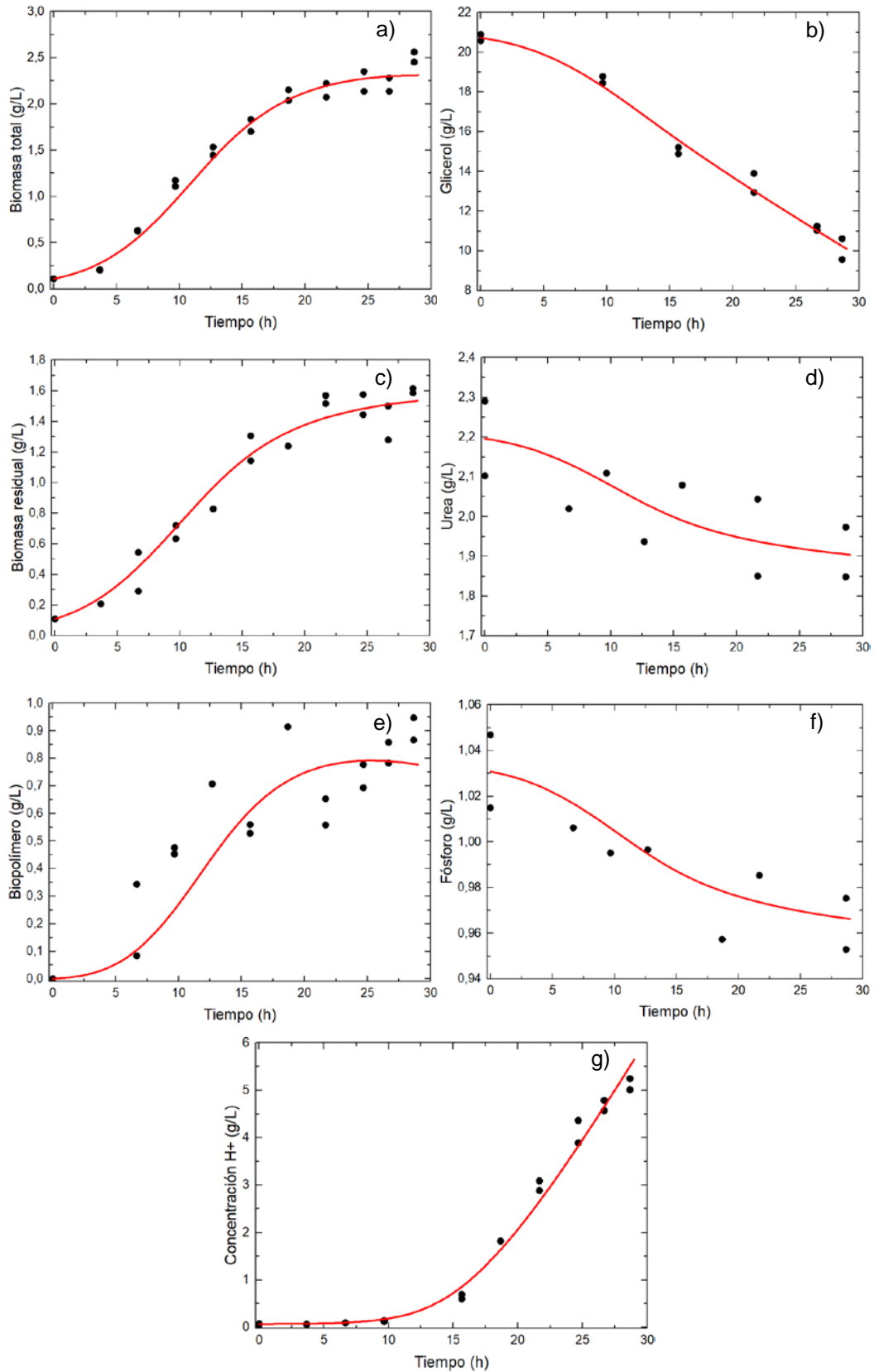
Finalmente, la expresión algebraica (ecuación 4.2) empleada para representar la tasa específica de crecimiento del microorganismo ( $\mu$ ) toma una forma notablemente diferente a la establecida para el crecimiento de *B. megaterium* a partir de almidón con extracto de levadura. Para el escenario que involucra el crecimiento y producción a partir de glicerol se obtienen valores de  $k_{1H}$  y  $k_{2H}$

no nulos que establecen la existencia de un término asociado a inhibición por concentración de  $H^+$ .

**Tabla 4.7.** Set de parámetros óptimos para el modelo de producción de PHA a partir de *B. megaterium* BBST4 (Experiencia ERL).

Parámetros	Unidades	Valores óptimos
$\mu_{m\acute{a}x}$	$h^{-1}$	0,225*
$K_{S2}$	$g_{S2}/L$	0,939
$k_d$	$h^{-1}$	0,007
$k_1$	$g_P/g_R$	1,981
$k_2$	$g_P/(g_R \cdot h)$	0,019
$\alpha$	$g_{S1}/g_R$	2,760
$\gamma$	$g_{S1}/(g_R \cdot h)$	0,220
$Y_{R/S2}$	$g_R/g_{S2}$	5,525*
$m_{S2}$	$g_{S2}/(g_R \cdot h)$	$1,73 \cdot 10^{-6}$ *
$k_{ph1}$	$L/g_X$	4,706
$k_{ph2}$	$L/(g_X \cdot h)$	0
$k_{1H}$	$g_{H^+}/L$	0,033
$k_{2H}$	$L/g_{H^+}$	1,999
$Y_{R/S3}$	$g_R/g_{S3}$	25*
$R_{half}$	$g_R/L$	1,130

En la Figura 4.4 se presentan los datos obtenidos a partir de los experimentos llevados a cabo en Erlenmeyer, los cuales se presentaron en el Capítulo 2 de esta tesis. Conjuntamente, se exhiben los perfiles de las variables de estado obtenidos luego de resolver el problema de estimación de parámetros.



**Figura 4.4.** Perfiles de simulación y datos observados de concentraciones de a) biomasa total, b) glicerol, c) biomasa residual, d) urea, e) biopolímero, f) fósforo y g) iones hidrógeno. (●) Datos experimentales, (—) Perfiles simulados.

Como se puede observar, existe una reproducción muy buena de los perfiles de concentración para todas las variables de estado, lo cual se refleja en los estadísticos presentados en la Tabla 4.8. Los valores de error medio ( $EM$ ) que se calcularon para las variables concentración de biomasa residual ( $EM=-0,006$  g<sub>R</sub>/L), urea ( $EM=-0,007$  g<sub>S2</sub>/L), fósforo ( $EM=-0,004$  g<sub>S3</sub>/L) e iones hidrógeno ( $EM=0,003$  g<sub>H<sup>+</sup></sub>/L) muestran un buen compromiso entre los datos experimentales y el perfil obtenido a partir del modelo calibrado luego de la estimación de los parámetros. Por su parte, si bien las concentraciones de glicerol, biomasa total y biopolímero presentan los sesgos más elevados ( $EM=-0,020$  g<sub>S1</sub>/L,  $EM=0,030$  g<sub>X</sub>/L y  $EM=0,048$  g<sub>P</sub>/L, respectivamente), estos valores indican un muy buen ajuste. Con respecto al error relativo  $ER$ , se obtiene que las variables que mejor representan los datos del bioproceso son la concentración de fósforo ( $ER=1,23$  %) y de glicerol ( $ER=2,49$  %). Por el contrario, la variable de estado que presenta el error relativo más grande corresponde al biopolímero ( $ER=20,02$  %), evidenciando nuevamente la dificultad que presentan este tipo de modelos para reproducir el comportamiento dinámico de los metabolitos mixtos. A pesar de esto, los valores de errores relativos asociados a las restantes variables resultaron menores al 10 % (biomasa residual  $ER=8,03$  %, biomasa total  $ER=6,24$  %, urea  $ER=4,08$  %, iones hidrógeno  $ER=7,06$  %), lo que resulta, junto con los valores de índice de concordancia ( $d$ ) cercanos a la unidad para la mayoría de los casos, en claros indicadores del apropiado ajuste que brinda el modelo cinético calibrado.

Es importante señalar que en este caso, no se efectúa una validación del modelo debido a la falta de un set de datos experimentales independiente a los empleados para la calibración (Erlenmeyer 1 y 2). Se podría haber realizado la calibración con un único conjunto de datos (Erlenmeyer 1 o 2) y utilizar el restante para la validación. Sin embargo, la escases de reactivos necesarios para tomar más mediciones de cada una de las variables llevaron a optar por emplear ambos sets de datos experimentales en la estimación de parámetros y contar así, con un modelo mejor calibrado.

**Tabla 4.8.** Error medio ( $EM$ ), error relativo ( $ER$ ) e índice de concordancia ( $d$ ) de las variables de estado de la experiencia ERLÉN empleando *B. megaterium* BBST4.

Variables	$EM$	$ER$	$d$
$R$ (Biomasa residual)	-0,006	8,03 %	0,991
$S_1$ (Glicerol)	-0,020	2,49 %	0,996
$X$ (Biomasa total)	0,030	6,24 %	0,995
$S_2$ (Urea)	-0,007	4,08 %	0,851
$P$ (Biopolímero)	0,048	20,02 %	0,938
$S_3$ (Fósforo)	-0,004	1,23 %	0,932
$H^+$ (ion hidrógeno)	0,003	7,06 %	0,997

#### 4.4. Conclusiones

En este capítulo se ha formulado un problema de estimación de parámetros restringido por un sistema de ecuaciones diferenciales y algebraicas (DAE) para un modelo mecanístico basado en primeros principios de la cinética de crecimiento y producción de PHA para la cepa autóctona *B. megaterium* BBST4. El modelo cuenta con 7 variables de estado y 16 parámetros que describen la evolución de las concentraciones de biomasa, sustratos, PHA producido y el pH del medio en el horizonte de tiempo correspondiente a cada una de las experiencias realizadas: 80 h para el caso del crecimiento a partir de almidón y extracto de levadura como sustrato y 30 h para aquella donde se emplea glicerol como única fuente de carbono.

Se han determinado los valores óptimos de los parámetros cinéticos correspondientes a cada uno de los escenarios presentados: 12 parámetros para la situación donde se emplea almidón y extracto de levadura como sustratos y 11 parámetros para la experiencia de crecimiento y producción empleando glicerol. El modelo propuesto, calibrado por la estimación de parámetros, provee para todas las experiencias una buena representación de la evolución dinámica de las concentraciones de biomasa total y residual, biopolímero, fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo y el pH observados durante los ensayos efectuados experimentalmente.

## CAPÍTULO 5

### DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE PLANTAS DE PRODUCCIÓN DE PHAs A PARTIR DE SUSTRATOS ALTERNATIVOS

#### 5.1. Introducción

Históricamente, se ha utilizado una amplia variedad de sustratos para la producción de PHAs a nivel industrial y semiindustrial, empresas como Biomer (Guzman, 2013) y Chemie Linz (Braunegg *et al.*, 1998) producían PHB a partir de glucosa como fuente de carbono. Actualmente, Tianjin GreenBio (tjgreenbio.com) y TianAn (Smock, 2012) emplean azúcares a partir de almidón como materias primas. Por otro lado, Tephra Inc. (tephra.com), Metabolix (Laird, 2012), PHB Industrial SA (Pessoa *et al.*, 2005) y Bio-On (bio-on.it, 2018) recurren a la producción de biopolímeros mediante la utilización de azúcares, carbohidratos, caña de azúcar y melazas de azúcar, respectivamente. Industrias como Polyferm Canada (polyfermcanada.com, 2018) optan por aceites vegetales y Danimer Scientific (King, 2013), en particular, emplean aceite de canola.

Es conocido que el costo de los sustratos empleados como fuente de carbono para la producción de biomateriales puede llegar a representar el 50 % de su costo de producción (Koller *et al.*, 2017). Asimismo, existen otros factores influyentes en el precio final del producto como la productividad del microorganismo, el rendimiento del sustrato, los costos de las materias primas y el método de extracción elegido (Dietrich *et al.*, 2017). Si bien, las mejoras individuales de estos indicadores influirán positivamente en el valor final de los PHAs, en una escala industrial la reducción de los costos dependerá fuertemente de una optimización integral de todo el proceso productivo (Koller *et al.*, 2010a).

En relación a esto último, existen dos tipos de enfoques utilizados en la síntesis de procesos para determinar la configuración óptima de un diagrama de flujo y sus condiciones de operación (Yeomans & Grossmann, 1999). El primero de ellos es la estrategia de diseño conceptual presentada por Douglas (1988), donde el problema se resuelve de manera secuencial, fijando ciertas variables del proceso y, mediante la implementación de heurísticos, se trata de llegar a

una solución mejorada del problema. El segundo enfoque para la solución de problemas de síntesis de procesos tiene en cuenta una optimización simultánea basada en programación matemática (Grossmann, 1996). Mediante esta estrategia se propone una superestructura en la cual se incorporan tecnologías que potencialmente podrían ser seleccionadas para conformar el proceso óptimo. Luego se formula un problema de programación matemática donde se involucran variables continuas y discretas para la selección de la configuración óptima del proceso (Grossmann, 1985). Finalmente se resuelve el modelo formulado como un problema de programación mixto entero no lineal (MINLP) (por sus siglas en inglés Mixed Integer NonLinear Programming) (Duran & Grossmann, 1986).

Una alternativa para la representación de este tipo de problemas donde se encuentran involucradas variables discretas y continuas es utilizar modelos con disyunciones y proposiciones lógicas (Lee & Grossmann, 2000; Raman & Grossmann, 1994). Un caso particular para la síntesis de procesos químicos que involucran no linealidades es la programación disyuntiva generalizada (GDP) (por sus siglas en inglés Generalized Disjunctive Programming) (Turkay & Grossmann, 1996). Comúnmente, en los problemas GDP se pueden encontrar tres tipos de restricciones (Yuan *et al.*, 2013): (a) restricciones globales que no están relacionadas con las decisiones discretas; (b) restricciones condicionales representadas por disyunciones donde se involucran operadores "OR"; (c) restricciones puramente lógicas relacionadas con variables Booleanas.

Con el propósito de aprovechar la existencia de Solvers para la resolución de problemas MINLP, es habitual reformular los problemas GDP como de programación mixto entero (Vecchietti *et al.*, 2003; Vecchietti & Grossmann, 2000) mediante el uso de formulaciones "Big-M" o de Cáscara Convexa (Grossmann & Ruiz, 2012).

En este sentido, numerosos autores han propuesto el desarrollo de superestructuras para la optimización de síntesis de procesos en diferentes campos de la ingeniería de procesos. Martin & Grossmann (2012) formulan un problema MINLP con el objetivo de realizar una optimización simultánea con



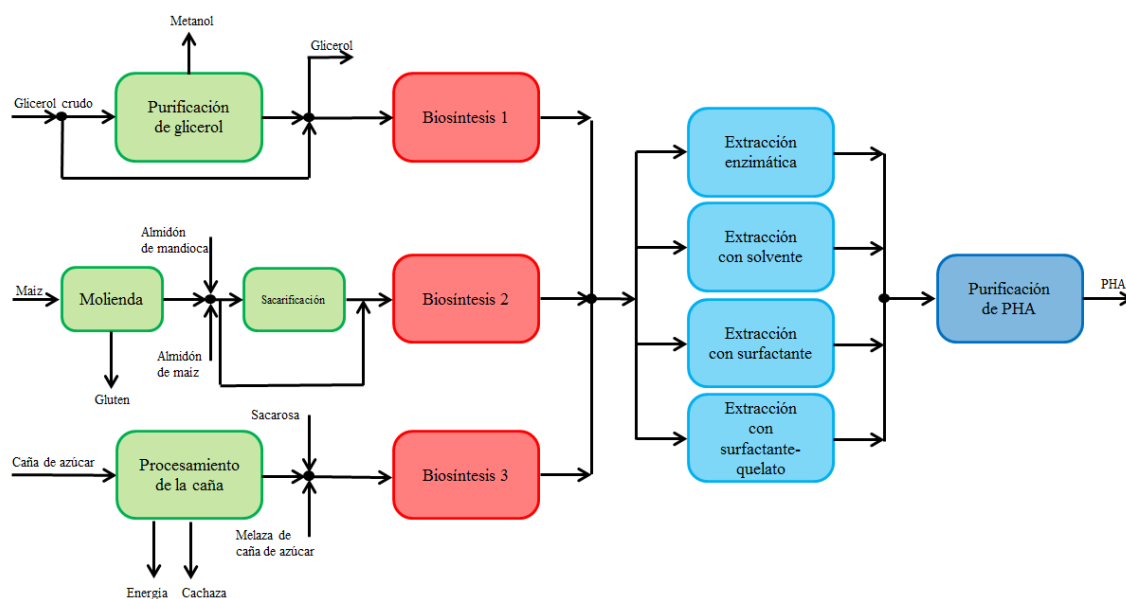
integración de calor para la producción de biodiesel a partir de diferentes aceites. Gong & You (2014a) desarrollan una superestructura de una biorrefinería en base algal, en donde buscan minimizar el costo de la unidad destinada a la captura de carbono y de este modo mitigar el efecto del CO<sub>2</sub> al medioambiente. Rizwan *et al.* (2015a) plantean un problema MINLP para hallar la ruta de procesamiento óptima del proceso de producción de biodiesel a partir de microalgas mediante el desarrollo de una superestructura.

Aun cuando en la bibliografía se pueden hallar evaluaciones tecnoeconómicas de plantas de producción de PHAs para el análisis de factibilidad utilizando simuladores comerciales como ASPEN PLUS (Aspen Technology, Inc., USA) (Lopez-Arenas *et al.*, 2017; Naranjo *et al.*, 2013; Posada *et al.*, 2012; Posada *et al.*, 2011), no se han encontrado este tipo de procesos implementados mediante la formulación de una superestructura. Por lo que resulta de interés el diseño del proceso de producción de PHAs mediante programación matemática.

En el presente capítulo, se presenta una superestructura para el diseño óptimo de un proceso de producción de PHA en donde se incluyen correlaciones detalladas del costo de capital de los equipos, balances de masa y energía. La función objetivo a maximizar es el valor presente neto (VPN). El modelo tiene en cuenta diferentes fuentes de carbono como sustratos y se incluyen diversas alternativas tecnológicas para las etapas de biosíntesis, extracción y purificación. El modelo matemático se formula e implementa en GAMS (McCarl *et al.*, 2017) como un problema de programación mixto entero no lineal. Los resultados muestran que la producción de PHAs puede resultar económicamente atractiva si se implementan las tecnologías apropiadas.

## 5.2. Descripción del Proceso

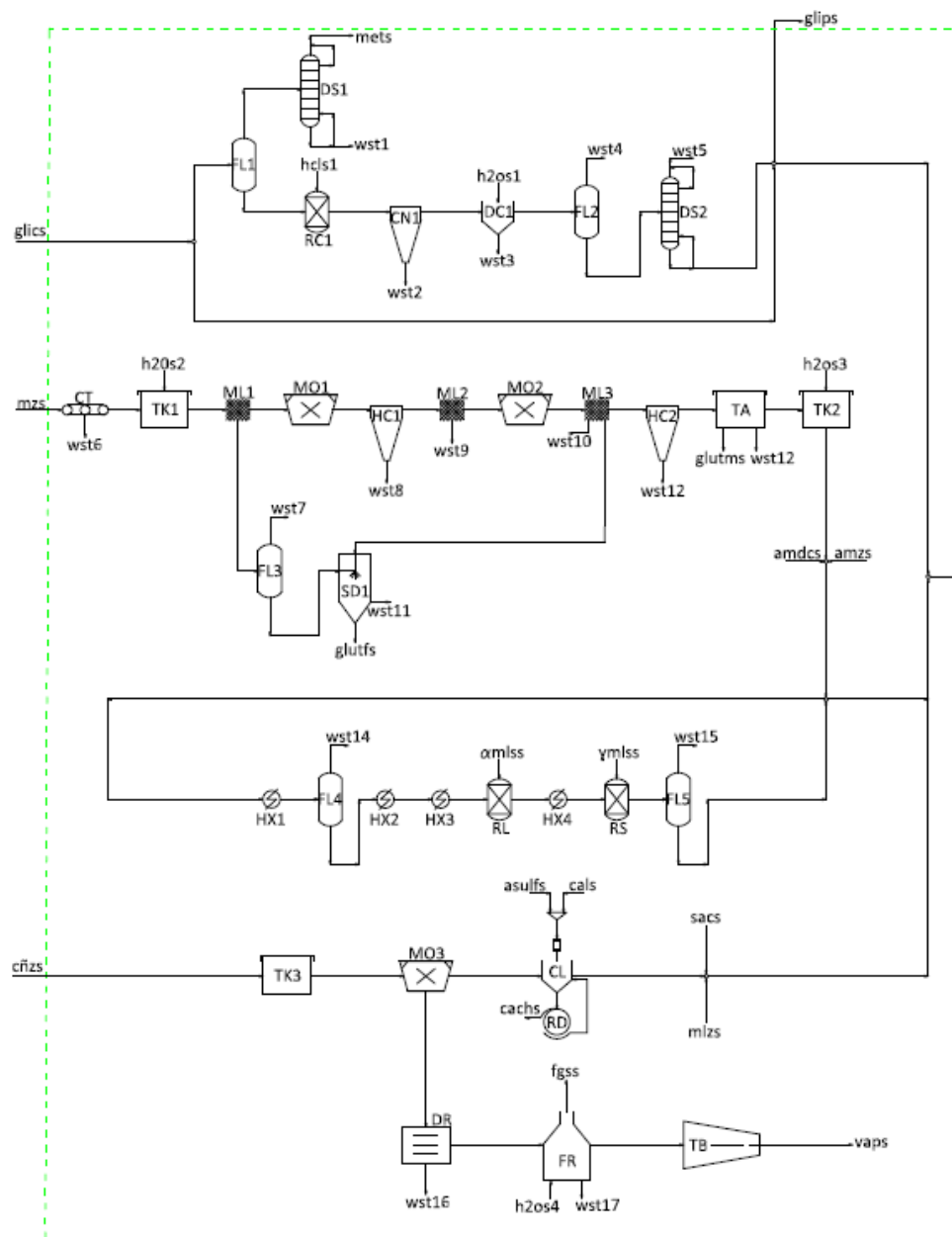
El proceso de producción de PHAs presenta tres etapas principales: pretratamiento de las materias primas, biosíntesis, y extracción y purificación del biopolímero. La Figura 5.1 muestra la superestructura simplificada propuesta, incluyendo las diferentes alternativas tecnológicas. El detalle de cada una de las etapas de procesamiento se describe a continuación.



**Figura 5.1.** Superestructura simplificada de la biorrefinería para la producción de PHAs.

### 5.2.1. Pretratamiento de las materias primas

En este capítulo se consideran tres principales materias primas y algunos de sus derivados que potencialmente podrían ser utilizados como sustratos para la producción de PHAs, como se muestra en la Figura 5.2. A continuación se describen las tecnologías involucradas en el preprocesamiento de las diferentes fuentes de carbono propuestas: glicerol, almidón (de mandioca o maíz), sacarosa de caña de azúcar y melaza de caña de azúcar.



Sector de purificación de materias primas

Figura 5.2. Superestructura del sector de purificación de materias primas de la biorrefinería para la producción de PHAs.

### 5.2.1.1. Glicerol

El glicerol crudo, principal subproducto de la industria del biodiesel (Ramos *et al.* 2014b), puede ser empleado como una fuente de carbono económica en diversos procesos microbiológico (López *et al.*, 2012). Por esta razón, una posible alternativa podría ser la utilización de glicerol crudo para la producción del polímero (Coutinho de Paula *et al.*, 2017). Sin embargo, las impurezas presentes en la corriente de glicerol (principalmente metanol, ver Tabla 5.1) proveniente del proceso de producción de biodiesel podrían tener un efecto

inhibitorio en el aumento de la biomasa celular de los microorganismos productores de biopolímero (Luo *et al.*, 2016), por lo tanto, se incluye la posibilidad de un sector de purificación de glicerol (Figura 5.2). Esta sección involucra, en primera instancia, un proceso de separación donde se obtiene por tope una corriente de agua y metanol (FL1) que se alimenta a una columna de destilación (DS1), allí, el metanol se recupera por tope con una pureza del 91,7 % (Posada *et al.*, 2011) y puede ser vendido como subproducto.

**Tabla 5.1.** Composición típica de glicerol crudo.

Componentes	Composición (%)
Glicerol	60,05
Metanol	22,59
Agua	10,00
Cenizas	2,80
Metóxido de sodio	2,62
Jabones	1,94

A continuación, la corriente líquida del FL1 se neutraliza con ácido clorhídrico (HCl) al 31 % en una proporción 0,355/1 en relación a la masa de glicerol presente en el reactor (RC1) con el fin de neutralizar el catalizador (metóxido de sodio) remanente proveniente del proceso previo de producción de biodiesel (Lourenco *et al.*, 2011). Asimismo, los jabones reaccionan con el HCl para la formación de ácidos grasos libres (FFA) y cloruro de sodio (NaCl). Luego de realizada la reacción de neutralización, se eliminan las trazas de cenizas con la ayuda de una centrífuga (CN1). La corriente libre de sólidos insolubles se envía a un decantador (DC1) donde se lava con agua de proceso en una proporción de 2,4 kg de agua por kg de glicerol (Posada *et al.*, 2011) para obtener glicerol libre de sales y sólidos. Finalmente, el agua y las cantidades remanentes de metanol se remueven por evaporación en un flash (FL2) y una columna de destilación (DS2), para obtener como producto final una corriente de glicerol con 98 % de pureza. En esta instancia, se incluyen dos alternativas posibles para el glicerol purificado: venta (Christopher *et al.*, 2014) o utilización como sustrato en el sector de biosíntesis para la producción de PHAs (Ray *et al.*, 2016; Garlapati *et al.*, 2016; Moreno *et al.*, 2015).

### 5.2.1.2. Almidón

En el contexto del uso de productos agroindustriales para la producción de biomateriales, uno de los sustratos más prometedores para ser utilizados como fuente de carbono es el almidón (García *et al.*, 2013). En la superestructura presentada en la Figura 5.2 se consideran tres potenciales alternativas relacionadas con la obtención de almidón. La primera de ellas consiste en incluir el proceso de producción de almidón a partir de maíz, la segunda opción involucra la adquisición directa del almidón de maíz, mientras que la tercera alternativa es utilizar almidón de mandioca (Poomipuk *et al.*, 2014). La superestructura incluye también la posibilidad de obtención de glucosa como sustrato para la biosíntesis microbiana en la etapa de producción de PHAs mediante licuefacción y sacarificación de los almidones mencionados.

El proceso de obtención de almidón a partir de granos de maíz (Tabla 5.2), consiste en una etapa de manipulación del grano mediante cintas transportadoras del tipo cilindro sinfín (CT), donde se considera una pérdida de material del 2,395 % (Ramirez *et al.*, 2008), hacia un tanque (TK1) donde se efectúa un remojo. En esta instancia el objetivo es debilitar la matriz proteica del grano y de esta manera facilitar la liberación de los gránulos de almidón. Para ello, se incorpora agua hasta llegar a un porcentaje de humedad del 45 % en peso.

**Tabla 5.2.** Composición típica del grano de maíz.

Componentes	Composición (%)
Almidón	61
Agua	15
Fibra	10
Proteína	8
Lípidos	4
Cenizas	2

A continuación, la corriente de proceso se filtra por una malla (ML1) para recuperar los sólidos solubles mientras que el agua excedente con trazas de almidón y proteínas disueltas en ella se concentran mediante evaporación (FL3 y SD1) para producir *gluten feed* junto con las fibras de maíz provenientes de aguas abajo del proceso. Por su parte, los sólidos solubles se envían a una etapa de molienda en donde se logra separar el germen de maíz rico del resto

del material almidonado. Para ello se utiliza primeramente un molino (MO1) y posteriormente valiéndose de la baja densidad del germen con relación al almidón, se logra la separación mediante un hidrociclón (HC1) obteniéndose una corriente rica en lípidos (composición en peso: lípidos 36 %, proteínas 20 %, fibras 18 %, agua 12 %, almidón 12 % y cenizas 2 %) (Ramírez *et al.*, 2009).

Luego de la extracción de los lípidos, la suspensión de almidón filtrada (ML2) se envía nuevamente a molienda (MO2) y a una etapa de filtrado (ML3) para remover parte del agua y desprender el almidón del material fibroso. Esta corriente rica en fibras, junto con el almidón y proteínas concentradas luego de la etapa de remojo inicial del proceso, se envían a un secador (SD1) hasta alcanzar una composición en peso de 52 % fibras, 19 % almidón, 16 % proteínas, 10 % agua, 2 % lípidos y 1 % cenizas para ser vendidos como *gluten feed*.

En la siguiente etapa, el gluten rico en proteínas es separado del almidón por diferencia de densidades mediante un hidrociclón (HC2) y un tanque (TA) para la obtención del subproducto *gluten meal* con la siguiente composición en peso: 65 % proteínas, 15 % almidón, 10 % agua, 5 % fibras, 3 % lípidos y 2 % cenizas. Finalmente, el almidón de maíz se lava en un tanque (TK2) con la cantidad de agua necesaria hasta alcanzar un porcentaje de humedad del 60 % con un 2 % de impurezas. Una vez procesado el grano de maíz para la obtención de almidón, puede utilizarse como sustrato en el proceso fermentativo para la producción de PHA.

En la superestructura propuesta en esta tesis, se incluye, además del proceso de producción de almidón a partir de maíz, la posibilidad de comprarlo directamente o comprar almidón de mandioca. Otra alternativa incluida es el procesamiento del almidón para la obtención de glucosa. Este proceso consiste en evaporar en un flash (FL4) parte del agua contenida en la suspensión de almidón hasta alcanzar una concentración de almidón del 69 % en peso (Van der Veen *et al.*, 2006). Luego se realiza un precalentamiento con vapor (HX2) hasta alcanzar una temperatura de 110 °C aproximadamente (Muller & Miller, 1982) con el objetivo de, posteriormente, hidrolizar el almidón con  $\alpha$ -amilasa en una proporción 1/1000 (enzima/almidón) en un reactor de licuefacción (RL) con

una solución de la enzima al 0,5 % (Carr *et al.*, 1982). La mezcla resultante con una viscosidad reducida contiene oligómeros de almidón llamados maltodextrinas, los cuales ingresan a un reactor de sacarificación (RS) que opera a una temperatura de 60 °C. La etapa de sacarificación se lleva a cabo mediante la utilización de glucoamilasa en una proporción enzima/almidón de 1/40 en masa (Muller & Miller, 1982) y diluido al 0,9 % (Carr *et al.*, 1982). La solución final se obtiene mediante evaporación en un flash (FL5) hasta alcanzar una concentración de glucosa del 80 % en peso.

### 5.2.1.3. Caña de azúcar

Actualmente en nuestro país la producción de azúcar ronda los 28 millones de toneladas anuales, volumen que excede el consumo interno y no se logra exportar este superávit ([camaradealcoholes.org.ar](http://camaradealcoholes.org.ar)). Si bien en nuestro país los cortes en los combustibles han aumentado desde 10 % para bioetanol en 2014 (Ramos *et al.* 2016) a 12 % en 2016 (siendo destinatario de esos 2 puntos extras la industria azucarera), existe la propuesta de elevarlo al 15 %, incluso la capacidad productiva actual admitiría un corte del 17 %. Por esta razón, una eventual alternativa resulta en el aprovechamiento de la sacarosa proveniente del azúcar para ser utilizada como fuente de carbono en la producción de biopolímeros.

Por este motivo, en esta tesis se incluye la posibilidad de emplear caña de azúcar como materia prima (Tabla 5.3) para la producción de PHAs. En la superestructura que se muestra en la Figura 5.2, se formulan modelos simplificados para el procesamiento de caña de azúcar. Este proceso comienza con el lavado de la materia prima en un tanque (TK3) y a continuación es procesado en un molino (MO3) para la generación del jugo de caña de azúcar y la separación del bagazo. Este residuo agroindustrial es considerado un importante subproducto de la industria del azúcar, ya que puede ser utilizado para la producción de energía térmica y eléctrica. En la superestructura propuesta, se considera un sistema de producción de bioelectricidad típico (Rincón *et al.*, 2014). El mismo consiste en la eliminación de humedad de la biomasa en un secador (DR) hasta alcanzar un porcentaje de humedad del 48 % y luego es quemado en una cámara de combustión (FR) con un exceso de

aire. La energía liberada es utilizada para generar vapor de alta presión, el cual circula por una turbina (TB) que produce electricidad y vapor de baja presión que puede utilizarse para satisfacer los requerimientos energéticos de la planta.

**Tabla 5.3.** Composición típica de la caña de azúcar.

Componentes	Composición (%)
Agua	70
Azúcares	14
Fibra	13,5
Cenizas	1,5
Otros	0,6
Proteínas	0,4

Debido a que el jugo de la caña de azúcar posee una compleja composición de compuestos orgánicos e inorgánicos, se requiere una etapa de clarificación para la obtención de azúcares de mayor calidad mediante la remoción de componentes contaminantes. Este proceso se lleva a cabo en un clarificador (CL), a 65 °C (Quintero *et al.*, 2008) mediante la incorporación de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e hidróxido de calcio (Ca(OH)<sub>2</sub>) para posibilitar el precipitado de impurezas (Amores *et al.*, 2013). En el caso del ácido sulfúrico, se emplean 1,4 g de ácido con una dilución al 4 % en peso (Moncada *et al.*, 2014), por cada kg de azúcares presentes en el jugo, mientras que la cal de calcio se adiciona en una proporción de 9,32 g por kg de azúcar (Amores *et al.*, 2013).

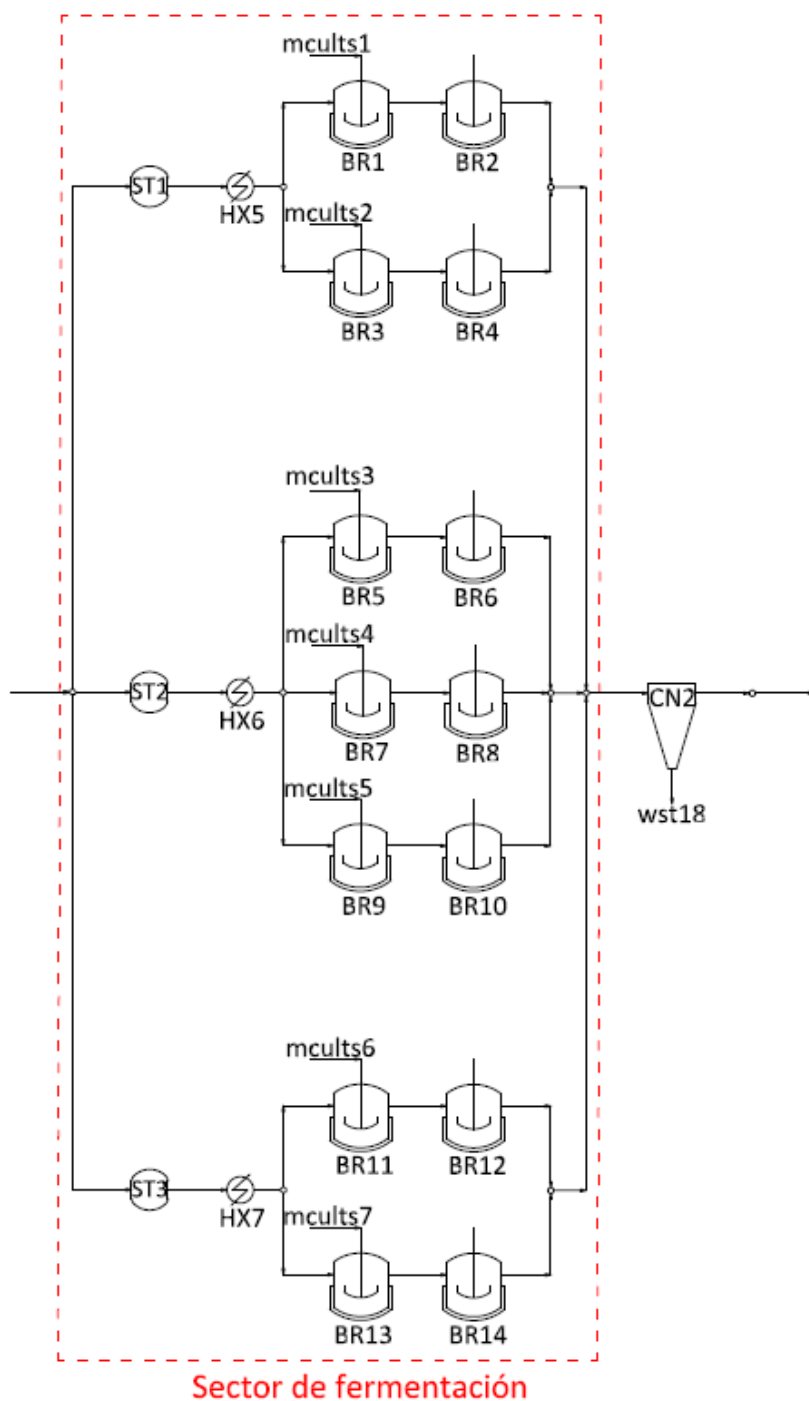
El material removido en la etapa de clarificación del jugo de caña de azúcar se envía a un filtro de tambor rotatorio (RD) para la formación de cachaza. Esta torta obtenida a partir de los sólidos suspendidos en el jugo de caña puede ser comercializada como alimento para animales o compost (Moncada *et al.*, 2013).

Luego del proceso de clarificación, el jugo obtenido está en condiciones de ser utilizado como fuente de carbono para el crecimiento de los microorganismos productores de PHA. Asimismo, se incluyen en el modelo dos alternativas adicionales además de la mencionada. La primera de ellas es utilizar sacarosa ya procesada (Koller *et al.*, 2010b) y la segunda, melaza de caña de azúcar (Moncada *et al.*, 2013).



### 5.2.2. Biosíntesis

La producción biotecnológica de PHAs se lleva a cabo en la etapa de biosíntesis como se muestra en la Figura 5.3, donde se induce a una cepa bacteriana a producir intracelularmente el biopolímero mediante el suministro en exceso de una fuente de carbono y la limitación de un nutriente esencial para su crecimiento, como el nitrógeno o fósforo.



**Figura 5.3.** Superestructura del sector de biosíntesis de una biorrefinería para la producción de PHAs.

El primer paso de este proceso involucra una esterilización de la fuente de carbono (ST1, ST2 o ST3), donde el aumento de temperatura y presión eliminan la posibilidad de crecimiento de otros microorganismos que puedan llegar a competir con el productor de biopolímero.

En función de la fuente de carbono seleccionada, se presentan diversas alternativas operativas para el funcionamiento de los biorreactores utilizados en esta sección del proceso productivo. Dependiendo del sustrato seleccionado, se presentan tecnologías que involucran dos etapas de biosíntesis, en donde la primera de ellas será destinada para el crecimiento bacteriano sin limitación de nutrientes con el fin de aumentar la biomasa celular (BR1, BR3, BR5, BR7, BR9, BR11, BR13). En el segundo biorreactor (BR2, BR4, BR6, BR8, BR10, BR12, BR14), se produce el polímero a partir de una limitación en la fuente de algún nutriente esencial. En la Tabla 5.4 se presentan los parámetros más representativos de los equipos empleados para la producción de PHA a partir de trabajos experimentales hallados en la bibliografía, los cuales se tienen en cuenta para la implementación del modelo.

**Tabla 5.4.** Principales parámetros utilizados en el sector de biosíntesis.

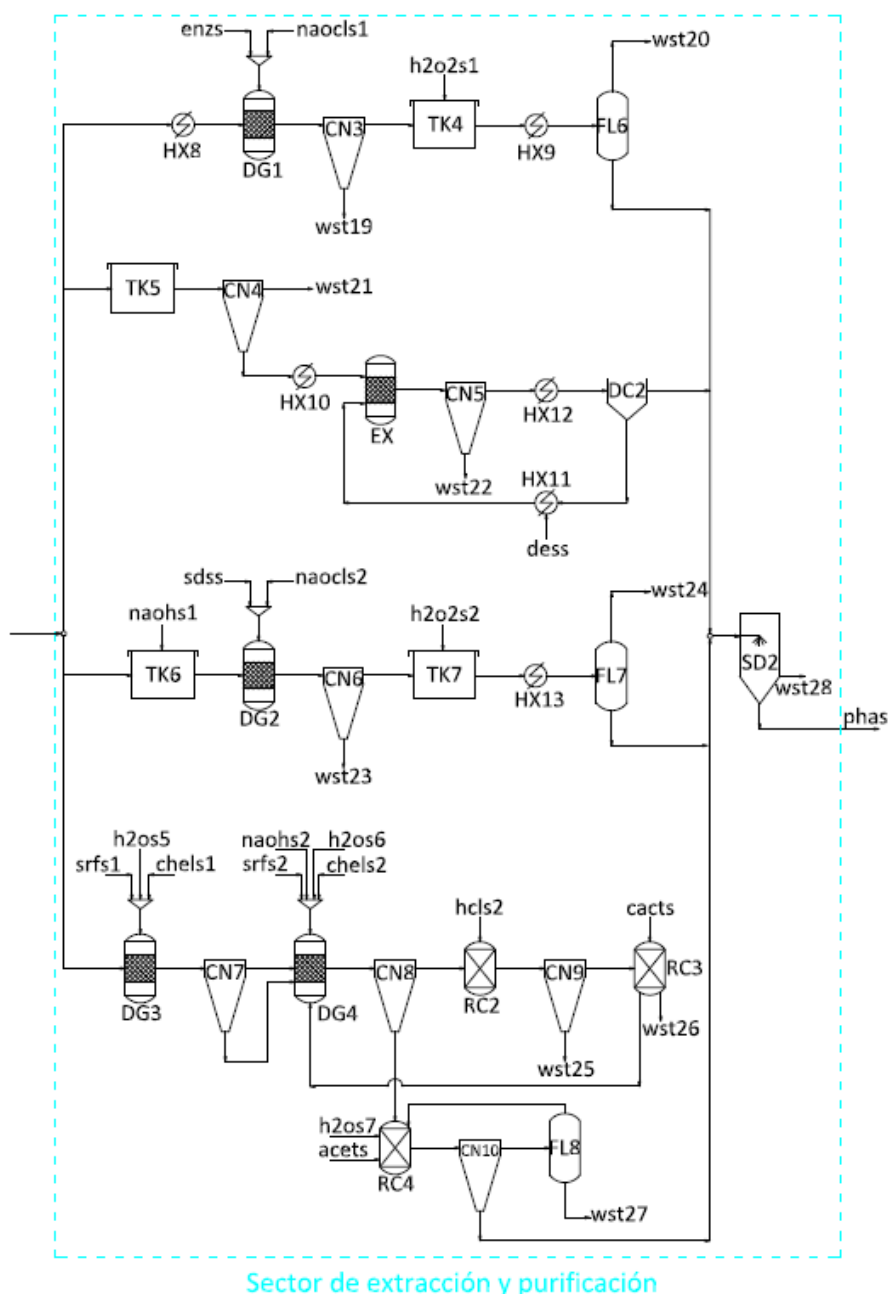
Fuente de carbono	$Y_{P/S}$ (kg/kg)	$Y_{X/S}$ (kg/kg)	% PHA	Tiempos de retención (h) 1ºBR-2ºBR	Consumo total de fuente de carbono (%)	Referencia
Glicerol purificado	0,215	0,370	58	22-20,5	77	Cavalheiro <i>et al.</i> (2009)
Glicerol crudo	0,190	0,380	50	22-20,5	71	Cavalheiro <i>et al.</i> (2009)
Almidón de maíz	0,138	0,212	65	20-58	93	Sheu <i>et al.</i> (2009) Porras <i>et al.</i> (2017)
Almidón de mandioca	0,15	0,340	44	36-60	85	Poomipuk <i>et al.</i> (2014)
Glucosa	0,38	0,475	80	12-22	60	Chanprateep (2010) López <i>et al.</i>

						(2012)
Sacarosa	0,4	0,533	75	24-30	97	Nonato <i>et al.</i> , (2001) Rossell <i>et al.</i> (2010)
Melaza de caña	0,24	0,32	75	24-36	97	Tripathi <i>et al.</i> (2012)

### 5.2.3. Extracción y purificación del biopolímero

La extracción del polímero del citoplasma del microorganismo es una etapa determinante del proceso productivo, debido a que define el precio de venta del bioproducto. Por lo tanto, una apropiada selección del método de extracción es crucial para la viabilidad económica del proceso.

En este capítulo, como se muestra en la Figura 5.4, se incluyen las siguientes cuatro alternativas de extracción en la superestructura del proceso productivo de PHA: empleo de enzimas, solvente, surfactante-NaOCl y surfactante-quelato.



**Figura 5.4.** Superestructura del sector de extracción y purificación de la biorrefinería para la producción de PHAs.

En el proceso que emplea enzimas, se considera un calentamiento hasta 85 °C (HX8) (Posada *et al.*, 2011) previo al ingreso del digestor (DG1), donde ocurre la ruptura de la membrana celular mediante el suministro de la enzima pancreatina (Kapritchkoff *et al.*, 2006), de forma tal de obtener una concentración del 2 % en peso de enzima dentro del digestor. Asimismo, para facilitar la disolución de la membrana celular, que luego será removida del proceso, se añade 0,5 kg de NaOCl al 30 % en peso por cada kg de biomasa

total. Se considera que es posible extraer el 90 % del biopolímero presente en la biomasa de los microorganismos. La biomasa residual disuelta en el NaOCl se elimina del proceso mediante centrifugación (CN3). El PHA resuspendido se trata en un tanque (TK4) con una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1,73 % en peso, en una proporción 3,05 kg de solución por kg de PHA (Harding *et al.*, 2007), con el objetivo de decolorar el polímero (Jacquel *et al.*, 2008). Finalmente, por medio de una evaporación flash (FL6) se elimina parte del agua de la corriente de proceso hasta alcanzar una pureza de PHA del 53 % en peso (Posada *et al.*, 2011).

El proceso que emplea un solvente para la extracción de PHA incluye un homogeneizador (TK5) que opera a 700 bar de presión para facilitar la ruptura celular aguas abajo del proceso de extracción con un tiempo de retención de 45 min. Luego se remueve parte de cualquier exceso de agua que pudiera contener la corriente de salida del homogeneizador en una centrifuga (CN4). A continuación, se precalientan las corrientes de proceso y la del solvente (di-etilsuccinato, DES) por medio de intercambiadores de calor (HX10 y HX11) hasta una temperatura de 110 °C y posteriormente se mezclan en un extractor (EX). En este equipo, el solvente se encuentra en una proporción másica solvente/biomasa total de 20/1 y la recuperación del biopolímero resulta del 95% respecto de la totalidad que se produjo en el interior de la célula. La biomasa residual se elimina por centrifugación (CN5). Por medio de decantación (DC2) a 25 °C se recupera el 93 % del solvente, el cual se recircula para utilizarlo nuevamente.

En la tercera opción, empleo de surfactante NaOCl, se realiza un pretratamiento a 35 °C con NaOH al 11 % en peso, en una relación másica solución/biomasa total de 0,4/1 (Tamer *et al.*, 1998), en un tanque (TK6). Posteriormente, la digestión química se lleva a cabo en un digestor (DG2) a 55 °C y con un tiempo de retención de 20 min mediante la incorporación de surfactante (dodecilsulfato sódico, SDS) y NaOCl (32 % p/p) en proporciones SDS/biomasa total y NaOCl/biomasa total de 1/3 para ambos casos (Dong & Sun, 2000). De modo similar al proceso de extracción con enzimas, se centrifuga (CN6) la corriente de proceso para remover la biomasa residual y se lava con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un tanque (TK7) para lograr una decoloración del

biopolímero. Finalmente, los componentes volátiles se evaporan en un flash (FL7) hasta alcanzar una pureza del 25 % del producto principal.

La última ruta tecnológica considerada, empleo de surfactante-quelato, involucra la implementación del proceso propuesto por Chen *et al.* (2001), donde se busca maximizar la reutilización del agua utilizada en el proceso de extracción. El método se presenta como una alternativa promisorio debido a tratarse de una tecnología más amigable con el medio ambiente y la elevada calidad del producto final, como así también a los mínimos requerimientos de químicos necesarios. El mismo consiste en una primera operación en un digestor (DG3) a 50 °C donde se trata a la biomasa con surfactante (betaína) y quelato (sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético, EDTA) disuelto en agua. El agregado de quelato y surfactante produce una desestabilización en la membrana interna y externa de la célula mediante la formación de complejos catiónicos divalentes (Jacquel *et al.*, 2008). Estos cambios inducidos en la membrana celular conducen a una disrupción del microorganismo y posterior extracción de un biopolímero con una elevada pureza. En esta operación se emplean proporciones máxicas de surfactante/biomasa total y quelato/biomasa total de 0,12/1 y 0,08/1, respectivamente. Se adiciona agua al proceso, para lograr una dilución del 0,8 % en peso (Chen *et al.*, 1999). La segunda operación consiste en utilizar el aprovechamiento del agua que se trata y recircula desde aguas abajo del proceso. Para ello se incorporan a un segundo digestor (DG4), previa centrifugación (CN7), proporciones de surfactante/biomasa total y quelato/biomasa total de 0,0075/1 y 0,01/1, respectivamente. En esta instancia, una solución de NaOH 5M regula el pH del medio para mantenerlo lo más próximo posible a un valor de 13. En la tercera operación, se lleva a cabo la purificación del agua en un reactor (RC2) mediante un tratamiento con HCl 4M para mantener el pH en un valor cercano a 3 y luego extraer cualquier contenido sólido mediante centrifugación (CN9). Asimismo, se utilizan 0,5 kg de carbón activado por kg de agua a tratar en un reactor (RC3) considerando una purga de agua del 10 %. Finalmente, en la última operación, el biopolímero se lava con agua y acetona en proporciones volumétricas agua/PHA y acetona/PHA de 1/1 y 4/1, respectivamente, en un tanque (RC4). Mediante centrifugación (CN10) se recupera el biopolímero

producido, considerando una pérdida del 2 % de producto. La acetona se recupera en un 50 % por destilación flash (FL8) para ser reutilizada en el lavado previo.

### 5.3. Modelo matemático

La superestructura propuesta se formula como un problema MINLP y se implementa en GAMS (McCarl *et al.*, 2017) con el propósito de determinar el diseño óptimo de una planta de producción de PHA considerando un objetivo económico. El mismo, se modela maximizando el VPN sujeto a restricciones que incluyen balances de masa y energía, el diseño detallado de los equipos, ecuaciones de costos de capital y restricciones enteras para la selección de las tecnologías respectivas.

#### 5.3.1. Balance general de masa

Los balances de masa para las unidades no reactivas ( $\theta$ ) de la superestructura propuesta (Figura 5.1) se formulan de la siguiente manera:

$$\sum_{k \in K} f_{\theta,j}^k = \sum_{r \in R} f_{r,j}^{\theta} \quad \forall j \in J \quad (5.1)$$

donde:

$f_{\theta,j}^k$  : Caudal másico del componente  $j$  de la corriente de entrada  $k$  hacia la unidad  $\theta$  [kg  $j$ /h]

$f_{r,j}^{\theta}$  : Caudal másico del componente  $j$  desde la unidad  $\theta$  a la corriente de salida  $r$  [kg  $j$ /h]

De manera similar, los balances de masa de cada unidad reactiva ( $\theta'$ ) son descritos por la ecuación (5.2) mediante la utilización de parámetros de rendimiento respecto a los caudales de entrada a los equipos. Esto último se realiza debido a la ausencia parcial de información estequiométrica de las reacciones químicas involucradas en los procesos descriptos.

$$f_{r,j}^{\theta'} = \sum_{k \in K} f_{\theta',j}^k + \sum_{h \in H} \xi_{j,s_h}^h \cdot C_h \cdot \sum_{k \in K} f_{\theta',s_h}^k \quad \forall j \in J \quad (5.2)$$

donde:

$f_{r,j}^{\theta'}$  : Caudal másico del componente  $j$  desde la unidad reactiva  $\theta'$  a la corriente de salida  $r$  [kg  $j$ /h]

$f_{\theta',j}^k$  : Caudal másico del componente  $j$  desde la corriente de entrada  $k$  hacia la unidad  $\theta'$  [kg  $j$ /h]

$\xi_{j,s_h}^h$  : Coeficiente másico entre el componente  $j$  y el componente  $s_h$  [kg  $j$ /kg  $s_h$ ]

para la reacción  $h$

$s_h$  : Reactivo limitante de la reacción  $h$

$C_h$ : Conversión del reactivo limitante para la reacción  $h$

$f_{\theta',s_h}^k$  : Flujo másico del componente  $s_h$  desde la corriente de entrada  $k$  hacia la unidad  $\theta'$  [kg  $s_h$ /h]

En el Anexo B se presentan los balances de masa de cada uno de los equipos involucrados en la superestructura de manera detallada.

### 5.3.2. Balances de energía

En los balances de energía se tiene en cuenta la cantidad de energía requerida para operar los equipos incluidos en las diferentes tecnologías presentes en la superestructura propuesta. Estos requerimientos se pueden satisfacer mediante energía eléctrica (motores, agitación) o térmica (calentamiento o enfriamiento de corrientes de proceso) (Ramos *et al.*, 2017). Para los intercambiadores de calor se emplea un balance general de energía en estado estacionario para las corrientes calientes y frías considerando despreciables la transferencia de calor entre el intercambiador y los alrededores, como así también la energía potencial y cinética. Conociendo las entalpías de entrada ( $h_e$ ) y salida ( $h_s$ ) de las corrientes másicas totales de entrada y salida, respectivamente, se puede calcular el calor intercambiado ( $q_\theta$ ) en cada intercambiador mediante el uso de la ecuación (5.3).



$$q_{\theta} = \sum_{k \in K} \sum_{j \in J} f_{\theta,j}^k \cdot h_e - \sum_{r \in R} \sum_{j \in J} f_{r,j}^{\theta} \cdot h_s \quad (5.3)$$

Por su parte, la energía eléctrica requerida por centrífugas, reactores, digestores, homogeneizadores y biorreactores se calculan mediante aproximaciones propuestas por Ulrich & Vasudevan (2004) las cuales resultan no lineales en la mayoría de los casos.

$$EC_{\theta'} = ECR_{\theta'} \cdot \left( \sum_{k \in K} \sum_{j \in J} f_{\theta',j}^k \right)^n \quad (5.4)$$

donde  $EC_{\theta'}$  corresponde a la energía consumida en la unidad  $\theta'$  en kJ/h,  $ECR_{\theta'}$  es la relación de energía consumida por unidad de caudal másico relativo a la unidad  $\theta'$ , en kJ/kg y  $n$  es un factor exponencial que depende del equipo involucrado en el cálculo. En el ANEXO B se incluye el detalle de los balances de masa planteados para cada uno de los equipos.

### 5.3.3. Restricciones enteras y mixto-enteras

Las potenciales unidades propuestas en la superestructura de la Figura 5.1 se encuentran asociadas a variables binarias, que son las principales variables de decisión para la determinación de la ruta tecnológica óptima.

La formulación de las restricciones enteras y mixto-enteras se realizó a partir de lógica proposicional. Con el objetivo de derivar restricciones que involucren variables binarias 0-1, se pensó la correspondiente proposición lógica de lo que se intenta modelar, como describen Raman & Grossmann (1994). Para ello, se consideran operadores lógicos que pueden ser transformados a una representación equivalente de la forma de una ecuación o inecuación. Los operadores básicos utilizados en lógica proposicional y la representación de una expresión Booleana como inecuación puede observarse en la Tabla 5.5 (adaptación de Biegler *et al.* (1997)).

**Tabla 5.5.** Transformación de los principales operadores lógicos a forma algebraica.

Operador lógica	Comentario	Equivalente Booleana	Expresión algebraica
“O” disyunción	$P_1$ o $P_2$ o $P_3...$	$P_1 \vee P_2 \vee \dots \vee P_r$	$y_1 + y_2 + \dots + y_r \geq 1$
“Y” conjunción	$P_1$ y $P_2$ y $P_3...$	$P_1 \wedge P_2 \wedge \dots \wedge P_r$	$y_1 \geq 1; y_2 \geq 1; \dots; y_r \geq 1$
“ $P_1 \Rightarrow P_2$ ” Implicación	Si $P_1$ entonces $P_2$	$\neg P_1 \vee P_2$	$1 - y_1 + y_2 \geq 1$
“ $P_1 \Leftrightarrow P_2$ ” Equivalencia	$P_1$ si y solo si $P_2$	$(\neg P_1 \vee P_2) \wedge (\neg P_2 \vee P_1)$	$y_1 = y_2$
“O exclusivo” Disyunción exclusiva	Exactamente una de las opciones es verdadera	$P_1 \underline{\vee} P_2 \underline{\vee} \dots \underline{\vee} P_r$	$y_1 + y_2 + \dots + y_r = 1$

Se introducen siete variables binarias ( $y_1, y_2, y_3, y_4, y_5, y_6$  e  $y_7$ ) que tienen en cuenta la selección de las diferentes materias primas: glicerol crudo, grano de maíz, almidón de maíz, almidón de mandioca, caña de azúcar, sacarosa y melaza de caña. La ecuación (5.5) garantiza que solo una de las posibilidades propuestas puede ser elegida.

$$\sum_{i=1}^7 y_i = 1 \tag{5.5}$$

En caso de seleccionar glicerol crudo como alternativa ( $y_1=1$ ), existe la posibilidad de purificarlo ( $y_8=1$ ) o utilizarlo como sustrato sin un tratamiento previo ( $y_9=1$ ). Las ecuaciones (5.6) a (5.8) representan la existencia de dichas alternativas en caso que se opte por glicerol crudo como sustrato ( $y_1=1$ ).

$$y_1 - y_8 \geq 0 \tag{5.6}$$

$$y_1 - y_9 \geq 0 \tag{5.7}$$

$$-y_1 + y_8 + y_9 \geq 0 \tag{5.8}$$

En caso de purificar el glicerol ( $y_8=1$ ), el modelo incluye la opción de venderlo como producto final ( $y_{10}=1$ ) o utilizarlo como sustrato para la producción de PHA ( $y_{11}=1$ ). Esto último se incorpora al modelo mediante las ecuaciones (5.9) y (5.10).

$$y_8 - y_{10} - y_{11} \geq -1 \quad (5.9)$$

$$-y_8 + y_{10} + y_{11} \geq 0 \quad (5.10)$$

Si se considera utilizar el grano de maíz, el almidón de maíz o el almidón de mandioca como fuente de carbono (opciones  $y_2$ ,  $y_3$  e  $y_4$ , respectivamente), se propone la sacarificación del almidón para obtener glucosa como sustrato para la biosíntesis ( $y_{12}=1$ ). Caso contrario, el almidón podría emplearse directamente como fuente de carbono para la producción del biopolímero ( $y_{13}=1$ ), representado en las ecuaciones (5.11) a (5.15).

$$-y_{12} + y_2 + y_3 + y_4 \geq 0 \quad (5.11)$$

$$-y_{13} + y_2 + y_3 + y_4 \geq 0 \quad (5.12)$$

$$-y_2 + y_{12} + y_{13} \geq 0 \quad (5.13)$$

$$-y_3 + y_{12} + y_{13} \geq 0 \quad (5.14)$$

$$-y_4 + y_{12} + y_{13} \geq 0 \quad (5.15)$$

En el sector de biosíntesis, se tienen en cuenta diferentes productividades de los biorreactores a partir de la fuente de carbono seleccionada previamente. De aquí surgen  $y_{14}$  e  $y_{15}$  asociadas al consumo del glicerol purificado y el glicerol crudo, respectivamente, como se indica en las ecuaciones (5.16) a (5.20):

$$y_{11} - y_{14} \geq 0 \quad (5.16)$$

$$-y_{11} + y_{14} \geq 0 \quad (5.17)$$

$$y_9 - y_{15} \geq 0 \quad (5.18)$$

$$-y_9 + y_{15} \geq 0 \quad (5.19)$$

$$y_{14} + y_{15} \leq 1 \quad (5.20)$$

Por su parte, las variables  $y_{16}$ ,  $y_{17}$  e  $y_{18}$  se encuentran asociadas al sector de biosíntesis para el caso de utilizar como sustrato glucosa ( $y_{16}=1$ ), almidón partir del grano de maíz o procesado ( $y_{17}=1$ ) y almidón de mandioca ( $y_{18}=1$ ), respectivamente.

$$y_{13} - y_{17} - y_{18} \geq 0 \quad (5.21)$$

$$-y_{13} + y_{17} + y_{18} \geq 0 \quad (5.22)$$

$$y_{12} - y_{16} \geq 0 \quad (5.23)$$

$$-y_{12} + y_{16} \geq 0 \quad (5.24)$$

$$y_4 - y_{18} \geq 0 \quad (5.25)$$

$$-y_4 + y_{18} \geq -1 \quad (5.26)$$

$$-y_3 + y_{17} \geq -1 \quad (5.27)$$

$$-y_2 + y_{17} \geq -1 \quad (5.28)$$

$$y_{16} + y_{17} + y_{18} \leq 1 \quad (5.29)$$

Finalmente, se selecciona el biorreactor *BR11* (en Fig. 5.3) correspondiente a  $y_{19}=1$  en el caso de la utilización de sacarosa a partir de caña de azúcar ( $y_5=1$ ) o sacarosa procesada ( $y_6=1$ ), mientras que para la bioconversión de melazas ( $y_7=1$ ) se destina el biorreactor *BR13* ( $y_{20}=1$ ).

$$y_7 - y_{20} \geq 0 \quad (5.30)$$

$$-y_7 + y_{20} \geq 0 \quad (5.31)$$

$$y_5 + y_6 - y_{19} \geq 0 \quad (5.32)$$

$$-y_5 - y_6 + y_{19} \geq 0 \quad (5.33)$$

$$y_{19} + y_{20} \leq 1 \quad (5.34)$$

En relación con las tecnologías para la extracción del PHA, se proponen: extracción enzimática ( $y_{21}=1$ ), extracción con solvente ( $y_{22}=1$ ), extracción con surfactante-NaOCl ( $y_{23}=1$ ) o extracción con surfactante-quelato ( $y_{24}=1$ ).

$$y_{21} + y_{22} + y_{23} + y_{24} + y_{10} = 1 \quad (5.35)$$

Adicionalmente, se utiliza una última variable binaria ( $y_{25}$ ) para fijar que los impuestos a las ganancias ( $IMP_{GAN}$ ) sean 0 en caso de que no se obtengan ganancias en algún período del proyecto ( $y_{25}=0$ ). Para ello se tienen en cuenta en las ecuaciones, el flujo efectivo antes de impuestos ( $FEAI$ ) y la depreciación ( $DEP$ ) de los equipos.

$$FEAI - DEP \leq y_{25} \cdot M1 \quad (5.36)$$

$$-FEAI + DEP \leq (1 - y_{25}) \cdot M1 \quad (5.37)$$

$$IMP_{GAN} \leq t \cdot (FEAI - DEP) + (1 - y_{25}) \cdot M2 \quad (5.38)$$

$$IMP_{GAN} \geq t \cdot (FEAI - DEP) - (1 - y_{25}) \cdot M2 \quad (5.39)$$

$$IMP_{GAN} \leq y_{25} \cdot M3 \quad (5.40)$$

$$IMP_{GAN} \geq -y_{25} \cdot M3 \quad (5.41)$$

donde:

$M1, M2, M3$ : Son parámetros suficientemente grandes.

$t$ : Tasa de impuesto a las ganancias.

Cada una de las variables binarias mencionadas se incluyen además en los balances de masa mediante la formulación de restricciones “Big M” (Grossmann & Ruiz, 2012) para las potenciales unidades en la superestructura como se muestra a continuación:

$$\sum_{k \in K} \sum_{j \in J} f_{\theta - \theta', j}^k - M \cdot y_i \leq 0 \quad \forall j \in J, i \in I \quad (5.42)$$

Donde  $M$  es un parámetro lo suficientemente grande tal que cuando  $y_i=1$ , las restricciones sobre el caudal másico total de entrada a una unidad reactiva o no reactiva ( $\theta - \theta'$ ) se vuelven redundantes, mientras que en el caso contrario ( $y_i=0$ ), el flujo másico es forzado a ser nulo.

### 5.3.4. Restricciones económicas y de diseño

La convergencia del modelo de la superestructura descrita proporcionará el valor de las variables implícitas que se emplearán para la evaluación económica mediante la función objetivo. Específicamente, en la evaluación tecnoeconómica se utiliza un enfoque con funciones de costos no lineales y modelos detallados para el dimensionamiento de los equipos propuestos por Ulrich y Vasudevan (2004), Chauvel *et al.* (2003), Walas (1990) y Echarte (2010) como se muestra a continuación.

Las siguientes ecuaciones se utilizan para los equipos que se mencionan a continuación: FL1 a FL8, DC1 a DC2, TK1.

$$V_H = \frac{1}{60} \cdot t_H \cdot \sum_k^K \sum_{j=1}^{39} \frac{f_{\theta,j}^k}{\rho_{\theta}^k} \quad (5.43)$$

$$V_S = \frac{1}{60} \cdot t_S \cdot \sum_k^K \sum_{j=1}^{39} \frac{f_{\theta,j}^k}{\rho_{\theta}^k} \quad (5.44)$$

$$D = \left( \frac{4 \cdot (V_H + V_S)}{\pi \cdot 0,6 \cdot \left(\frac{H}{D}\right)} \right)^{(1/3)} \quad (5.45)$$

$$H = D \cdot rel_{H/D} \quad (5.46)$$

$$V_{mat} = \pi \cdot \left( D \cdot H + \frac{D^2}{2} \right) \cdot 0,008 \quad (5.47)$$

$$m_{mat} = \rho_{acero} \cdot V_{mat} \quad (5.48)$$

$$C_{carcasa} = (98,04 - 95,99 \cdot D^{0,00436}) \cdot f_m \cdot f_e \cdot m_{mat} \quad (5.49)$$

$$C_{acces} = 1861,42 + 199,90 \cdot (m_{mat}^{0,42652}) \quad (5.50)$$

$$C_{eq1} = 1,15 \cdot f_p \cdot \frac{I_{CE}}{182,1} (C_{carcasa} + C_{acces}) \quad (5.51)$$

Donde  $V_H$  y  $V_S$  son los volúmenes de vaciado y llenado, respectivamente, en  $m^3$ . Los mismos se calculan considerando el caudal másico por componente que ingresa al equipo ( $f_{\theta,j}^k$ ) en kg/h, el tiempo estipulado para la operación de vaciado ( $t_H=5$ ) y llenado ( $t_S=2$ ), en min, y la densidad de la corriente alimentada ( $\rho_{\theta}^k$ ), en  $kg/m^3$ .

El diámetro del equipo ( $D$ ), en m, se calcula a partir de  $V_H$  y  $V_S$  y junto con la relación altura-diámetro ( $rel_{H/D}=1,5$ ) correspondiente se puede obtener la altura del equipo ( $H$ ), en m. Considerando un espesor de material de 8 mm, y las dimensiones  $D$  y  $H$ , se calcula el volumen del material ( $V_{mat}$ ), en  $m^3$ , el cual junto con la densidad del acero ( $\rho_{acero}=8750$ ), en  $kg/m^3$ , permiten hallar la masa del material ( $m_{mat}$ ), en kg, necesario para la fabricación del equipo.

Finalmente, con las dimensiones calculadas y la cantidad de material necesario para la fabricación del equipo, se pueden hallar mediante correlaciones los costos de la carcasa ( $C_{carcasa}$ ) y accesorios ( $C_{acces}$ ), en \$, necesarios para la obtención del costo del equipo actualizado ( $C_{eq1}$ ), en \$. Los valores de los factores de corrección por material ( $f_m=4$ ), espesor ( $f_e=1,2$ ) y presión ( $f_p=1,6$ ) corresponden a un equipo de acero inoxidable operando bajo condiciones de operación moderada. El valor del índice de actualización de precios,  $I_{CE}$ , es el que se reporta mensualmente para la industria de procesos (chemengonline.com). En este estudio se empleó el índice correspondiente al mes de abril 2017 ( $I_{CE}=566,8$ ).

El cálculo del costo de la torre de destilación (DS1) utilizada para la recuperación de metanol se realiza mediante la utilización de variables similares a las mencionadas anteriormente. Sin embargo, la altura de la torre de destilación ( $H$ ) se calcula a partir de la suma de la altura mínima del nivel del líquido ( $H_{LLL}=0,381$ ), en m, las alturas de vaciado ( $H_H$ ) y llenado ( $H_S$ ), la altura desde la cota de llenado a la tobera de alimentación ( $H_{LIN}$ ), en m, la altura de desenganche, desde la tobera hasta el eliminador de niebla ( $H_D$ ), en

m y la altura destinada al eliminador de niebla ( $H_{ME}$ ), en m. Las ecuaciones (5.52) a (5.65) se utilizan para hallar el costo de DS1 y DS2.

$$V_H = \left(\frac{0,15}{1,15}\right) \cdot \frac{1}{60} \cdot t_H \cdot \sum_k^K \sum_{j=1}^{39} \frac{f_{\theta,j}^k}{\rho_{\theta}^k} \quad (5.52)$$

$$V_S = \left(\frac{0,15}{1,15}\right) \cdot \frac{1}{60} \cdot t_S \cdot \sum_k^K \sum_{j=1}^{39} \frac{f_{\theta,j}^k}{\rho_{\theta}^k} \quad (5.53)$$

$$H_H = \frac{4 \cdot V_H}{\pi \cdot D^2} \quad (5.54)$$

$$H_S = \frac{4 \cdot V_S}{\pi \cdot D^2} \quad (5.55)$$

$$H_{LIN} = (1 + D_N) \cdot 0,3048 \quad (5.56)$$

$$D_N = 4 \cdot \left(\frac{\rho_{MB}}{\pi \cdot 100}\right)^{0,5} \cdot \frac{0,3048^3}{3600 \cdot \rho_{MB}} \cdot 1,15 \cdot \left(\sum_k^K \sum_{j=1}^{39} f_{\theta,j}^k\right)^{0,5} \quad (5.57)$$

$$H_D = (2 + 0,5 \cdot D_N) \cdot 0,3048 \quad (5.58)$$

$$H_{ME} = 1,5 \cdot 0,3048 \quad (5.59)$$

$$H = H_{LLL} + H_H + H_S + H_{LIN} + H_D + H_{ME} \quad (5.60)$$

$$V_{mat} = \pi \cdot \left(D \cdot H + \frac{D^2}{2}\right) \cdot 0,008 \quad (5.61)$$

$$m_{mat} = \rho_{acero} \cdot V_{mat} \quad (5.62)$$

$$C_{carcasa} = (98,04 - 95,99 \cdot D^{0,00436}) \cdot f_m \cdot f_e \cdot m_{mat} \quad (5.63)$$

$$C_{acces} = 1861,42 + 199,90 \cdot (m_{mat}^{0,42652}) \quad (5.64)$$



$$C_{eq2} = 1,15 \cdot f_p \cdot \frac{I_{CE}}{182,1} (C_{carcasa} + C_{acces}) \quad (5.65)$$

El costo de los tanques utilizados en la superestructura se obtiene mediante la incorporación de las ecuaciones (5.66) a (5.75) para los equipos RC1 a RC4, BR1 a BR14, TK2 a TK7, RL, RS, CL, DG1 a DG4 y EX1.

$$V_{ret} = \sum_k^K \sum_{j=1}^{39} \frac{f_{\theta,j}^k \cdot t_{ret,k}}{\rho_{\theta}^k} \quad (5.66)$$

$$t_{ret,k} = (t_{1,k} + t_{2,k}) \cdot FO_{\theta,k} \cdot \frac{1}{60} \quad (5.67)$$

$$V_1 = \frac{\pi}{4} \cdot H_{mintope} \cdot \left( \frac{H_{mintope}}{rel_{H/D}} \right)^2 \quad (5.68)$$

$$V_2 = \frac{\pi}{4} \cdot H_{minfondo} \cdot \left( \frac{H_{minfondo}}{rel_{H/D}} \right)^2 \quad (5.69)$$

$$V_{tot} = V_{ret} + V_1 + V_2 \quad (5.70)$$

$$D = \left( \frac{4 \cdot V_{tot}}{\pi \cdot \left( \frac{H}{D} \right)} \right)^{(1/3)} \quad (5.71)$$

$$H = D \cdot rel_{H/D} \quad (5.72)$$

$$Pot = Pot_{vol} \cdot V_{ret} \quad (5.73)$$

$$C_{agitador} = 9236 \cdot Pot^{0,0911} \cdot F_{BM} \cdot \frac{I_{CE}}{400} \quad (5.74)$$

$$C_{eq3} = C_{agitador} + \frac{M\&S}{280} \cdot 101,9 \cdot f_m \cdot f_p \cdot \left( \frac{D}{0,3048} \right)^{1,066} \cdot \left( \frac{H}{0,3048} \right)^{0,82} \quad (5.75)$$

Donde el volumen total del recipiente ( $V_{tot}$ ), en  $m^3$ , se halla a partir de la suma del volumen asociado a la ocupación de vapores ( $V_1$ ), en  $m^3$ , el volumen mínimo asociado a razones operativas ( $V_2$ ), en  $m^3$ , y el volumen de retención ( $V_{ret}$ ), en  $m^3$ . Por su parte,  $V_1$  y  $V_2$  se obtienen a partir de las altura mínimas establecidas para la sección superior ( $H_{mintope}=0,2032$ ) e inferior ( $H_{minfondo}=0,3048$ ) del tanque, en m, considerando una relación altura-diámetro  $rel_{H/D}=5$ . El  $V_{ret}$  se calcula de manera análoga a los volúmenes de llenado y vaciado con la diferencia que en este caso se tiene en cuenta un tiempo de retención ( $t_{ret,k}$ ), en h, que para el caso de los biorreactores (BR1 a BR14) se encuentran en la Tabla 5.4, mientras que para el resto de los tanques, se obtiene considerando un tiempo asociado a la instrumentación ( $t_{1,k}=2$ ), en min, uno asociado al operador ( $t_{2,k}=4$ ), en min, y un factor de operación de unidades externas ( $FO_{\theta,k}=4$ ).

El costo del agitador ( $C_{agitador}$ ), en \$, se calcula a partir de una correlación no lineal que involucra la potencia requerida por el agitador ( $Pot$ ), en kW, considerando que se requiere una potencia volumétrica  $Pot_{vol}=0,5$  kW/ $m^3$ . Asimismo, se emplea un factor de corrección por material y presión ( $F_{BM}=2,5$ ) teniendo en cuenta la utilización de paletas de acero inoxidable.

El costo total de los tanques ( $C_{eq3}$ ), en \$, viene dado por la suma del costo de los agitadores y el costo del recipiente actualizado mediante el índice de Marshall y Swift ( $M\&S=1800$ ). Los factores de corrección por material y presión en este caso tienen valores de  $f_m=3,67$  y  $f_p=1$ , respectivamente.

El costo de los intercambiadores de calor se obtiene a partir de una correlación no lineal en función del área de intercambio ( $A$ ), en  $m^2$ . Los factores de corrección por material y presión empleados para estos equipos son  $f_m=3$  y  $f_p=1$ , respectivamente. Los equipos utilizados para el calentamiento de la corriente de proceso (ST1 a ST3, HX1, HX8 a HX13) se modelan mediante las ecuaciones (5.76) a (5.78).

$$Q = cp \cdot \Delta T \cdot \sum_k^K \sum_{j=1}^{39} f_{\theta,j}^k \quad (5.76)$$

$$m_{vap} = \frac{Q}{h_{fg,vap} + cp_{vap,sub} \cdot (T_{vap,sat} - T_{vap,sub})} \quad (5.77)$$

$$A = \frac{Q}{U \cdot \Delta T_{ml}} \quad (5.78)$$

$$C_{eq4} = (1,76 + 1,31 \cdot f_m \cdot f_p) \cdot (1212,06 + 367,76 \cdot A^{0,67613}) \quad (5.79)$$

Donde la temperatura del fluido calefactor,  $T_{vap,sat}$ , se considera 212 °C correspondiente a la temperatura de ebullición de un vapor de media presión en todos los intercambiadores. Una excepción a esto último se presenta para los equipos HX10 y HX11, donde se utiliza una temperatura de 250 °C, para un aceite calefactor.

**Tabla 5.6.** Principales parámetros utilizados para el modelado de los intercambiadores de calor I.

Equipo	$cp$ (kJ/kg°C)	$\Delta T$ (°C)	$U$ (kJ/m <sup>2</sup> s°C)	$T_{vap,sub}$ (°C)	Referencia
ST1	2,73	39	0,057	149	Hysys (2013) Ulrich & Vasudevan (2004)
ST2	2,73	79	0,057	70	Ramirez <i>et al.</i> (2009)
ST3	2,73	74	0,057	75	Quintero <i>et al.</i> (2008)
HX1	3,341	85	0,003756	-	Hysys (2013) Ulrich & Vasudevan (2004)
HX8	4,227	50	0,285	95	Posada <i>et al.</i> (2011)
HX9	4,187	76,5	0,285	111,5	Hysys (2013) Ulrich & Vasudevan

						(2004)
						Hysys (2013)
<i>HX10</i>	2,837	20	0,007197	109,8		Ulrich & Vasudevan (2004)
						Hysys (2013)
<i>HX11</i>	1,798	85	0,02736	114,2		Ulrich & Vasudevan (2004)
						Hysys (2013)
<i>HX12</i>	2,045	65	0,01468	-		Ulrich & Vasudevan (2004)
						Hysys (2013)
<i>HX13</i>	3,341	76,4	0,003756	-		Ulrich & Vasudevan (2004)

Análogamente, las ecuaciones (5.80) a (5.83) se implementan para el cálculo de costo de los intercambiadores de calor empleados para el enfriamiento de la corriente de proceso (HX3 a HX7).

$$Q = cp \cdot \Delta T \cdot \sum_k^K \sum_{j=1}^{39} f_{\theta,j}^k \quad (5.80)$$

$$m_{a,enf} = \frac{Q}{cp_{a,enf} \cdot (T_{sal,a,enf} - T_{ent,a,enf})} \quad (5.81)$$

$$A = \frac{Q}{U \cdot \Delta T_{ml}} \quad (5.82)$$

$$C_{eq5} = (1,76 + 1,31 \cdot f_m \cdot f_p) \cdot (1212,06 + 367,76 \cdot A^{0,67613}) \quad (5.83)$$

El fluido refrigerante se considera agua a una temperatura de entrada de 15 °C y una capacidad calorífica constante ( $cp_{a,enfrr}$ ) de 4,228 kJ/kg°C. En la Tabla 5.7 se muestran los valores de los parámetros que se tuvieron en cuenta para modelar los intercambiadores de calor HX3 a HX7.

**Tabla 5.7.** Principales parámetros utilizados para el modelado de los intercambiadores de calor II.

Equipo	$cp$ (kJ/kg°C)	$\Delta T$ (°C)	$U$ (kJ/m <sup>2</sup> s°C)	$T_{sal,a,enfrr}$ (°C)	$T_{ent,a,enfrr}$ (°C)	Referencia
<i>HX3</i>	2,586	15	0,160	98	15	Hysys (2013) Ulrich & Vasudevan (2004)
<i>HX4</i>	2,586	35	0,160	55	15	Hysys (2013) Ulrich & Vasudevan (2004)
<i>HX5</i>	2,586	104	0,160	98	15	Hysys (2013) Ulrich & Vasudevan (2004)
<i>HX6</i>	2,586	104	0,160	98	15	Hysys (2013) Ulrich & Vasudevan (2004)
<i>HX7</i>	2,586	104	0,160	98	15	Hysys (2013) Ulrich & Vasudevan (2004)

Para las centrífugas (CN1 a CN10), su costo ( $C_{eq6}$ ), en \$, viene dado por la ecuación (5.84) en función del caudal de entrada a las mismas. El factor de corrección por material y presión utilizado es  $F_{BM}=3,4$ .

$$C_{eq6} = \frac{I_{CE}}{400} \cdot F_{BM} \cdot 673549 \cdot \left( \frac{1}{3600} \cdot \sum_k^K \sum_{j=1}^{39} \frac{f_{\theta,j}^k}{\rho_{\theta}^k} \right)^{0,2977} \quad (5.84)$$

El costo de las mallas vibratorias ( $C_{eq7}$ ), en \$, correspondiente a los equipos ML1 a ML3 se calcula a partir de una correlación no lineal que es función de la potencia necesaria para producir las vibraciones en las mallas y remover los sólidos contenidos en la corriente de proceso, ( $Pot$ ), en kW. El factor de corrección por material y presión para este equipo es  $F_{BM}=3,5$ .

$$Pot = 2 \cdot \rho_{\theta}^{k,sol} \cdot \frac{1}{3600 \cdot D_p^{1,3}} \cdot \sum_k^K \sum_{j=1}^{39} f_{\theta,j,sol}^k \quad (5.85)$$

$$C_{eq7} = \frac{I_{CE}}{400} \cdot (-0,29 \cdot Pot^2 + 97,65 \cdot Pot + 888,42) \cdot F_{BM} \quad (5.86)$$

Las ecuaciones (5.87) a (5.88) se implementan para el cálculo del costo de la cinta transportadora (CT). Se considera un largo de la cinta  $L_{cinta}=25$  m y un diámetro  $D_{cinta}=0,32$  m. Asimismo, los factores de corrección por material y presión para la cinta y el motor son de  $F_{BM1}=2,2$  y  $F_{BM2}=2$ , respectivamente.

$$Pot = 0,07 \cdot L_{cinta} \cdot \left( \frac{1}{3600} \cdot \sum_k^K \sum_{j=1}^{39} f_{\theta,j}^k \right)^{0,85} \quad (5.87)$$

$$C_{eq8} = \frac{I_{CE}}{400} \cdot [(92473 \cdot D_{cinta}^2 - 20280 \cdot D_{cinta} + 5761,3) \cdot F_{BM1} + (304,52 \cdot Pot^{0,3467}) \cdot F_{BM2}] \quad (5.88)$$

El costo de los secadores tipo spray SD1 y SD2 se estima a partir de las ecuaciones (5.89) a (5.91), donde el caudal de aire necesario para el secado ( $air_{rate}$ ), en  $m^3/h$ , se obtiene a partir de la cantidad de agua que ingresa al equipo ( $\sum_k^K \sum_{j=6} f_{\theta,j}^k$ ) teniendo en cuenta los siguientes parámetros: libras de agua por libra de aire seco a la entrada y salida del equipo,  $Pent_{W/AS}=0,008$  y

$P_{sal_{W/AS}}=0,0375$ , respectivamente; volumen específico a la entrada y salida del secador,  $v_{ent}=17,6$  pie<sup>3</sup>/lb y  $v_{sal}=14,9$  pie<sup>3</sup>/lb, respectivamente. El tiempo de residencia considerado resulta de  $t_{resid}=16$  s.

$$air_{rate} = \left[ \frac{\sum_k^K \sum_{j=6} f_{\theta,j}^k}{(P_{sal_{W/AS}} - P_{ent_{W/AS}})} \cdot \left( \frac{1}{0,45} \right) \right] \cdot \left( \frac{v_{ent} + v_{sal}}{2} \right) \cdot 0,3048^3 \quad (5.89)$$

$$V = air_{rate} \cdot t_{resid} \cdot \left( \frac{1}{3600} \right) \quad (5.90)$$

$$C_{eq9} = 7712,6 \cdot V + 206139 \quad (5.91)$$

El costo de los equipos destinados a la molienda de material (MO1 a MO3) se obtiene por medio de las ecuaciones (5.92) a (5.93). El factor de corrección por material y presión para estos equipos posee un valor de  $F_{BM}=2,8$ .

$$Pot = 0,006 \cdot \frac{1}{3600 \cdot D_p} \cdot \sum_k^K \sum_{j=1}^{39} f_{\theta,j}^k \quad (5.92)$$

$$C_{eq10} = \frac{I_{CE}}{400} \cdot (6196,9 \cdot Pot^{0,1441}) \cdot F_{BM} \quad (5.93)$$

El costo de los hidrociclones (HC1 y HC2), se estima mediante la ecuación (5.94) con un valor de  $F_{BM}=3,4$ .

$$C_{eq11} = \frac{I_{CE}}{400} \cdot F_{BM} \cdot 673549 \left( \frac{1}{3600 \cdot \rho_{\theta}^k} \cdot \sum_{j=1}^{39} f_{\theta,j}^k \right)^{0,2977} \quad (5.94)$$

El tanque aglutinante (TA) se diseña y se evalúa económicamente mediante las ecuaciones (5.95) a (5.97) donde  $F_{BM}=3$ .

$$D = \left( \frac{\sum_k^K \sum_{j=1}^{39} f_{\theta,j,sol}^k}{3600 \cdot 0,001} \right)^{0,5} \quad (5.95)$$

$$Pot = 0,006 \cdot D^2 \quad (5.96)$$

$$C_{eq12} = \frac{I_{CE}}{400} \cdot F_{BM} \cdot (454,55 \cdot D^2 + 4663,6 \cdot D + 9909,1) \quad (5.97)$$

El costo del intercambiador de calor HX2 que involucra la inyección de vapor para lograr un mezclado apropiado, se determina a partir de las ecuaciones (5.98) y (5.99).

$$Pot = \frac{5}{3600} \cdot \sum_k^K \sum_{j=1}^{39} f_{\theta,j}^k \quad (5.98)$$

$$C_{eq13} = \frac{I_{CE}}{400} \cdot (-5,09 \cdot Pot^2 + 738,59 \cdot Pot + 5248,2) \quad (5.99)$$

El diseño y cálculo del costo de la torre de secado del bagazo de la caña de azúcar (DR) se realiza mediante las ecuaciones (5.100) a (5.106), donde la relación altura-diámetro se considera  $rel_{H/D}=5$  y el factor de corrección por material y presión corresponde a  $F_{BM}=4$ .

$$V_{ret} = \sum_k^K \sum_{j=1}^{39} \frac{f_{\theta,j}^k \cdot t_{ret,k}}{\rho_{\theta}^k} \quad (5.100)$$

$$t_{ret,k} = \frac{70}{3600} \cdot rel_{H/D} \quad (5.101)$$

$$V_{tot} = V_{ret} + V_1 + V_2 \quad (5.102)$$

$$D = \left( \frac{4 \cdot V_{tot}}{\pi \cdot \left(\frac{H}{D}\right)} \right)^{(1/3)} \quad (5.103)$$

$$H = D \cdot rel_{H/D} \quad (5.104)$$

$$Pot = 6 \cdot D^2 \quad (5.105)$$



$$C_{eq14} = \frac{I_{CE}}{400} \cdot F_{BM} \cdot 57867 \cdot \left(\frac{\pi}{4} \cdot D^2\right)^{0,2387} \quad (5.106)$$

Según Moncada *et al.* (2014), la energía eléctrica del horno (FR) viene dada como función de la energía que genera, como lo indica la ecuación (5.107), mientras que el costo del mismo es una relación no lineal de la energía generada, corregido por los siguientes factores:  $F_{BM}=1,8$  y  $f_p=1,7$ .

$$Pot = 0,002 \cdot \frac{531,16}{26589} \cdot \frac{1}{3600} \cdot 10^6 \cdot \sum_k^K \sum_{j=1}^{39} f_{\theta,j}^k \quad (5.107)$$

$$C_{eq15} = \frac{I_{CE}}{400} \cdot F_{BM} \cdot f_p \cdot 1,15.5127,4 \cdot \left( \frac{531,16}{26589} \cdot \frac{1}{3600} \cdot 10^6 \cdot \sum_k^K \sum_{j=1}^{39} f_{\theta,j}^k \right)^{0,3988} \quad (5.108)$$

Por otro lado, el costo de la turbina (TB) se establece a partir de la inclusión de la ecuación (5.109).

$$C_{eq16} = \frac{I_{CE}}{400} \cdot F_{BM} \cdot 6137,4 \cdot \left( \frac{293,44}{26589} \cdot \frac{1}{3600} \cdot 10^6 \cdot \sum_k^K \sum_{j=1}^{39} f_{\theta,j}^k \right)^{0,4127} \quad (5.109)$$

El costo del secador rotatorio necesario para la obtención de cachaza (RD) se calcula a partir de las ecuaciones (5.110) y (5.111), como se muestra a continuación.

$$Pot = 0,007 \cdot \frac{1}{3600 \cdot D_p} \cdot \sum_k^K \sum_{j=1}^{39} f_{\theta,j}^k \quad (5.110)$$

$$C_{eq17} = \frac{I_{CE}}{400} \cdot F_{BM} \cdot 2724,5 \cdot Pot^{0,4616} \quad (5.111)$$

### 5.3.5. Función objetivo

La función objetivo que se busca maximizar para el análisis económico viene dada en términos del valor presente neto (VPN), el cual se calcula utilizando el dólar estadounidense como moneda, por lo tanto, en este capítulo, el símbolo \$ representará al dólar.

$$VPN = -I + UT \cdot a^{-1} + (V_{recup}) \cdot f^{-1} \quad (5.112)$$

Donde  $I$  es el costo total de inversión que es igual a la suma del capital fijo ( $C_{fijo}$ ) y el capital de trabajo ( $C_{trabajo}$ ) como se muestra a continuación:

$$I = C_{fijo} + C_{trabajo} \quad (5.113)$$

El capital fijo es el costo actualizado de los equipos ( $C_{equipos}$ ) considerando un factor de contingencia e impuestos ( $\alpha = 0,18$ ) y un factor de cimientos ( $\beta = 1,3$ ) debido a la suposición de una planta totalmente nueva. Además se añaden aquí los costos del terreno y los referidos a cañerías e instrumentación. El capital de trabajo se asume como un 10 % del capital fijo según la recomendación de Ulrich & Vasudevan (2004).

$$C_{fijo} = C_{equipos} \cdot (\alpha + \beta) + C_{terreno} + C_{cañe/instr} \quad (5.114)$$

$$C_{trabajo} = 0,1 \cdot C_{fijo} \quad (5.115)$$

En la ecuación (5.113),  $UT$  corresponde a las utilidades que se espera del proyecto, anualmente. En esta variable se involucran las ganancias por venta de los productos y subproductos ( $IT$ ) como así también los costos de manufactura ( $C_{manufactura}$ ) (costos directos e indirectos), los costos generales ( $C_{generales}$ ) (costos administrativos, de distribución e investigación y desarrollo) y el impuesto a las ganancias ( $IMP_{gan}$ ).

$$UT = IT - (C_{manufactura} + C_{generales} + IMP_{gan}) \quad (5.116)$$

El valor de recuperación ( $V_{recup}$ ) es el ingreso estimado por venta de equipamiento (20 % de la inversión inicial) y recuperación del capital de trabajo al final de la vida útil del proyecto.

$$V_{recup} = C_{trabajo} + 0,2 \cdot I \quad (5.117)$$

Por su parte,  $a$  es el factor de anualización y  $f$  es el factor utilizado para traer valores del futuro al presente. Ambos se calculan para una vida útil de la planta  $n$  de 15 años y 10 % de la tasa de interés  $i$ .

$$a = \left[ \frac{i \cdot (1 + i)^n}{(1 + i)^n - 1} \right] \quad (5.118)$$

$$f = (1 + i)^n \quad (5.119)$$

En el ANEXO B se presentan con mayor detalle el cálculo de todas las variables involucradas en la estimación de costos.

### 5.3.6. Análisis de sensibilidad

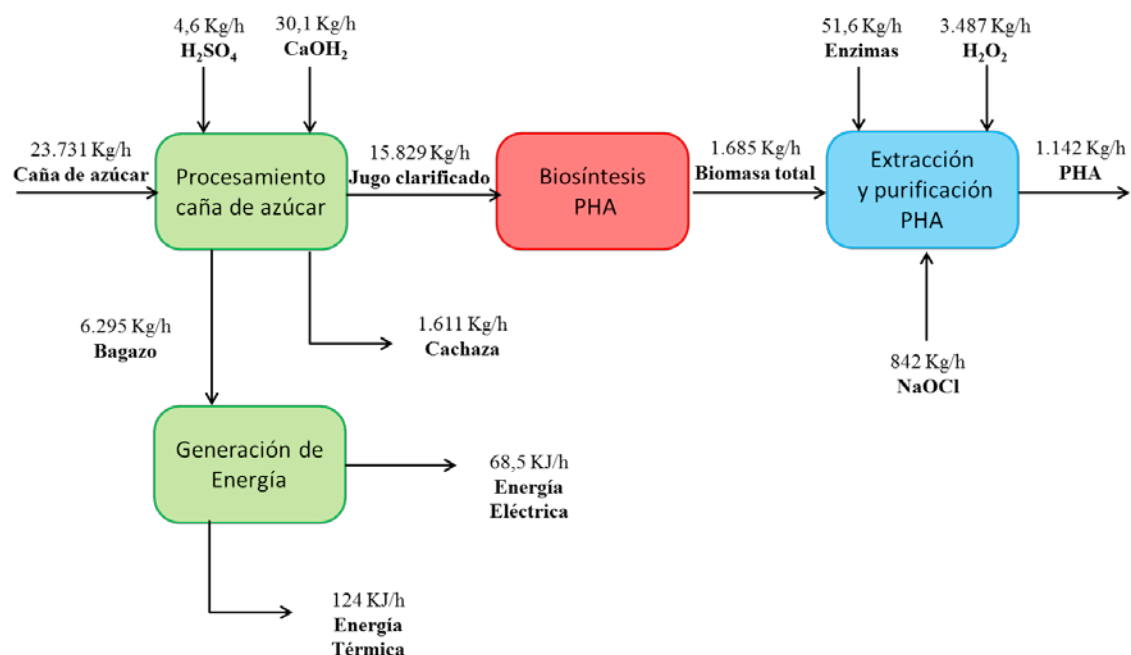
Se lleva a cabo un análisis de sensibilidad con el objetivo de evaluar el impacto que tiene la incertidumbre de ciertos parámetros sobre la función objetivo. Del mismo modo, este estudio aporta información valiosa con respecto a las potenciales mejoras tecnológicas y de mercado que pueden ser implementadas para lograr un mayor beneficio económico en la ruta tecnológica óptima.

### 5.4. Resultados y discusión

El modelo MINLP para la producción de 10.000 t/año de PHA se formula en GAMS 24.2.3 (McCarl *et al.*, 2017). Todos los estudios computacionales se realizan en una computadora con procesador Intel® Core™ i7-3770K, CPU 3,50 GHz y 8 Gb de RAM.

El modelo matemático formulado incluye 8.249 variables continuas, 25 variables discretas y 7.456 restricciones y se resuelve utilizando DICOPT (CONOPT y CPLEX) (Grossmann *et al.*, 2003) en un tiempo CPU de 14,625 s, determinando un VPN=75,01 MM\$. Asimismo, para corroborar que la solución obtenida mediante DICOPT resulta un óptimo global, se utiliza el solver de optimización global BARON (Tawarmalani & Sahinidis, 2005), obteniéndose el mismo valor de la función objetivo (VPN=75,01 MM\$) en un tiempo CPU de 35 min y 4,593 s con GAP relativo y absoluto de 0,001 y  $0,246197 \cdot 10^6$ , respectivamente.

El diagrama de flujo óptimo correspondiente a la maximización de VPN incluye el uso de caña de azúcar como fuente de carbono para la producción de biopolímeros, utilizando como método de extracción el enzimático. La Figura 5.5 muestra los valores óptimos de las principales corrientes para el esquema óptimo de la planta de producción PHA.



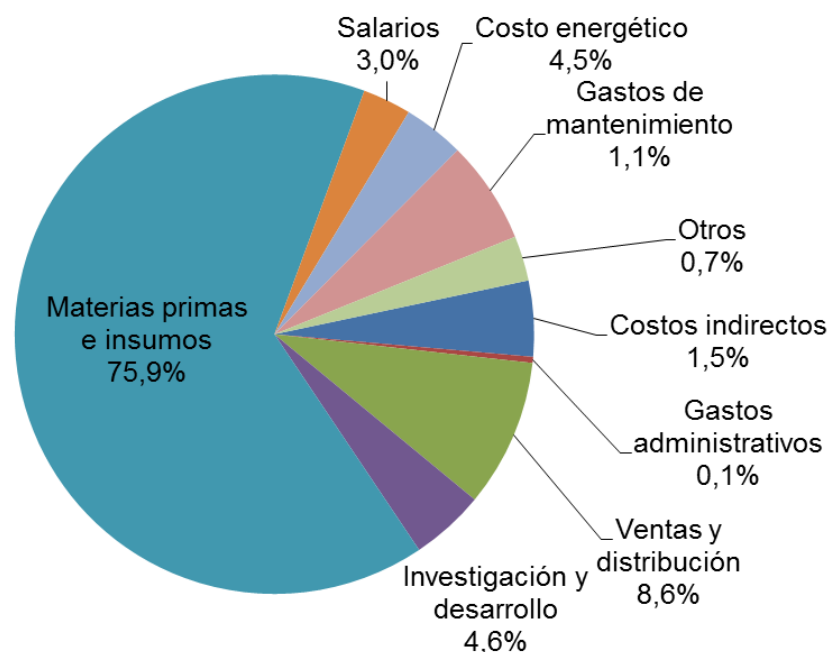
**Figura 5.5.** Resultados de la optimización de la biorrefinería para la producción PHA.

Una capacidad de producción de PHA correspondiente a 1.142 kg/h (10.000 t/año) resulta similar a la de numerosas plantas industriales instaladas actualmente, como Metabolix, TianAn Biologic Material Co, Tianjin GreenBio y Bio-on (Levett *et al.*, 2016). La masa de caña de azúcar necesaria en la configuración óptima para la producción de PHA establecida es de 23.731 kg/h (0,208 MMt/año). La misma corresponde aproximadamente al 1 % de la producción total estimada de Argentina para la temporada 2017/2018 de 22,5 MMt/año (Joseph, 2017), lo cual indica la factibilidad de este tipo de proceso a partir de caña de azúcar.

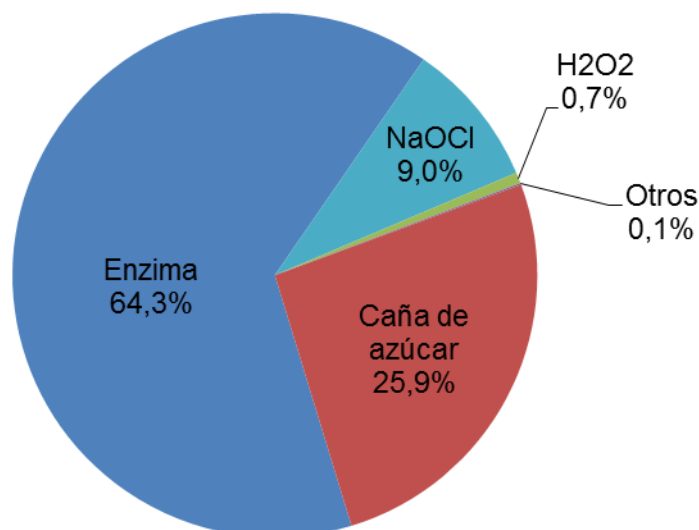
Basado en los precios de mercado internacionales para las materias primas y productos, el valor presente neto correspondiente a la configuración óptima es de 75,01 MM\$. Para este caso, el costo de producción de PHA es de 3,02 \$/kg PHA, coincidente con lo reportado por Koller *et al.* (2012) respecto de los costos de producción de PHA en el mundo, los cuales se encuentran alrededor de 3 \$/kg. Asimismo, en Brasil, donde la producción de biopolímeros se realiza a partir de caña de azúcar en la mayoría de los casos, los costos de producción se encuentran entre 2,5 y 5 \$/kg (Squiao and Aragão, 2004).

En la Figura 5.6 se muestra el desglose de los costos que contribuyen al costo de producción de PHA para la configuración óptima. Como puede observarse,

la mayor contribución viene dada por los costos de materias primas e insumos necesarios en el proceso productivo, representando un 75,9 % del total del costo de producción. Se destaca que, en particular, el costo de la fuente de carbono resulta un 26 % del costo de producción del biopolímero, como se muestra en la Figura 5.7. Estos resultados están en concordancia con lo que reportan numerosos autores (Levett *et al.*, 2016; Khosravi-Darani *et al.*, 2013; Naranjo *et al.* 2013; López *et al.*, 2012; Koller *et al.*, 2012, 2010b; Posada *et al.*, 2011), los cuales mencionan que la fuente de carbono puede llegar a representar hasta un 45 % del costo de producción. De la Figura 5.7 también puede destacarse que una de las estrategias para disminuir el costo de producción de PHA, sería reducir los costos de las enzimas empleadas en el sector de extracción del polímero, las cuales poseen un precio de 28 \$/kg (Kapritvhkoff *et al.*, 2006). Una contribución a esto último podría surgir a partir del ensayo de enzimas de menor costo para el proceso de extracción del biopolímero generado intracelularmente por el microorganismo.



**Figura 5.6.** Distribución del costo de producción de PHA.

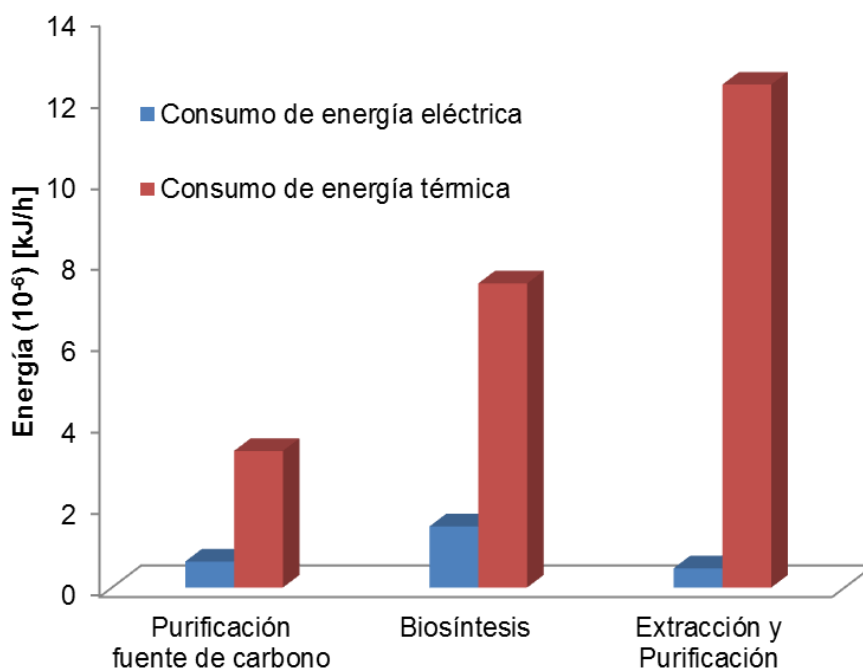


**Figura 5.7.** Distribución del costo de materias primas e insumos.

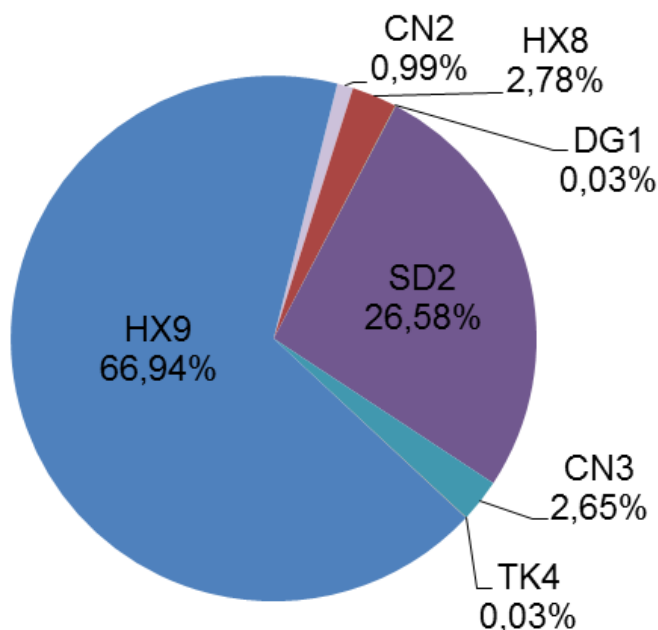
Con relación al análisis energético de la planta completa, se obtiene que el consumo de energía para la producción de PHA es de 22,56 MJ/kg PHA siendo este valor comparable con los reportados en la literatura. Akiyama *et al.* (2003) reportaron un consumo de 41,88 MJ/kg PHA en una planta de 5.095 t anuales donde el biopolímero se produce a partir de aceite de soja. Por otra parte, Lopez-Arenas *et al.* (2017) obtuvieron un consumo de energía de 26,6 MJ/kg PHB (biorreactor fedbatch) y 29,2 MJ/kg PHB (biorreactor batch), como resultado de un estudio económico de una planta de producción de PHB a partir de sacarosa.

A partir de la Figura 5.8 se puede inferir que el mayor consumo se encuentra asociado al sector de extracción y purificación, con un total de  $12,80 \cdot 10^6$  kJ/h, donde el mayor porcentaje corresponde a energía térmica (96 %).

En un análisis energético más específico de este sector, se puede destacar que el intercambiador (HX9) utilizado para evaporar el agua contenida en la corriente de proceso, es el equipo que mayor energía requiere junto con el secador por spray (SD2) utilizado para purificar el producto final (Figura 5.9). En este sentido, la aplicación de una integración energética donde se involucre a estos equipos podría resultar en un impacto positivo para el ahorro de energía.



**Figura 5.8.** Distribución de la energía consumida en la planta de producción de PHA.



**Figura 5.9.** Distribución de la energía consumida por los equipos en el sector de extracción y purificación.

Debido a que el VPN no proporciona por sí solo la información necesaria para determinar la rentabilidad de un proyecto, se calculan índices adicionales (Tabla 5.8) para una tasa de descuento (TREMA) del 10 %, considerando una vida útil del proyecto de 15 años. La tasa interna de retorno (TIR) representa el valor máximo que podría adquirir la TREMA utilizada para evaluar el proyecto, ya que a partir de ese valor, el VPN comienza a hacerse negativo. En este caso, la TIR resulta 52,53 %, lo cual al estar distante del valor de la TREMA (10

%) asegura, en cierto aspecto, una seguridad en la factibilidad del proyecto. Por otro lado, el retorno sobre la inversión actualizado ( $ROI_A$ ) tiene en cuenta el valor del dinero e indica el porcentaje de ganancia que se espera obtener a partir del capital total invertido, siendo en este caso del 22 %. Finalmente, el período de repago actualizado ( $PR_A$ ) indica la liquidez del proyecto, es decir, indica el tiempo en el que se recupera la inversión; en este caso, resulta de aproximadamente 3 años.

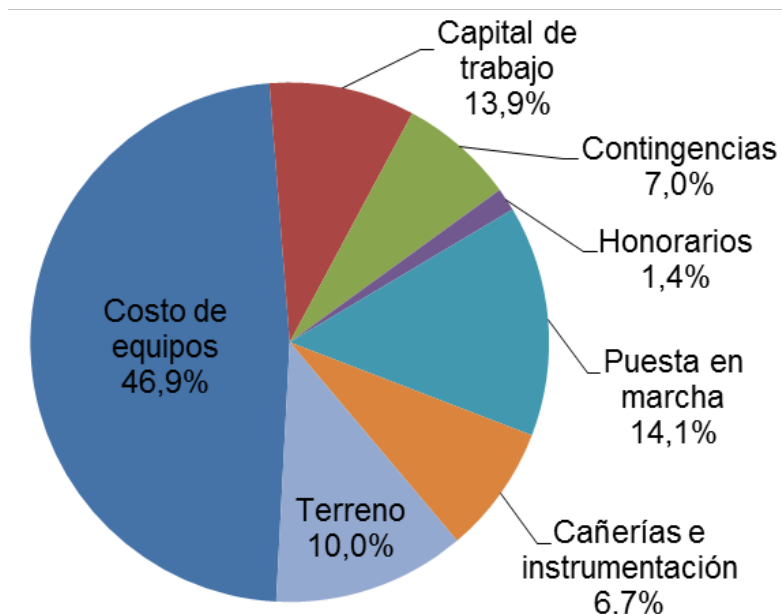
En relación a lo reportado por Lopez-Arenas *et al.* (2017), siempre que el costo de producción de PHA sea menor al precio de venta, un proceso productivo de este biopolímero puede considerarse rentable si el  $ROI_A$  es mayor al 20 % y el  $PR_A$  menor o igual a 3 años. En este trabajo, como se observa en la Tabla 5.8, ambos índices calculados para la ruta tecnológica óptima satisfacen estas condiciones.

**Tabla 5.8.** Índices de rentabilidad considerados en la evaluación económica.

Índice de rentabilidad	Valor	Unidades
VPN	75,01	MM\$
TIR	52,53	%
$ROI_A$	22,36	%
$PR_A$	3	años

El capital invertido tiene en cuenta las inversiones necesarias para la construcción de la planta (cañerías e instrumentación, adquisición del terreno, contingencias, honorarios de construcción), su puesta en marcha, el capital de trabajo y el costo de los equipos. La inversión total para la planta de producción de PHA a partir de caña de azúcar es de 21,335 MM\$ y su distribución se muestra en la Figura 5.10.



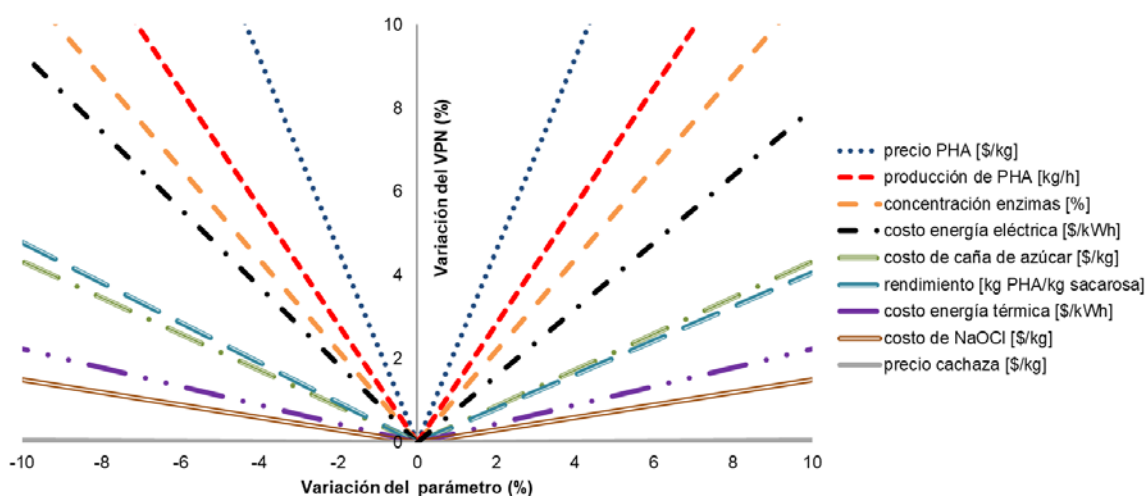


**Figura 5.10.** Distribución de la inversión inicial.

Posteriormente, se efectuó un análisis de sensibilidad con el objetivo de evaluar la influencia de los valores de los parámetros respecto de la función objetivo (VPN), considerando el esquema óptimo (caña de azúcar-extracción enzimática). Como puede observarse en la Figura 5.11, los parámetros más sensibles son el precio de venta de biopolímero, junto con la cantidad que se produce del mismo, la concentración de enzimas en el digestor (DG1) perteneciente al sector de extracción y el precio de la energía eléctrica. Adicionalmente, el VPN es considerablemente sensible a cambios en el costo de caña de azúcar y NaOCl, conjuntamente con el costo de la energía térmica y el rendimiento establecido en los biorreactores para la biosíntesis del polímero. Por otro lado, parámetros como el precio de la cachaza generada durante el proceso de purificación de la caña de azúcar poseen muy poca influencia sobre la función objetivo. Ejemplificando esto último, se puede ver que un incremento del 10 % en el precio de la cachaza de caña de azúcar representa tan solo una variación del 0,06 % en la función objetivo.

El análisis de sensibilidad es una herramienta que permite establecer los aspectos donde se deberían concentrar los esfuerzos para obtener mayores beneficios con las tecnologías obtenidas en la producción de PHA. A pesar que algunos de los parámetros tenidos en cuenta en el estudio dependen exclusivamente de la situación del mercado (precio del PHA, cachaza, NaOCl,

caña de azúcar y energías térmica y eléctrica), existen otros relacionados con aspectos referentes al proceso que podrían generar un impacto positivo en la economía del proceso. Tales parámetros podrían ser el incremento en la capacidad de producción de PHA o la operación con enzimas que logren el mismo efecto de extracción, con una menor concentración. Asimismo, la influencia del rendimiento de los microorganismos en el sector de biosíntesis, indican la importancia de contar con información fehaciente del aspecto biológico del modelo.



**Figura 5.11.** Análisis de sensibilidad de la planta de producción de PHA.

Un beneficio de este tipo de análisis mediante la formulación de superestructura, es la posibilidad de investigar el potencial económico que poseen otras rutas tecnológicas, además de la óptima. Esto puede realizarse mediante la propuesta de Grossmann & Kravanja (1995), incorporando cortes enteros como restricciones al modelo formulado previamente. De esta manera, se genera sistemáticamente una lista de los caminos de procesamiento subóptimos que también pueden resultar atractivos y considerados para futuras mejoras. La siguiente ecuación se implementa para la generación de cortes enteros asegurando que el algoritmo no regrese a una solución entera ya encontrada una vez que se alcanzó la convergencia:

$$\sum_{i \in A^n} y_i - \sum_{i \in B^n} y_i \leq |A^n| - 1 \tag{5.120}$$

$$n = 1, \dots, N$$

Donde  $A^n = \{i|y_i^k = 1\}$ ,  $B^n = \{i|y_i^k = 0\}$  y N es el número de cortes que se desean realizar.

En la Tabla 5.9 se muestran las primeras 4 alternativas tecnológicas comparadas con el óptimo global del problema. Se observa que la utilización de la caña de azúcar como materia prima es la opción más rentable, relegando a un segundo lugar el empleo de melaza de caña como sustrato para el crecimiento de los microorganismos productores de PHA. En lo que respecta a la tecnología de extracción más promisorio por debajo de la extracción enzimática, se encuentra la que utiliza surfactante y quelato, seguida de la extracción donde se emplea surfactante y NaOCl.

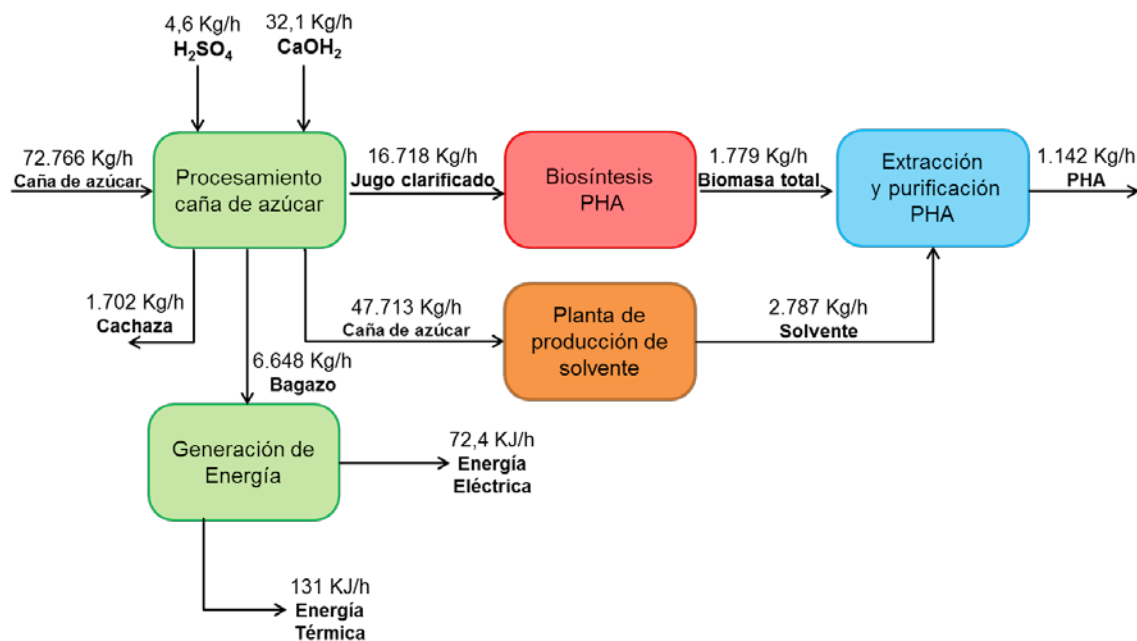
**Tabla 5.9.** Set de potenciales rutas tecnológicas de procesamiento de PHAs.

	VPN (MM\$)	Tecnología utilizada para procesamiento
Óptimo global	75,01	Caña de azúcar-extracción enzimática
Alternativa 1	60,27	Caña de azúcar-extracción surfactante y quelato
Alternativa 2	58,16	Caña de azúcar-extracción con surfactante y NaOCl
Alternativa 3	0,57	Melaza de caña de azúcar- extracción enzimática
Alternativa 4	-21,39	Melaza de caña de azúcar- extracción surfactante y quelato

Basado en este análisis, se destaca que la extracción de biopolímero por solvente no resulta una opción económicamente viable (VPN=-688,69 MM\$) debido a la alta relación solvente/biomasa total (20/1) y al alto costo del mismo. Por esa razón, se extiende la superestructura propuesta con una sección de producción de solvente (bioetanol) a partir de caña de azúcar (Figura 5.12).

En este sentido, se incorporan las restricciones de costos de capital asociado a los equipos necesarios para este objetivo, con el consiguiente aumento en el requerimiento de caña de azúcar. Luego de la resolución de esta implementación, se halló como valor de la función objetivo un VPN de 45,12 MM\$, que, aún lejos de las tecnologías óptimas, podría ser económicamente

viable frente a las alternativas 3 y 4 (Tabla 5.9). Este resultado se muestra en concordancia con lo reportado por Walsem *et al.* (2007) y Mantelatto *et al.*, (2008) donde se propone la extracción de PHA a partir de la utilización de solvente generado a partir de la caña de azúcar, resultando en un proceso productivo económicamente atractivo.



**Figura 5.12.** Resultados de la planta de producción PHA mediante extracción con solvente.

## 5.5. Conclusiones

En este capítulo se ha formulado una superestructura que incluye diferentes alternativas tecnológicas para la producción de PHA, como un problema MINLP.

Los resultados de la optimización muestran que para la alternativa donde se emplea caña de azúcar como materia prima y enzimas como agente de extracción, la función objetivo toma su máximo valor, correspondiente a VPN=75,01 MM\$. Por otra parte, mediante el cálculo adicional de otros índices de rentabilidad como la TIR de 52,53 %, el ROI<sub>A</sub> de 22 % y el PR<sub>A</sub> de 3 años, la evaluación económica del proceso de biosíntesis de PHA indica el atractivo de esta propuesta productiva. El costo del biopolímero resulta de 3,02 \$/kg y requiere 22,56 MJ/kg PHA para su producción.

Para este escenario, el análisis de sensibilidad realizado muestra los potenciales parámetros que deberían tenerse en cuenta para lograr mejoras en el proceso de producción, siendo los más relevantes el precio de venta, la capacidad de la planta, la concentración de enzimas utilizadas en el sector de extracción-purificación y el costo de la energía eléctrica. De esta manera, la estrategia de programación matemática implementada con el análisis de sensibilidad efectuado, permite explorar la producción de un biopolímero de alto interés como el PHA.



# CAPÍTULO 6

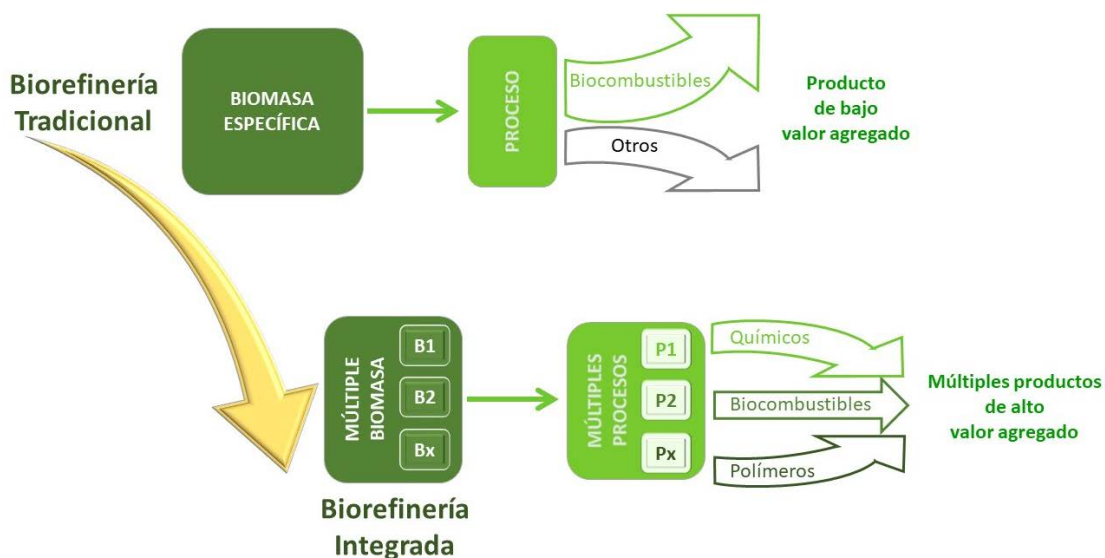
## DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE UNA BIORREFINERÍA INTEGRADA

### 6.1. Introducción

En los últimos años, con el objetivo de complementar la producción de combustibles fósiles, muchos investigadores han dedicado sus esfuerzos al estudio de la producción de biocombustibles a partir de diferentes tipos de materia orgánica (Menegazzo & Fonseca, 2019; García Prieto *et al.*, 2017; Pinedo *et al.*, 2016; Rizwan *et al.*, 2015; García & You, 2015; Martín & Grossmann, 2013) Los biocombustibles de primera generación se presentan como una opción no atractiva debido al potencial estrés que generan en distintos lugares del mundo, donde la idea de emplear alimentos y tierras fértiles para la producción de combustibles no es bien recibida (Cherubin, 2010). En este contexto, el desarrollo de biocombustibles de segunda, tercera y cuarta generación, donde las materias primas empleadas son biomasa lignocelulósica y algal (Raheem *et al.*, 2018), constituyen una alternativa en vistas de contribuir con la independencia energética de los combustibles fósiles (Ramos *et al.*, 2016). De este modo, el escenario donde se involucran estas materias primas alternativas parece atractivo, ya que además de existir una amplia variedad, son relativamente económicas y se encuentran fácilmente disponibles. Por otro lado, su utilización permitiría la coproducción de los mencionados biocombustibles como así también de compuestos químicos y energía eléctrica y térmica, conduciendo al logro de un mejor rendimiento de este tipo de procesos mediante el concepto de biorrefinería (Kamm *et al.*, 2006).

Una biorrefinería es una instalación donde se integran procesos de conversión de biomasa y equipos para producir biocombustibles, energía y productos químicos a partir de biomasa (Kokossis *et al.*, 2015). Este concepto representa un cambio importante respecto de las refinerías tradicionales, las cuales producen combustibles y productos a partir de combustibles fósiles (Lai *et al.*, 2017). Sin embargo, para lograr una valorización adicional de las biorrefinerías, se propone la implementación de una biorrefinería integrada (Figura 6.1), la cual se enfoca en la integración de diversas tecnologías para la conversión de

biomasa (Dietrich *et al.*, 2019; Abdelaziz *et al.*, 2015; Kokossis, 2014; Moncada *et al.*, 2013). Como resultado de esto último, múltiples materias primas basadas en biomasa pueden ser utilizadas para generar un amplio abanico de bioproductos conjuntamente con biocombustibles, bioquímicos, bioenergía y otros biomateriales (Ng *et al.*, 2017).



**Figura 6.1.** Evolución del concepto de biorrefinería tradicional hacia biorrefinería integrada.

Actualmente, la producción de biocombustibles de tercera generación en base microalgal ha sido progresivamente abordado por recientes investigaciones. Esto se debe a la particularidad de que no solo se producen combustibles mediante organismos autótrofos, sino que también lo hacen contribuyendo con el secuestro de dióxido de carbono del medio (Ramos *et al.*, 2016). En este sentido, Chisti (2007) lleva a cabo un análisis detallado de las microalgas y sus capacidades, las cuales se presentan como un importante recurso para el abastecimiento de combustible a nivel mundial. En su trabajo, concluye que una disminución en los costos de producción permitiría establecer al biodiesel microalgal como un combustible económicamente competitivo.

Distintos trabajos se enfocaron en la evaluación tecnoeconómica de la producción de biodiesel a partir de microalgas. Stephens *et al.* (2010) estudia diversos sistemas microalgales empleando modelos industriales con el objetivo de proveer información actualizada de análisis económicos previos. Davis *et al.* (2011) consideran dos sistemas diferentes para el crecimiento de la biomasa



algal, piletas abiertas y fotobiorreactores tubulares cerrados, realizando simulaciones con el software Aspen Plus para establecer una base de referencia para la economía de estas dos vías de producción. Por su parte, Brownbridge *et al.* (2014) llevan a cabo un análisis de sensibilidad con el fin de presentar un análisis tecnoeconómico de la producción de biodiesel algal bajo incertidumbre. Gebreslassie *et al.* (2013) proponen un modelo de programación mixto entero no lineal (MINLP) multiobjetivo de una biorrefinería microalgal para la producción de biodiesel donde se maximiza simultáneamente el valor presente neto (VPN) minimizando el potencial calentamiento global. Yan *et al.* (2014a) presentan el estado del arte de la producción biotecnológica de biodiesel empleando aceites obtenidos de microalgas. Asimismo, Pinedo *et al.* (2016) abordan la optimización de una biorrefinería a partir de microalgas donde se incluyen aspectos económicos, complementando con un análisis de riesgo que contribuye en el progreso hacia un proceso sustentable. Sin embargo, recientemente, numerosos autores sugieren que la biomasa microalgal debería ser utilizada no solo para la producción de biocombustible sino también para la obtención de productos de alto valor agregado a fin de mejorar los resultados económicos (García Prieto *et al.*, 2018, García & You, 2015; Harvey *et al.*, 2014; Martín & Grossmann, 2014; Psycha *et al.*, 2014).

Bajo este concepto y teniendo en cuenta que en la industria del biodiesel se generan grandes cantidades de glicerol como subproducto, en una proporción 1/10 (glicerol/biodiesel) luego de la transesterificación del aceite (Yazdani & Gonzalez, 2007), surge la idea de producir biomateriales a partir de este subproducto. El objetivo que se plantea es realizar una contribución a la producción de biocombustibles de tercera generación y estudiar el impacto que tiene incluir la posibilidad de producir biopolímeros mediante el concepto de biorrefinería integrada. Por lo tanto, en este capítulo se propone la implementación de un modelo de programación mixto entero no lineal (MINLP) para la optimización económica de una biorrefinería integrada para la producción simultánea de biodiesel, PHAs y bioenergía a partir de microalgas. El modelo incluye distintas alternativas tecnológicas, sujeto a balances de masa y energía, como así también a correlaciones detalladas del costo de los equipos considerando una capacidad de producción de 43.800 t/año de

biodiesel. La función objetivo que se busca maximizar es el valor presente neto (VPN) del proyecto. Asimismo, se realiza un análisis de sensibilidad con el objetivo de identificar las principales variables que influyen en el desempeño del proyecto y también se llevan a cabo comparaciones mediante el planteo de distintos escenarios con valores de precios del mercado nacional e internacional.

## 6.2. Descripción del Proceso

El proceso productivo considerado en este capítulo se determina a partir de las opciones incluidas en una superestructura de una biorrefinería integrada para la producción de biodiesel microalgal. En la Figura 6.2 se muestra un esquema simplificado de la mencionada superestructura, incluyendo las distintas alternativas tecnológicas. A continuación, se describen de manera detallada cada una de las etapas de procesamiento.

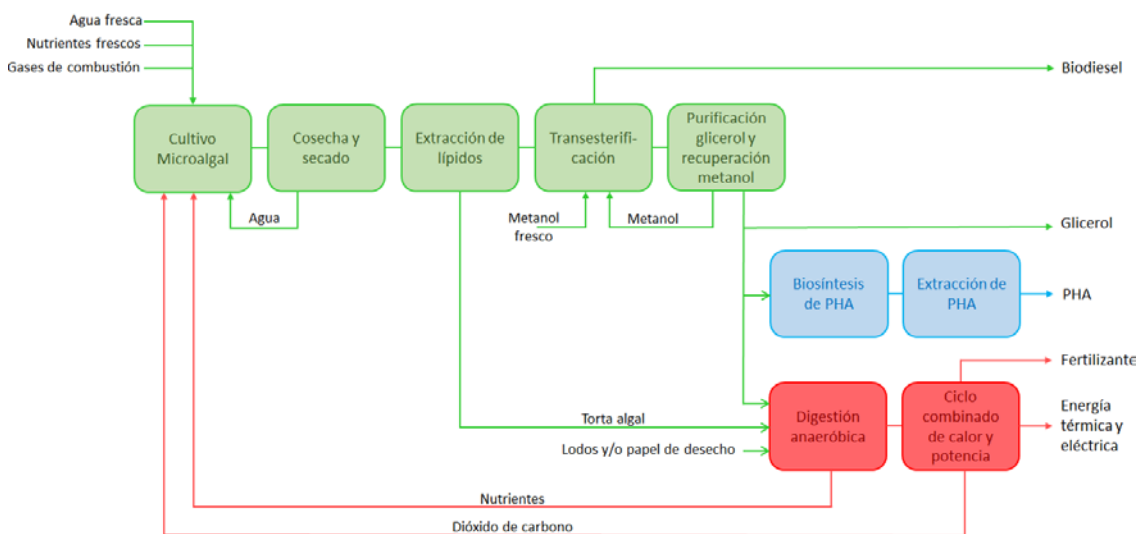


Figura 6.2. Superestructura simplificada de la biorrefinería integrada propuesta.

### 6.2.1. Proceso de producción de biodiesel en base a microalgas

#### 6.2.1.1. Cultivo microalgal

El cultivo de las microalgas tiene ciertos requerimientos básicos, dentro de los cuales se incluyen el dióxido de carbono, el cual es empleado por las microalgas como fuente de carbono para su crecimiento; macro y micronutrientes, principalmente fósforo y nitrógeno; y una fuente de luz. A fin de alinear este bioproceso con los objetivos propuestos por el Protocolo de Kyoto ([www.kyotoprotocol.com](http://www.kyotoprotocol.com), 1998), se propone la utilización de una corriente de

gases de chimenea (fgss) de una termoeléctrica como fuente dióxido de carbono.

Los sistemas destinados al cultivo de microalgas se pueden clasificar principalmente en dos clases: abiertos y cerrados. Las piletas abiertas (OPs) tienen la ventaja de ser relativamente más económicos que los de sistema cerrado como los fotobiorreactores tubulares (TPBRs). Sin embargo, los primeros requieren grandes extensiones de tierras para su establecimiento (Sawant *et al.*, 2018; Banerjee & Ramaswamy, 2017). Por otro lado, Davis *et al.* (2011) reportan que los TPBRs suelen llegar a ser hasta dos veces más costosos que los OPs por litro de lípido extraído: 2,25 \$/L y 4,78 \$/L para OPs y TPBRs, respectivamente, esto se debe a que requieren grandes cantidades de energía para su operación (Gebreslassie *et al.*, 2013). No obstante, la productividad en los TPBRs puede ser mayor que en los OPs: 0,41 g/ (L día) frente a 0,125 g/ (L día), teniendo en cuenta una profundidad de pileta de 0,12 m.

En este capítulo, se consideran dos potenciales alternativas para el cultivo de la cepa *Haematococcus pluvialis* (18,3 % de lípidos, 50,4 % de carbohidratos y 31,3 % de proteínas), un TPBR y un OP. La corriente (fgss) que se emplea como fuente de carbono para el crecimiento de la microalga proviene de una planta termoeléctrica localizada en las cercanías de la biorrefinería, la cual ingresa al sistema totalmente purificada. Asimismo, el dióxido de carbono se suministra por una corriente rica en este componente (rcdo) proveniente de la unidad donde se lleva a cabo un ciclo de calor y potencia (CHP) en el sector de digestión anaeróbica. De manera similar, una corriente reciclada (rnt) del digester anaeróbico (AD) se alimenta al sistema de cultivo microalgal junto con una corriente fresca de nutrientes (mnt) para alcanzar los requerimientos nutricionales de *H. pluvialis* (Manganaro & Lawal, 2016).

#### **6.2.1.2. Cosecha y secado de las microalgas**

Los lodos de microalgas contienen una baja concentración de biomasa (aproximadamente 0,202 g por 1000 g de agua), por lo que se necesitan remover grandes cantidades de agua para obtener una corriente concentrada de biomasa microalgal. En este punto, los procesos de separación sólido-

líquido incluyen sedimentación, flotación y filtración. Los resultados obtenidos por Gebreslassie *et al.* (2013) muestran que la tecnología de filtración permite alcanzar un producto concentrado (alrededor de 40 % de sólidos secos) y a pesar de que este proceso requiere mantenimientos periódicos, resulta de simple implementación y permite alcanzar los máximos valores de VPN para la configuración propuesta. En la superestructura propuesta en este capítulo, se consideran un decantador (DC1), un tanque de acondicionamiento (TAC), una unidad de filtración (FP) y un secador (DRY) como los principales equipos para la cosecha y secado de la biomasa.

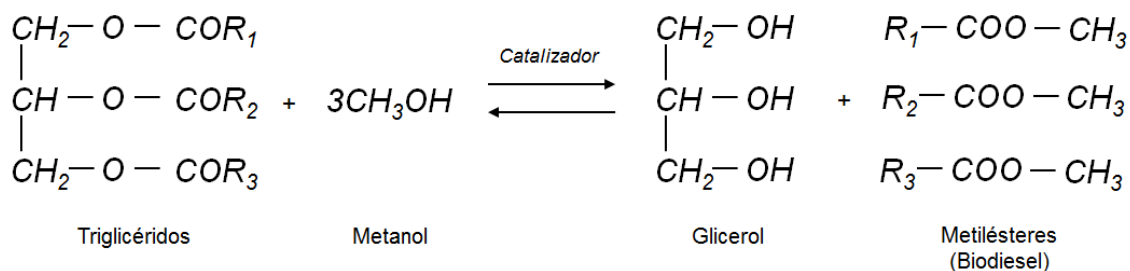
### **6.2.1.3. Extracción de lípidos**

La extracción de lípidos puede llevarse a cabo mediante la utilización de métodos químicos o mecánicos. Extrusoras, prensas y extractores ultrasónicos son algunos de los equipos usados como métodos mecánicos, mientras que extracciones con solventes y fluidos supercríticos son algunos de los métodos químicos comúnmente aplicados para este proceso.

Generalmente, las prensas mecánicas son energéticamente intensivas para el secado de algas, mientras que los solventes químicos introducen aspectos de seguridad y salud al proceso, por lo que estos últimos son generalmente utilizados. En la superestructura propuesta se considera un método de extracción con solvente mediante la incorporación de un extractor de lípidos (LE). El caudal de la corriente fresca de hexano (mh) puede reducirse mediante la incorporación de una sección de recuperación del hexano (HR) (Ferreira *et al.*, 2015). En esta etapa del proceso, se obtiene una corriente rica en lípidos (ao) y una torta de aceite (oc), la cual se envía a un digestor anaeróbico para la generación de energía eléctrica y térmica a partir de biogás.

### **6.2.1.4. Transesterificación de aceites**

El biodiesel se produce a partir de la transesterificación de ácidos grasos con alcoholes de bajo peso molecular, generalmente metanol. La reacción de transesterificación de triglicéridos con metanol puede representarse a partir de la Figura 6.3, donde  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$  pueden ser cadenas de carbono de diferentes longitudes.



**Figura 6.3.** Reacción de transesterificación de triglicéridos.

Debido al mecanismo reversible de la reacción, se requiere un exceso de metanol para la obtención de mayores proporciones de biodiesel desplazando la reacción hacia el lado derecho. A su vez, en la industria del biodiesel, se emplean diversos catalizadores como ácidos, álcalis e incluso enzimas (Tapasvi *et al.*, 2005). En este trabajo se considera la transesterificación de aceite algal en un transesterificador (TRANS) empleando metanol (mets y rme) y metóxido de sodio (smos) como catalizador.

El subproducto y las impurezas contenidas en la corriente rica de biodiesel que sale del TRANS (metanol y metóxido de sodio no reaccionado, jabones, cenizas y glicerol) se separan mediante los siguientes equipos. En primer lugar, se recupera el glicerol mediante decantación (DC2) debido a su mayor densidad relativa al resto de los componentes de la corriente. A continuación, mediante una columna de lavado (WC) con agua a 70 °C se retira la mayoría del resto de los componentes y mediante otro decantador (DC3) se retira la fase acuosa formada a partir de la incorporación de agua. Finalmente, la corriente de salida de DC3 se calienta hasta 90 °C en una torre de secado (SPL) donde se remueven las trazas de impurezas remanentes y se obtiene biodiesel purificado (bds).

#### 6.2.1.5. Purificación de glicerol y recuperación de metanol

Las distintas corrientes obtenidas a partir de la purificación del biodiesel (gp, wst1 y ap) son tratadas en un sector de recuperación. Para ello, las tres corrientes se envían a una torre de despojo (STR) donde se separa metanol, el cual se recircula al proceso de transesterificación luego de ser recuperado con un 99,9 % de pureza (Posada *et al.*, 2011) como destilado en una torre de destilación (DIS).

La solución rica en glicerol obtenida por la corriente inferior de la torre de despojo (STR) se trata con una solución de HCl en un reactor de neutralización (NEUTR). Aquí, el catalizador (metóxido de sodio) reacciona con el HCl para formar metanol y NaCl, por su parte, los jabones presentes en esta corriente reaccionan con el ácido para formar ácidos grasos libres y NaCl. Los ácidos grasos libres y otras impurezas como cenizas y sales recientemente formadas se remueven mediante la utilización de un decantador (DC4) consiguiendo una corriente de glicerol al 80 % en peso. Aquí, se tienen en cuenta la posibilidad de vender el glicerol como producto final y así también de emplearlo como sustrato para la digestión anaeróbica o como fuente de carbono para el proceso de producción de PHA.

## **6.2.2. Proceso de digestión anaeróbica y ciclo combinado de calor y potencia**

### **6.2.2.1. Proceso de digestión anaeróbica**

Dentro del contexto de una biorrefinería integral, se considera la producción de biogás (bg) y fertilizantes (fert) en un digestor anaeróbico (AD) a partir de la torta algal (oc), la cual se compone principalmente de carbohidratos y proteínas. De este modo se logra una mejora en el balance energético del proceso integrado (Ledda *et al.*, 2016). En esta etapa del proceso, la relación carbono/nitrógeno (C/N) es una de las variables más importantes. Relaciones C/N entre 20/1 y 30/1 suelen ser aceptables (Parkin & Owen, 1986), mientras que relaciones desbalanceadas de nutrientes (entre 4/1 y 6/1) se consideran sumamente restrictivas para la operación del AD.

Un método para evitar eventuales inhibiciones en el sector de digestión anaeróbica es ajustar la relación C/N a través de la incorporación de corrientes que posean altos contenidos de carbono. Por esta razón se propone la posibilidad de alimentar una corriente de papel de desecho la cual puede poseer relaciones C/N desde 173/1 a más de 1000/1. En ese sentido, Yen & Brune (2007) muestran que la incorporación de 50 % de desperdicios de papel (basado en sólidos volátiles) a una corriente de lodo algal incrementa la producción de metano, sugiriendo que una relación C/N entre 20/1 y 25/1 para la codigestión de alga y papel es óptima. Asimismo, otros autores como

Ehimen *et al.* (2011), Fountoulakis *et al.* (2010) y Amon *et al.* (1993) muestran que la adición de glicerol con otros sustratos mejora la productividad de metano alcanzando un valor máximo de conversión luego del cual, con una concentración mayor de glicerol, se inhibe la metanogénesis.

En este capítulo se considera la digestión anaeróbica de la corriente de torta algal (oc), proveniente de la extracción lipídica, y la biomasa residual (crms), recuperada del sector de extracción de PHA, para la obtención de biogás (bg) (60 % metano y 40 % dióxido de carbono (Yan *et al.*, 2014b)), un digestato que puede ser vendido como fertilizante (fert) y un licor rico en nutrientes que se recircula al sector de cultivo microalgal (rnt). A su vez se incluyen en el modelo la utilización de potenciales sustratos para lograr alcanzar una relación C/N adecuada: lodos de una planta de tratamiento de aguas residuales (slds), desperdicios de papel (wps) y glicerol (glip1).

#### **6.2.2.2. Ciclo combinado de calor y potencia**

El ciclo combinado de calor y potencia (CHP) produce energía eléctrica (epo) y térmica (hpo) a partir del metano contenido en la corriente de biogás (bg) a la salida del AD. Las unidades de CHP resultan una alternativa eficiente para la producción de electricidad y calor (Diaz *et al.*, 2009), las mismas poseen principalmente tres etapas: generación de potencia, recuperación del calor y empleo de la energía térmica. Usualmente, la distribución de energía en la combustión de una unidad CHP se considera 32 % potencia, 55 % térmica y 13 % pérdidas.

#### **6.2.3. Proceso de producción de PHAs**

##### **6.2.3.1. Producción biotecnológica de PHAs**

La biosíntesis del polímero se realiza mediante el empleo de bacterias productoras de PHAs a partir de una fuente de carbono que se suministra en exceso (glicerol) y una limitación de otros nutrientes esenciales para el crecimiento de la cepa como el nitrógeno y el fósforo. En este caso, se propone la utilización de la industrialmente empleada cepa de *Cupriavidus necator*, debido a la elevada productividad de material polimérico (1,52 g PHA/L h) reportada para este microorganismo (Cavalheiro *et al.*, 2009).

Previo al ingreso de la corriente de glicerol (glip2) a los biorreactores, donde se lleva a cabo la acumulación de biomasa (BR1) y biosíntesis del polímero (BR2), ésta se diluye con agua (wr2) hasta alcanzar una concentración de 249 g/L (Mothes *et al.*, 2007). En este punto, se necesitan dos recipientes para la biosíntesis. En el primero, el crecimiento bacteriano se fomenta sin la limitación de nutrientes con el objetivo de aumentar la biomasa celular, mientras que, en el segundo, se produce el PHA a partir de una limitación en la fuente de nitrógeno. Los tiempos de residencia de cada uno de los biorreactores descritos, son los reportados por Posada *et al.* (2011), 21 h para BR1 y 22,5 h para BR2.

### **6.2.3.2. Extracción y purificación del biopolímero**

La extracción del polímero del citoplasma del microorganismo es una etapa determinante del proceso productivo debido a que aquí se define el precio de venta del proceso. Por lo tanto, una apropiada selección del método de extracción es crucial para la viabilidad económica del proceso (Rodríguez-Perez *et al.*, 2018).

Dentro de los métodos de extracción descritos en literatura se pueden encontrar diversas alternativas: extracción con solvente, liberación espontánea, disrupción mecánica, a través de fluidos supercríticos, métodos químicos, etc. Dentro de ellos, la utilización del método de digestión con surfactante y quelato trae aparejado una baja polución del medio ambiente. Asimismo, la buena calidad del producto final que se obtiene, junto con los mínimos requerimientos de químicos que son necesarios para su implementación (relación en masa de surfactante y quelato frente a la biomasa seca de 0,0075 y 0,01, respectivamente (Chen *et al.*, 2001)), hacen de este método una alternativa promisorio a tener en cuenta en la superestructura propuesta. En este caso, el agregado de una corriente de surfactante y quelato (sch) produce una desestabilización en la membrana interna y externa de la célula mediante la formación de complejos catiónicos divalentes (Jacquel *et al.*, 2008). Estos cambios inducidos en la membrana celular conducen a una disrupción del microorganismo y posterior extracción de un biopolímero con una elevada pureza. La biomasa residual se separa mediante la utilización de una centrífuga



(CN1) y esta se envía al proceso de digestión anaeróbico como sustrato (wst4) (Gong & You, 2015). De esta manera los químicos remanentes en la corriente de proceso son extraídos mediante un decantador (DC5) a través de una corriente de desecho (wst5).

Del mismo modo, se considera el tradicional método de extracción por solvente debido a que este brinda la posibilidad de destinar el PHA en aplicaciones médicas. Los microorganismos Gram negativos como el *Cupriavidus necator* poseen lipopolisacáridos (LPS) en la membrana externa de sus células (Ramos *et al.*, 2014), donde existen fracciones de endotoxinas que podrían causar reacciones inmunogénicas al ser puestas en contacto con seres humanos. Sin embargo, la implementación de un método de extracción con solvente permite la eliminación de endotoxinas generadas por este tipo de microorganismos Gram negativos. Por este motivo, se propone como segunda opción para la extracción, el empleo de una solución de dietilsuccinato (dsst) como solvente en un reactor (RC2) luego de la lisis celular llevada a cabo en un homogeneizador (HOM) y centrífuga (CN2) previamente. La adición del solvente se efectúa en una relación en masa de polímero/solvente de 1/20 (Jacquel *et al.*, 2008). En una etapa de centrifugación posterior, se separa la biomasa residual (wst7) del polímero extraído y finalmente, luego de una etapa de enfriamiento y decantación (DC6) se recupera parte del solvente.

Finalmente, las corrientes de biopolímero resultantes de ambas alternativas de extracción se envían a un secador por aspersion (SD) para purificar el bioproducto hasta lograr una pureza del 99,9 % (Harding *et al.*, 2007).

### 6.3. Modelo matemático

El diseño óptimo de una biorrefinería integrada para la producción de 43.800 t/año de biodiesel a partir de microalgas se realiza basado en la superestructura que se muestra en la Figura 6.4. Se formula un problema MINLP, se implementa en GAMS (McCarl *et al.*, 2017) y se resuelve a optimalidad global, utilizando el solver BARON (Sahinidis, 2014). El modelo incluye la maximización del VPN sujeto a restricciones establecidas por balances de masa y energía, el diseño detallado de los equipos, ecuaciones de costos de capital y restricciones enteras.

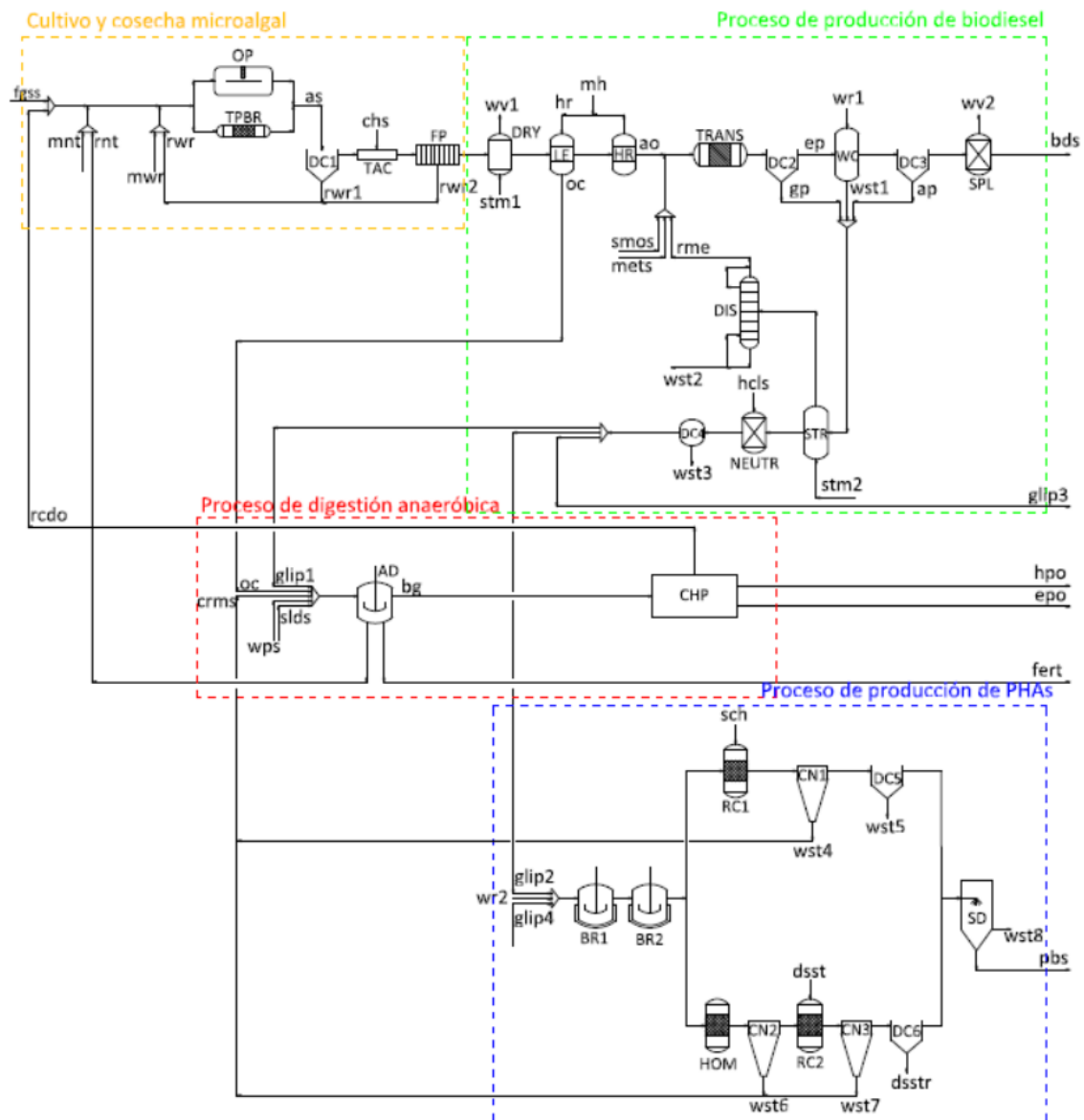


Figura 6.4. Superestructura de la biorrefinería microalgal propuesta.

### 6.3.1. Balance general de masa

Al igual que en el capítulo anterior, los balances de masa para las unidades no reactivas ( $\theta$ ) de la superestructura propuesta (Figura 6.4) se formulan de la siguiente manera:

$$\sum_{k \in K} f_{\theta,j}^k = \sum_{r \in R} f_{r,j}^{\theta} \quad \forall j \in J \quad (6.1)$$

donde:

$f_{\theta,j}^k$  : Caudal másico del componente  $j$  de la corriente de entrada  $k$  hacia la unidad  $\theta$  (kg  $j$ /día)

$f_{r,j}^{\theta}$  : Caudal másico del componente  $j$  desde la unidad  $\theta$  a la corriente de salida  $r$  (kg  $j$ /día)

Los balances de masa de cada unidad reactiva ( $\theta'$ ) se describen con la ecuación (6.2) mediante la utilización de parámetros de rendimiento respecto a los caudales de entrada a los equipos.

$$f_{r,j}^{\theta'} = \sum_{k \in K} f_{\theta',j}^k + \sum_{h \in H} \xi_{j,s_h}^h \cdot C_h \cdot \sum_{k \in K} f_{\theta',s_h}^k \quad \forall j \in J \quad (6.2)$$

donde:

$f_{r,j}^{\theta'}$  : Caudal másico del componente  $j$  desde la unidad reactiva  $\theta'$  a la corriente de salida  $r$  (kg  $j$ /día)

$f_{\theta',j}^k$  : Caudal másico del componente  $j$  desde la corriente de entrada  $k$  hacia la unidad  $\theta'$  (kg  $j$ /día)

$\xi_{j,s_h}^h$  : Coeficiente másico entre el componente  $j$  y el componente  $s_h$  (kg  $j$ /kg  $s_h$ )

para la reacción  $h$

$s_h$  : Reactivo limitante de la reacción  $h$

$C_h$  : Conversión del reactivo limitante para la reacción  $h$

$f_{\theta',s_h}^k$  : Flujo másico del componente  $s_h$  desde la corriente de entrada  $k$  hacia la unidad  $\theta'$  (kg  $s_h$ /día)

En el Anexo C se presentan los balances de masa detallados de cada uno de los equipos involucrados en los distintos sectores de la superestructura propuesta.

### 6.3.2. Balances de energía

El consumo energético de los equipos incluidos en los diferentes sectores de la biorrefinería se modela con relaciones lineales mediante la ecuación (6.3).

$$EC_{\vartheta} = ECR_{\vartheta} \cdot \sum_{j=1} f_{\vartheta,j}^k \quad (6.3)$$

donde:

$EC_{\vartheta}$ : Energía consumida en la unidad reactiva o no reactiva  $\vartheta$  (kJ/h)

$ECR_{\vartheta}$ : Relación de energía consumida por unidad de caudal másico relativo a la unidad reactiva o no reactiva  $\vartheta$  (kJ/kg)

$f_{\vartheta,j}^k$ : Flujo másico del componente  $j$  desde la corriente de entrada  $k$  hacia la unidad reactiva o no reactiva  $\vartheta$  (kg  $j$ /día)

Como excepción, el consumo energético por parte de OP y TPBR se calculan en función del volumen de cada uno de ellos. Para lo cual,  $ECR_{OP}$  y  $ECR_{TPBR}$  poseen valores de 0,089 y 24, en kWh/m<sup>3</sup>, respectivamente. Por su parte, el resto de los parámetros energéticos de los principales equipos se muestran en la Tabla 6.1.

**Tabla 6.1.** Principales parámetros de consumo energético.

Parámetros	Valor	Unidades	Referencia
$ECR_{DC1}$	0,063	kWh/kg alga	Gong & You (2014a)
$ECR_{LE-HR}$	0,581	kWh/kg aceite	Elsayed <i>et al.</i> (2003)
$ECR_{TRANS}$	0,299	kWh/kg biodiesel	Morken <i>et al.</i> (2013)
$ECR_{DC2}$	0,028	kWh/kg biodiesel	Tapasvi <i>et al.</i> (2005)
$ECR_{DC3}$	0,032	kWh/kg biodiesel	Tapasvi <i>et al.</i> (2005)
$ECR_{DRY}$	0,988	kWh/kg agua	Sander & Murthy (2010)
$ECR_{AD}$	1,140	kWh/kg biogás	Morken <i>et al.</i> (2013)
$ECR_{STR}$	1,386	kWh/kg metanol	Posada <i>et al.</i> (2011)
$ECR_{BR1}$	0,985	kWh/kg glicerol	Posada <i>et al.</i> (2011)
$ECR_{RC1}$	0,716	kWh/kg biopolímero	Posada <i>et al.</i> (2011)
$ECR_{CN1}$	13,548	kWh/kg biopolímero	Posada <i>et al.</i> (2011)
$ECR_{SD2}$	1,144	kWh/kg agua	Posada <i>et al.</i> (2011)

$ECR_{HOM}$	2,842	kWh/kg biopolímero	Posada <i>et al.</i> (2011)
$ECR_{CN2}$	4,748	kWh/kg biopolímero	Posada <i>et al.</i> (2011)
$ECR_{CN3}$	7,140	kWh/kg biopolímero	Posada <i>et al.</i> (2011)
$ECR_{RC2}$	1,480	kWh/kg biopolímero	Posada <i>et al.</i> (2011)

### 6.3.3. Restricciones enteras y mixto-enteras

Las potenciales unidades propuestas en la superestructura de la Figura 6.4 se encuentran asociadas a variables binarias. Se introducen dos variables binarias,  $y_1$  e  $y_2$ , para la selección de la tecnología de cultivo correspondiente a OP y TPBR, respectivamente. La ecuación (6.4) garantiza que solo una de las dos tecnologías propuestas para el cultivo de las microalgas pueda ser seleccionada:

$$\sum_{i=1}^2 y_i = 1 \quad (6.4)$$

El glicerol producido en TRANS, luego de su purificación, puede ser alimentado al digestor anaeróbico para mejorar el rendimiento hacia metano (gryp1), utilizarlo como fuente de carbono para la producción de PHA (glip2) y/o venderse como producto final (glip3). Para el caso que el PHA se produzca como un coproducto de alto valor agregado ( $y_3=1$ ), el método de extracción estará asociado a  $y_4$  (extracción con surfactante y quelato) e  $y_5$  (extracción con solvente). Como se detalla a continuación, las ecuaciones (6.5) y (6.6) aseguran la selección de un único método de extracción si  $y_3$  es igual a 1. Por otra parte, si  $y_3$  es 0 (no existe producción de biopolímero), las ecuaciones (6.7) y (6.8) garantizan que no se utilice ninguna tecnología de extracción de PHA.

$$y_3 \leq y_4 + y_5 \quad (6.5)$$

$$y_3 + y_4 + y_5 \leq 2 \quad (6.6)$$

$$y_4 \leq y_3 \quad (6.7)$$

$$y_5 \leq y_3 \quad (6.8)$$

Análogamente a lo descrito en el capítulo anterior, se formulan restricciones “Big M” (Grossmann & Ruiz, 2012) asociadas a los balances de masa de las potenciales unidades presentes en la superestructura.

#### 6.3.4. Restricciones económicas y de diseño

El detalle del diseño de los equipos involucrados en la superestructura y sus respectivas ecuaciones de costos empleadas en la evaluación tecnoeconómica se muestra a continuación.

Los decantadores, separadores, homogeneizadores y columnas de despojo se consideran recipientes para el diseño de equipos. El mismo se realiza considerando un 40 % de sobredimensionamiento. Basado en el diseño de equipos propuesto por Ulrich & Vasudevan (2004), se utiliza la ecuación (6.9) para determinar el diámetro de los siguientes equipos: DC1-6, TAC, DRY, HR, WC, SPL, STR, DIS, SD, CN1-3 y HOM.

$$D_{\vartheta}^2 = \frac{4 \cdot f_{\vartheta}^k}{\pi \cdot u_{sg}^{f_{\vartheta}^k} \cdot \rho_g^{f_{\vartheta}^k} \cdot 86400} \quad (6.9)$$

donde:

$D_{\vartheta}$ : Diámetro del equipo  $\vartheta$  (m)

$f_{\vartheta}^k$ : Flujo total (considerado vapor) proveniente de la corriente  $k$  hacia el equipo  $\vartheta$  (kg/día)

$u_{sg}^{f_{\vartheta}^k}$ : Velocidad del flujo de vapor  $f_{\vartheta}^k$  basado en la sección transversal total del equipo  $\vartheta$  (m/s)

$\rho_g^{f_{\vartheta}^k}$ : Densidad del gas correspondiente a la corriente  $f_{\vartheta}^k$  (kg/m<sup>3</sup>)

La velocidad del caudal de vapor ( $u_{sg}^{f_{\vartheta}^k}$ ) se puede expresar mediante la ecuación de Souders-Brown como se muestra a continuación (Fabian *et al.*, 1993):

$$u_{sg}^{f_g^k} = K_{SB} \left( \frac{\rho_l^{f_g^k} - \rho_g^{f_g^k}}{\rho_g^{f_g^k}} \right)^{0,5} \quad (6.10)$$

donde:

$K_{SB}$ : Constante de Souders-Brown, la cual toma un valor de 0,1 (m/s)

$\rho_l^{f_g^k}$ : Densidad del líquido de la corriente  $f_g^k$  (kg/m<sup>3</sup>)

$\rho_g^{f_g^k}$ : Densidad de la fase gaseosa de la corriente  $f_g^k$  (kg/m<sup>3</sup>)

El costo de compra de los mencionados equipos ( $C_{\vartheta,1}$ ) viene dado por la siguiente ecuación:

$$C_{\vartheta,1} = f_t^{\vartheta} \cdot f_p^{\vartheta} \cdot \frac{I_{CE1}}{182,1} (C_{\vartheta,shell} + C_{\vartheta,acces}) \quad (6.11)$$

donde:

$C_{\vartheta,1}$ : Costo de compra de los equipos en el año de interés (\$)

$f_t^{\vartheta}$ : Factor de tanque que corresponde a 1,1 para separadores, homogeneizadores y decantadores, y 1,15 para columnas (Chauvel, 1981).

$f_p^{\vartheta}$ : Factor de corrección por presión que corresponde a un valor de 1 si el equipo no se diseña para operar en condiciones elevadas de presión y temperatura.

$C_{\vartheta,shell}$ : Costo de la carcasa (\$)

$C_{\vartheta,acces}$ : Costo de los accesorios (\$)

Los costos de la carcasa y los accesorios se calculan mediante las ecuaciones (6.12) y (6.13).

$$C_{\vartheta,shell} = (98,04 - 95,99 \cdot D_{\vartheta}^{0,00436}) \cdot f_m^{\vartheta} \cdot f_e^{\vartheta} \cdot m_{mat}^{\vartheta} \quad (6.12)$$

$$C_{\vartheta,acces} = 1861,42 + 199,90 \cdot (m_{mat}^{\vartheta})^{0,42652} \quad (6.13)$$

donde:

$f_m^\vartheta$ : Factor de corrección por material (se considera un valor de 4 para todos los equipos según Ulrich & Vasudevan (2004))

$f_e^\vartheta$ : Factor de corrección por espesor del material (se considera un valor de 1,2 para todos los equipos según Ulrich & Vasudevan (2004))

$m_{mat}^\vartheta$ : Masa de material utilizado para la construcción de cada equipo (kg)

Considerando que los equipos se construyen con acero al carbono, la masa de material necesaria para su construcción se calcula a partir de la ecuación (6.14).

$$m_{mat}^\vartheta = \rho_{csteel} \cdot V_{mat}^\vartheta \quad (6.14)$$

donde:

$\rho_{csteel}$ : Densidad del acero al carbón (8750) (kg/m<sup>3</sup>)

$V_{mat}^\vartheta$ : Volumen del material (m<sup>3</sup>)

Teniendo en cuenta un espesor de material de 8 mm, el volumen del material ( $V_{mat}^\vartheta$ ) se calcula como:

$$V_{mat}^\vartheta = \pi \cdot \left( D_\vartheta \cdot L_\vartheta + \frac{D_\vartheta^2}{2} \right) \cdot 0,008 \quad (6.15)$$

Donde  $L_\vartheta$ , correspondiente a la altura del equipo, en m, viene dada en función del diámetro y un parámetro relativo a cada equipo ( $HD_\vartheta$ ) como se muestra a continuación:

$$L_\vartheta = D_\vartheta \cdot HD_\vartheta \quad (6.16)$$

El costo de compra del reactor de transesterificación (TRANS) y el reactor de neutralización utilizado en el sector de purificación de glicerol (NEUTR) se calculan utilizando correlaciones de Ulrich & Vasudevan (2004) como función de los volúmenes de los equipos como muestran las ecuaciones (6.17) y (6.18).



$$V_{\vartheta} = \pi \cdot L_{\vartheta} \cdot \left(\frac{D_{\vartheta}}{2}\right)^2 \tag{6.17}$$

$$C_{\vartheta,1} = \frac{I_{CE1}}{400} \cdot f_m^{\vartheta} \cdot 10^{[3,6+0,17 \log(V_{\vartheta})+0,083 \log^2(V_{\vartheta})]} \tag{6.18}$$

El costo de los reactores y biorreactores ( $C_{\vartheta,1}$ ) involucrados en el proceso de producción de PHA (BR1, BR2, RC1, RC2) se calculan utilizando correlaciones propuestas por Peters y Timmerhaus (1991).

$$C_{\vartheta,1} = \frac{M\&S}{280} \cdot 101,9 \cdot \left(\frac{D_{\vartheta}}{0,3048}\right)^{1,066} \cdot \left(\frac{L_{\vartheta}}{0,3048}\right)^{0,802} \cdot (2,18 + f_m^{\vartheta} \cdot f_p^{\vartheta}) \tag{6.19}$$

donde  $M\&S$  es el índice de Marshall y Swift.

A continuación, se presenta la Tabla 6.2, donde se exponen algunos de los parámetros asociados al costo de los equipos mediante las ecuaciones (6.9) a (6.19).

**Tabla 6.2.** Principales parámetros utilizados para el cálculo de costos de los equipos.

Equipo ( $\vartheta$ )	$\rho_l^{f_{\vartheta}^k}$	$\rho_g^{f_{\vartheta}^k}$	$f_p^{\vartheta}$	$HD_{\vartheta}$
DRY	1000	0,5797	1	2
TRANS	880	0,5797	-	1,5
DC1	1000	0,5797	1	3
DC2	880	0,5797	1	3
WC	1000	0,5797	1,4	30
STR	791,84	1,199	1,6	30
DIS	791,84	1,199	1,6	5
NEUTR	1000	0,5797	-	1,5
DC4	1000	0,5797	1,6	3

Los costos de capital para el extractor de lípidos (LE), el fotobiorreactor tubular (TPBR), la pileta abierta (OP), el digestor anaeróbico (AD), la unidad de ciclo

combinado de calor y potencia (CHP) se calculan mediante la regla de los seis décimos como se muestra a continuación:

$$C_{\vartheta,1} = \frac{I_{CE1}}{I_{CE2}} C_{\vartheta,2} \left( \frac{Q_{\vartheta,1}}{Q_{\vartheta,2}} \right)^{\gamma} \quad (6.20)$$

donde:

$C_{\vartheta,1}$ : Costo del equipo instalado en el año actual del proyecto (\$)

$C_{\vartheta,2}$ : Costo del equipo instalado en el año de referencia (\$)

$I_{CE1}$ : Índice de costo de plantas en el año actual

$I_{CE2}$ : Índice de costo de plantas en el año de referencia

$Q_{\vartheta,1}$ : Capacidad asociada al equipo que se quiere instalar

$Q_{\vartheta,2}$ : Capacidad asociada al equipo de referencia

$\gamma$ : Factor de escalado (en promedio toma valores de 0,6)

En la Tabla 6.3 se exponen algunos de los parámetros utilizados para el cálculo del costo de los equipos a partir de la ecuación (6.20).

**Tabla 6.3.** Principales parámetros utilizados para el cálculo de costos de equipamiento a partir de la regla de los seis décimos.

Equipo ( $\vartheta$ )	$C_{\vartheta,2}$ (MM\$)	$Q_{\vartheta,2}$ (t/día)	$I_{CE2}$	$\gamma$	Referencia
TPBR	1,44	16,4	521,9	0,6	Gebreslassie <i>et al.</i> (2013)
OP	0,0276	5,182	521,9	0,6	Gebreslassie <i>et al.</i> (2013)
LE	2,43	23225,8	539,1	0,6	Gebreslassie <i>et al.</i> (2013)
AD	0,034	17	539,1	0,6	Gebreslassie <i>et al.</i> (2013)
CHP	0,55	968	525,4	0,65	Diaz <i>et al.</i> (2009)

### 6.3.5. Restricciones de desigualdad

En la Tabla 6.4 se presentan las restricciones de desigualdad del proceso. Por un lado, con el objetivo de asegurar una reducción de las emisiones globales de CO<sub>2</sub>, se fija que la producción de dióxido de carbono sea menor que el caudal de CO<sub>2</sub> necesario para la generación de la biomasa algal en el sector de cultivo. La cota superior para la corriente de entrada de dióxido de carbono (fgss) viene dada por la capacidad producida de este compuesto en una termoeléctrica de tamaño mediana. Asimismo, se establece una cota superior para la corriente con desperdicios de papel (wps) que se alimenta al digestor anaeróbico. Esta se asume como el total del papel reciclado en una ciudad con 400.000 habitantes (como es el caso de Bahía Blanca). El máximo establecido para la corriente de lodos (slds) se establece teniendo en cuenta la capacidad de abastecimiento de una planta de tratamiento de aguas residuales. En este sentido, no se asumen costos para estas corrientes de entrada al digestor anaeróbico (wps y slds). Finalmente, como se describe previamente, para asegurar una operación óptima del AD, la relación C/N se fija entre 20/1 y 25/1 (Yen & Brune, 2007).

**Tabla 6.4.** Principales restricciones de desigualdad del modelo.

Variable	Cota superior
CO <sub>2</sub> producido - CO <sub>2</sub> requerido por el cultivo algal	0,01 t/año
CO <sub>2</sub> alimentado al cultivo algal desde termoeléctrica	1,46 MMt/año
Desechos de papel alimentado al AD	18.700 t/año
Lodos alimentados al AD	12.700 t/año
-C/N (relación operativa del AD)	-20
C/N (relación operativa del AD)	25

Asimismo, se plantean distintos escenarios de optimización mediante la asignación de distintos valores a la cota superior de la corriente de glicerol comprado (glip4). En este sentido, se propone en primer lugar un valor de cota igual a 0 con el objetivo de evaluar la situación donde la producción de PHA

quede establecida únicamente en función del glicerol generado por la planta de biodiesel microalgal (escenario 1). En segundo lugar, se establece un valor de 52.900 t/año, el cual corresponde, junto con el glicerol generado en la planta de biodiesel, a la materia prima necesaria para la producción de una planta de producción de PHA de 10.000 t/año (escenario 2). Finalmente, se presenta una tercera opción proponiendo una cota superior para el glicerol comprado de 87.800 t/año. En este último caso, el caudal de biopolímero producido podría alcanzar un valor de 16.000 t/año (escenario 3).

### 6.3.6. Función objetivo

El valor presente neto del proyecto ( $VPN$ ) se utiliza como función objetivo a maximizar en el análisis económico.

$$VPN = -Inv + a(Rev - C_{manuf} - C_{rawmat} - C_{utilit}) \quad (6.21)$$

donde  $VPN$  corresponde al valor presente neto en \$ y representa el rendimiento económico de la biorrefinería integrada basada en microalgas.  $Inv$  es el costo total de inversión que es igual a la suma del capital fijo ( $F_{capital}$ ) y el capital de trabajo ( $W_{capital}$ ) como se muestra a continuación:

$$I = F_{capital} + W_{capital} \quad (6.22)$$

El capital fijo ( $F_{capital}$ ) es el costo actualizado de los equipos ( $C_{equipment}$ ) considerando un factor de contingencia ( $\alpha=0,18$ ) y un factor de cimientos ( $\beta=1,3$ ) si la biorrefinería es una planta totalmente nueva. El capital de trabajo se asume como un 15 % del capital fijo según la recomendación de Ulrich & Vasudevan (2004).

$$F_{capital} = C_{equipment} \cdot (\alpha + \beta) \quad (6.23)$$

$a$  es la anualidad y es calculada para una vida del proyecto ( $n$ ) de 15 años y 10 % de la tasa de interés  $i$ .

$$a = \left[ \frac{i \cdot (1 + i)^n}{(1 + i)^n - 1} \right] \quad (6.24)$$

$Rev$  representa la ganancia por venta de los productos y coproductos en \$/año. La ecuación de ganancia se puede escribir de la siguiente manera:

$$Rev = 365 \cdot \sum_p pr_p \cdot m_p + 365 \cdot INC_{prod} \cdot m_{bd} \quad (6.25)$$

$$\forall p \in \{bd, pha, glic, fer\}$$

Donde  $pr_p$  es el precio de venta en \$/kg,  $m_p$  es la producción diaria de cada producto o subproducto en kg/día,  $INC_{prod}$  corresponde a los incentivos recibidos por producir biodiesel en \$/kg biodiesel y  $m_{bd}$  es la cantidad de biodiesel producido por día.

El costo de manufactura ( $C_{manuf}$ ) en \$/año viene dado por la suma de diferentes gastos de operación como el trabajo de operación y supervisión ( $O_{labor}$  y  $S_{labor}$  respectivamente), mantenimiento y reparación ( $M_{repairs}$ ), suministros de operación ( $O_{supplies}$ ), cargos de laboratorio ( $L_{charges}$ ), gastos de sobrecargo en la planta ( $P_{overhead}$ ), impuestos locales ( $L_{taxes}$ ) y seguros ( $Ins$ ).

$$C_{manuf} = O_{labor} + S_{labor} + M_{repairs} + O_{supplies} + L_{charges} + P_{overhead} + L_{taxes} + Ins \quad (6.26)$$

El trabajo de operación se relaciona con la atención que se requiere por un operario para manejar un equipo,  $O_{requirements}$  de Ulrich & Vasudevan (2004). Si se considera que un slot de operación ( $O_{slot}$ ) requiere 5 personas y el salario de un operario se puede estimar a partir de la consideración que el salario incrementa a una velocidad de  $\delta=0,03$  por año, el trabajo de operación ( $O_{labor}$ ) puede ser calculado como:

$$O_{labor} = O_{requirements} \cdot O_{slot} \cdot salary \cdot (1 + \delta)^{(\omega-2003)} \quad (6.27)$$

donde  $\omega$  es el año actual.

$S_{labor}$ ,  $M_{repairs}$ ,  $O_{supplies}$ ,  $L_{charges}$ ,  $P_{overhead}$ ,  $L_{taxes}$  e  $Ins$  se calculan mediante las ecuaciones (6.28) a (6.34) con  $X_{sup}$ ,  $X_{oper}$  y  $X_{lab}$  iguales a 0,1,  $X_{main}=0,02$ ,  $X_{over}=0,5$  y  $X_{tax}$  y  $X_{ins}$  igual a 0,01.

$$S_{labor} = X_{sup} \cdot O_{labor} \quad (6.28)$$

$$M_{repairs} = X_{main} \cdot F_{capital} \quad (6.29)$$

$$O_{supplies} = X_{oper} \cdot M_{repairs} \quad (6.30)$$

$$L_{charges} = X_{lab} \cdot O_{labor} \quad (6.31)$$

$$P_{overhead} = X_{over} \cdot (O_{labor} + S_{labor} + M_{repairs}) \quad (6.32)$$

$$L_{taxes} = X_{tax} \cdot F_{capital} \quad (6.33)$$

$$Ins = X_{ins} \cdot F_{capital} \quad (6.34)$$

$C_{rawmat}$  representa el costo de las materias primas en \$/año y se calcula como:

$$C_{rawmat} = 365 \sum_j pr_j \cdot m_j \quad (6.35)$$

$$\forall j \in \{met, hex, nit, pot, smo, hcl, srf, che, des\}$$

donde  $pr_j$  es el costo de compra en \$/kg,  $m_j$  es el requerimiento diario de la materia prima en kg/día.

Finalmente, en la ecuación (6.36),  $C_{utilit}$  es el costo asociado a los servicios, en donde se incluye el agua y la energía (térmica y eléctrica).

$$C_{utilit} = 365 \cdot [(HE_{cons} - HE_{prod}) \cdot pr_{HE} + (EE_{cons} - EE_{prod}) \cdot pr_{EE} + Wt_{cons} \cdot pr_{wt}] \quad (6.36)$$

donde:

$HE_{cons}$ : Consumo de energía térmica (kWh/día)

$HE_{prod}$ : Producción de energía térmica (kWh/día)

$pr_{HE}$ : Precio de la energía térmica (\$/kWh)

$EE_{cons}$ : Consumo de energía eléctrica (kWh/día)

$EE_{prod}$ : Producción de energía eléctrica (kWh/día)

$pr_{EE}$ : Precio de la energía eléctrica (\$/kWh)

$Wt_{cons}$ : Consumo de agua en la biorrefinería integrada (kg/día)

$pr_{wt}$ : Precio del agua requerida (\$/kg)

Con el objetivo de analizar el impacto que provoca la inclusión de coproductos de alto valor agregado en la biorrefinería integrada en base microalgal, se propone calcular el costo de producción de biodiesel relativo a las ganancias por los coproductos ( $C_{prod_{rev\_coprod}}$ ) como se muestra a continuación (y se hará referencia de aquí en adelante como costo de producción de biodiesel).

$$C_{prod_{rev\_coprod}} = (C_{manuf} + C_{rawmat} + C_{utilit} + C_{capital} - Rev_{coprod}) / (365 \cdot m_{bd}) \quad (6.37)$$

Donde la variable  $Rev_{coprod}$  incluye las ganancias por los coproductos (glicerol, PHA y fertilizantes) en \$/año, como así también los ingresos por los incentivos de producir biodiesel según corresponda.  $C_{capital}$ , por su parte, es el costo de capital anualizado en \$/año, el cual se calcula como el producto de costo total de inversión de la planta ( $Inv$ ) y la anualidad ( $a$ ) como se muestra en la ecuación (6.38).

$$C_{capital} = Inv \cdot a \quad (6.38)$$

Los precios y costos asociados a las distintas corrientes de la biorrefinería integrada se presentan a continuación en la Tabla 6.5.

**Tabla 6.5.** Precios y costos empleados en la superestructura propuesta.

Items	Valores	Referencias
<i>Materias primas</i>		
Hexano (\$/kg)	0,41	Martin & Grossmann (2014)
Nutrientes (\$/kg)	0,367	Martin & Grossmann (2014)
Metanol (\$/kg)	0,286	Gebreslassie <i>et al.</i> (2013)
Metóxido de sodio (\$/kg)	0,98	Gebreslassie <i>et al.</i> (2013)
Ácido clorhídrico (\$/kg)	0,208	Alibaba.com
Dietilsuccinato (\$/kg)	3	Alibaba.com

Surfactante (\$/kg)	1	Alibaba.com
Quelato (\$/kg)	1	Alibaba.com
<i>Servicios</i>		
Energía eléctrica (\$/kWh)	0,00722	Eia.gov
Energía térmica (\$/kWh)	0,015841	Eia.gov
Agua (\$/kg)	0,000007	Gebreslassie <i>et al.</i> (2013)
Biodiesel (\$/kg)	0,98	Energy.gov
Glicerol (\$/kg)	0,2574	Gebreslassie <i>et al.</i> (2013)
Fertilizantes (\$/kg)	1,115	Alibaba.com
PHA (\$/kg)	6,25	Posada <i>et al.</i> (2011)
<i>Otros</i>		
Terreno (\$/m <sup>2</sup> )	0,3	Gong & You (2015)
Incentivos (\$/kg)	0,3	Thinkkentucky.com

### 6.3.7. Análisis de sensibilidad

Se lleva a cabo un análisis de sensibilidad con el objetivo de evaluar el impacto que tiene la incertidumbre de ciertos parámetros sobre la función objetivo. Para lo cual, basándose en el VPN de la configuración óptima, se modifican en un porcentaje no mayor al 10 % ciertos valores de parámetros de interés y se verifica en qué porcentaje esto afecta al valor de la función objetivo.

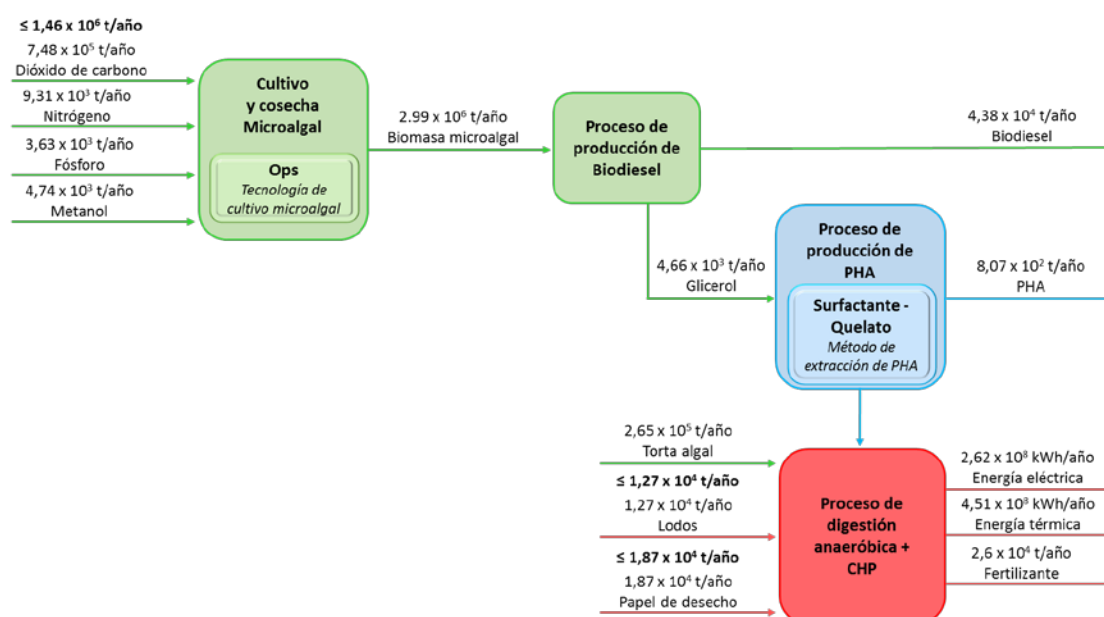
### 6.4. Resultados y discusión

El modelo MINLP propuesto para la producción de 43.800 t/año de biodiesel se formula e implementa en GAMS 24.2.3 (McCarl *et al.*, 2017). Los estudios computacionales se realizan en una computadora con procesador Intel® Core™ i7-3770K, CPU 3,50 GHz y 8 Gb de RAM. El modelo matemático formulado incluye 3.149 variables continuas, 5 variables discretas, 2.552 restricciones y se resuelve utilizando BARON (Sahinidis, 2014).

Los resultados obtenidos expresan que la configuración óptima que maximiza la función objetivo económica (VPN) incluye a la planta de producción de PHAs



en el marco de una biorrefinería integrada con la planta de biodiesel. Por su parte, se selecciona la utilización de piletas abiertas (OPs) para desarrollar el cultivo microalgal ( $y_1=1$ ). Con respecto al método de extracción y purificación del polímero biosintetizado, se elige la opción que involucra al surfactante-quelato ( $y_4=1$ ). A continuación, se muestran los resultados óptimos de las principales corrientes del proceso esquematizado por la Figura 6.5 para el escenario 1, donde se establece un valor de 0 para la cota de la variable que involucra la compra de glicerol adicional.



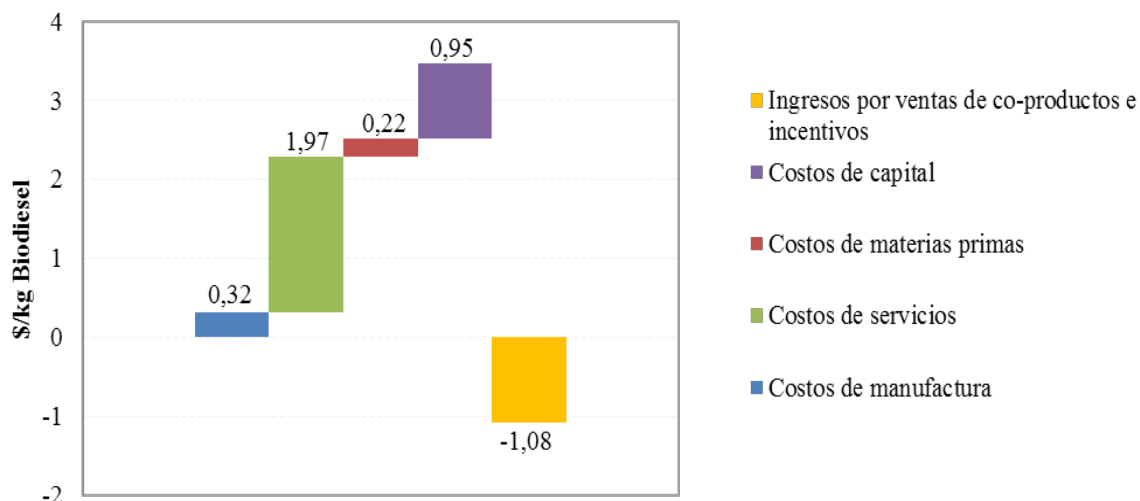
**Figura 6.5.** Resultados de la optimización de la biorrefinería integrada (escenario 1).

Como puede observarse, la producción de 43.800 t/año de biodiesel a partir de microalgas tiene asociado la generación de 265.000 t/año de torta algal y 4.660 t/año de glicerol como subproducto, este último, permite la posibilidad de producir 807 toneladas anuales de biopolímero.

Por su parte, la torta algal junto con la corriente de biomasa residual retirada del proceso productivo de PHA se alimentan al sector de digestión anaeróbica (operando con C/N=21,8) para la producción de energía y fertilizantes. Para ello, las variables de ingreso de las corrientes de lodos y papel de desecho toman el máximo valor contemplado a partir de las cotas propuestas; y junto con la torta algal y el material celular residual permiten la generación de  $2,62 \cdot 10^8$  kWh/año y  $4,51 \cdot 10^8$  kWh/año de energía eléctrica y térmica, respectivamente. En este aspecto, mediante los resultados obtenidos se

evidencia la idea planteada previamente por diversos autores (El-Halwagi, 2017b; Ubando *et al.*, 2016; Abdelaziz *et al.*, 2015; Santibañez-Aguilar *et al.*, 2014) la cual involucra lograr una reducción energética a partir del provecho de diversas corrientes disponibles. Del mismo modo, la presencia de una etapa de digestión anaeróbica y un ciclo combinado de calor y potencia implica una contribución positiva en vistas de presentar a las biorrefinerías integradas como alternativas sustentables. En este caso, el empleo de las corrientes residuales del proceso (oc y crms) junto con otras provenientes de inmediaciones (slds y wps) permite, además de la cogeneración energética, la obtención de 2.600 t/año de material fertilizante generando así un rendimiento económico mayor.

En otro orden de ideas, se puede destacar que si bien el modelo admite la posibilidad de utilizar el glicerol producido como corriente de alimentación al digestor anaeróbico (Zhang *et al.*, 2015) o incluso venderlo como producto final (Burniol-Figols *et al.*, 2018); la totalidad de este subproducto es destinado a la biosíntesis de PHAs en concordancia con la propuesta de diversos autores (Zhang *et al.*, 2018; Kumar *et al.*, 2018; Coutinho de Paula *et al.*, 2017; Luo *et al.*, 2016; García Prieto *et al.*, 2014). Sin embargo, a pesar de la incorporación de una planta de PHAs al esquema de biorrefinería integrada para la producción de biodiesel microalgal y cogeneración de energía, el valor presente neto de este escenario 1 resulta negativo ( $VPN_{\text{ESCENARIO 1}} = -462,09 \text{ MM\$}$ ). El costo de producción asociado a este escenario, que se calcula a partir de la ecuación (6.37), es de 2,39 \$/kg biodiesel. En la Figura 6.6 se muestra la distribución de los costos de producción para la optimización del primer escenario, en donde los ingresos por venta de coproductos vienen dados por las ganancias a partir de la venta de PHA y fertilizantes, como así también debido a los incentivos por la producción de biodiesel (0,3 \$/kg biodiesel).



**Figura 6.6.** Distribución de costos de producción (escenario 1).

A partir de la Figura 6.6, puede resaltarse que una de las mayores contribuciones al costo de producción se encuentra asociada al costo de los servicios ( $C_{utilit}$ ). Por lo tanto, en la Tabla 6.6 se muestra una distribución del consumo energético anual por parte de la biorrefinería integrada. Aquí, puede identificarse que el principal consumo energético que tiene la planta se ubica en el sector de producción de biodiesel, requiriendo más del 95 % de la energía total. A su vez, dentro de este sector productivo, puede señalarse que la etapa de cosecha y secado de la biomasa algal demanda el mayor porcentaje (aproximadamente 74 %). Esto último, resulta en concordancia con lo reportado por numerosos autores (Gebreslassie *et al.*, 2013; Martín & Grossmann, 2012; Severson *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2008), quienes concluyen que el cultivo de microalgas en piletas abiertas induce a un mayor consumo energético en la posterior etapa de secado.

**Tabla 6.6.** Distribución del consumo energético anual.

Sector	KWh	Porcentaje
Proceso de Producción de Biodiesel	$3,79 \cdot 10^9$	95,08 %
<i>Cultivo microalgal</i>	$7,78 \cdot 10^8$	19,46 %
<i>Cosecha y Secado</i>	$2,95 \cdot 10^9$	73,99 %
<i>Extracción de Lípidos</i>	$3,14 \cdot 10^7$	0,79 %
<i>Transesterificación</i>	$1,31 \cdot 10^7$	0,33 %
<i>Purificación glicerol y recuperación metanol</i>	$9,69 \cdot 10^6$	0,25 %
Proceso de Digestión Anaeróbica	$1,78 \cdot 10^8$	4,47 %
Proceso de Producción de PHA	$1,80 \cdot 10^7$	0,45 %

De manera similar, en la Tabla 6.7 se presenta la distribución de costos de capital ( $C_{capital}$ ), que, conjuntamente con el costo de los servicios ( $C_{utilit}$ ) representan los mayores aportes al costo de producción de biodiesel. Martín & Grossmann (2014a) reportan una conclusión semejante en su trabajo de optimización de una biorrefinería para la producción de biocombustibles (biodiesel y bioetanol mediante fermentación de glicerol). En este caso, el mayor porcentaje asociado al costo de capital necesario para la instalación de la planta viene dado por la etapa de cultivo de las microalgas (199,09 MM\$), relegando a un segundo lugar, pero igualmente con un importante aporte, al sector de cosecha y secado de la biomasa algal (55,37 MM\$). En este punto, resulta importante destacar que, en vistas de aspirar a lograr mejoras económicas en el proceso de producción de biodiesel en base a microalgas, es necesario focalizar los esfuerzos en las secciones destinadas a la acumulación de biomasa y secado de la misma como también sugieren Rizwan *et al.* (2015a).

**Tabla 6.7.** Distribución del costo de capital.

Sector	MM\$	Porcentaje
Proceso de Producción de Biodiesel	261,36	82,42 %
Cultivo microalgal	199,09	62,61 %
Cosecha y Secado	55,37	17,41 %
Extracción de Lípidos	0,72	0,23 %
Transesterificación	2,79	0,88 %
Purificación glicerol y recuperación metanol	3,44	1,08 %
Proceso de Digestión Anaeróbica	54,68	17,24 %
Proceso de Producción de PHA	0,81	0,34 %

Con el objetivo de contextualizar este resultado obtenido luego de la optimización, se buscan trabajos en la literatura que incluyan la producción de biodiesel a partir microalgas. En este sentido, se pueden encontrar numerosos trabajos presentados por los profesores Mariano Martín e Ignacio Grossmann, quienes recurren a la optimización de procesos integrados para analizar económicamente la rentabilidad de la producción de biocombustibles a partir de microalgas. Basados en un proceso presentado con anterioridad (Martin & Grossmann, 2012), donde consideran integración de agua y energía (Martin &

Grossmann, 2011), los mencionados autores evalúan la producción de biodiesel y bioetanol microalgal integrada con el uso de glicerol para producir etanol vía fermentación (Martín & Grossmann, 2014a) y lo comparan con la posibilidad de emplear el glicerol para venta (Martín & Grossmann, 2013a), producción de metanol (Martín & Grossmann, 2013b) o éteres (Martín & Grossmann, 2014b). Un aspecto destacable de los trabajos enumerados son los costos de producción asociados a los diferentes procesos, ya que en ninguno de los casos se superan los 0,5 \$/kg biocombustible, costo notablemente menor a 2,39 \$/kg biodiesel que surge como resultado de la optimización del escenario 1. Una posible explicación para esto podría surgir de las capacidades de las plantas propuestas (220.000 a 320.000 t/año). Estos grandes volúmenes de biocombustibles resultan beneficiosos al momento de realizar cualquier análisis económico debido al concepto de economía de escala. Asimismo, la tecnología en base a membranas empleada por estos autores, la cual integra la cosecha y el secado del alga (Martín & Grossmann, 2012), requiere mínimos consumos energéticos (2,75 kWh/kg biodiesel frente a los 85,20 kWh/kg biodiesel necesarios en el proceso presentado en este capítulo). A pesar de ello, en el modelo presentado en este capítulo se opta por presentar tecnologías que se encuentren comercialmente disponibles en la actualidad.

Dentro de los aportes realizados por el grupo de trabajo del profesor Rafiqul Gani, se pueden mencionar trabajos de optimización a partir de modelos MINLP para hallar la ruta de procesamiento óptima para la producción de biodiesel en base microalgal (Rizwan *et al.*, 2013), donde también se puede incluir incertidumbre en ciertos aspectos tecnoeconómicos (Rizwan *et al.*, 2015b). Dichos autores, adhieren a la importancia de incorporar el concepto de biorrefinería integrada mediante la consideración de producir otros coproductos conjuntamente con el biodiesel (Rizwan *et al.*, 2015a). Cabe señalar que en ninguna de las publicaciones realizadas por estos autores se pudo alcanzar una rentabilidad económica para la producción de biodiesel. Esto último, se encuentra en concordancia con lo obtenido a partir del escenario 1 mediante un valor de VPN negativo. Según Rizwan *et al.* (2015a), luego de realizar un análisis de sensibilidad, concluyen que para alcanzar rentabilidad en este tipo

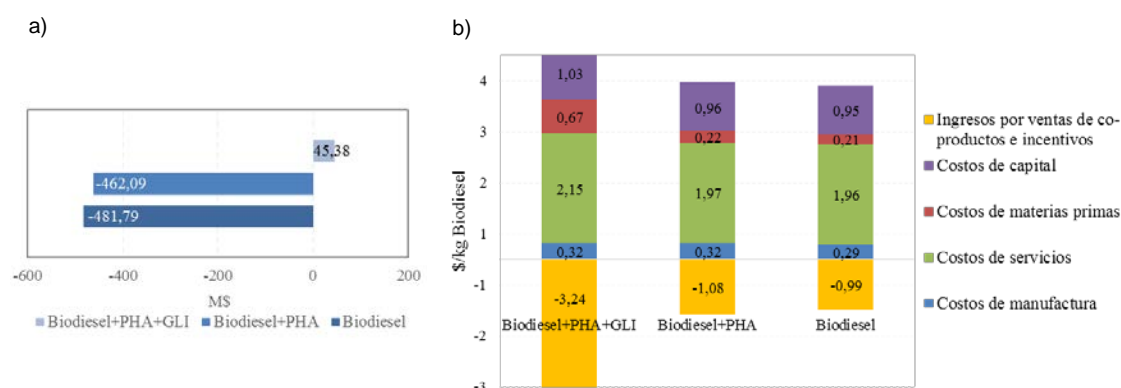
de biorrefinerías se necesitan diversas mejoras tecnológicas y de mercado como el reciclaje de nutrientes, mayor conversión de residuos, disponibilidad de CO<sub>2</sub>, reducción de requerimientos energéticos, entre otros.

Por otra parte, se pudieron encontrar antecedentes de trabajos de optimización en plantas de producción de biodiesel microalgal donde el beneficio económico resulte atractivo (Gong & You, 2015; Gong & You, 2014a; Gong & You, 2014b; Gebreslassie *et al.*, 2013). No obstante, muchos de estos trabajos tienen como objetivo, además de analizar el aspecto medioambiental, presentar un algoritmo de optimización heurístico para la resolución de problemas multiobjetivo, para lo cual se establecen precios de venta del biodiesel elevados (3,23 \$/kg biodiesel), hasta tres veces superiores respecto de los que existen en el mercado actualmente (alrededor de 1 \$/kg).

En este sentido, se plantean los modelos que involucran los escenarios 2 y 3. En el escenario 2 se propone definir como cota superior de la corriente de glicerol alimentado (glip4) un valor de 52.900 t/año, lo que permite establecer un volumen de producción de biopolímero de 10.000 toneladas anuales. Sin embargo, no se obtuvieron resultados favorables en términos de rentabilidad económica para este escenario planteado. En consecuencia, considerando que ciertas empresas a nivel mundial poseen capacidades de hasta 50.000 t/año de biopolímeros (Koller *et al.*, 2017), en el escenario 3, se le asigna un valor máximo para la corriente glyp4 de 87.800 t/año, equivalente a producir 16.000 toneladas anuales de PHAs. De acuerdo con esta última implementación de la biorrefinería integrada, puede destacarse que la función objetivo toma un valor positivo (VPN=45,38 MM\$) con un costo de producción de biodiesel de 0,93 \$/kg biodiesel. Por otra parte, el caudal de material celular que se envía desde el sector de producción de PHA al de digestión anaeróbica incrementa desde 1.870 t/año (escenario 1) a 30.200 t/año (23.215 t/año en base seca). Esto se debe a que en el sector de biosíntesis se alcanzan mayores concentraciones de microorganismos para conseguir la producción de 16.000 t/año de material polimérico. Una vez extraído el PHA de su citoplasma, mediante centrifugación (CN1) se recicla toda la biomasa residual la cual se dispone para cogeneración de energía. Para esto último, se considera lo propuesto por Moncada *et al.* (2013), quienes reportan que la biomasa celular puede llegar a producir 5,17

MJ/kg biomasa celular seca de energía térmica, lo que resulta en una contribución medianamente significativa (aproximadamente  $33.10^6$  kWh/año) frente a la suma generada por el resto de las corrientes de desecho ( $451.10^6$  kWh/año).

A continuación, se presentan los valores de la función objetivo (VPN) de dos de los casos expuestos (Escenario 1 y Escenario 3, renombrados Biodiesel+PHA y Biodiesel+PHA+GLI, respectivamente) (Figura 6.7 (a)) junto con la distribución de los costos de producción (Figura 6.7 (b)) comparados con un caso base en el que solo se considera una planta de producción de biodiesel microalgal con venta de glicerol como subproducto (denominado Biodiesel). Como puede observarse, la inclusión de un sector de producción de PHAs genera cierta mejora en la función objetivo respecto al caso donde solo se produce biodiesel, desde un VPN=-481,79 MM\$ (Biodiesel) a VPN=-462,09 MM\$ (Biodiesel+PHA, Escenario 1). Lo mismo se refleja en los costos de producción de biodiesel, los cuales disminuyen desde 2,42 \$/kg biodiesel hasta 2,39 \$/kg biodiesel para el caso correspondiente al Escenario 1. Estos valores podrían tornarse más prometedores para el caso en el que se considere la compra de una corriente de glicerol extra (Escenario 3), donde la función objetivo logra tomar valores positivos (VPN=45,38 MM\$) con costos de producción de biodiesel de 0,93 \$/kg biodiesel.



**Figura 6.7.** Comparación entre los diferentes escenarios presentados.  
 a) Valor presente neto y b) Distribución de costo de producción

Finalmente, se realiza un análisis de sensibilidad para evaluar la influencia que tienen ciertos valores de parámetros sobre la función objetivo propuesta (VPN) (Sabol *et al.*, 2017). De esta manera, se pueden identificar los sectores de la

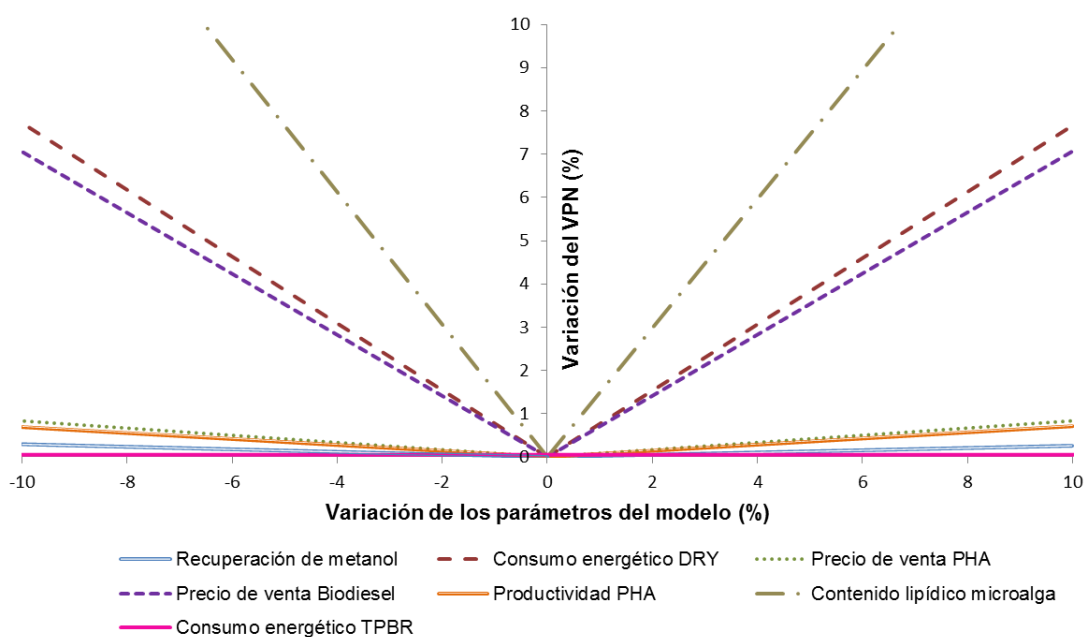
biorrefinería integrada que admitan mejoras en vistas a obtener un mayor beneficio económico. A continuación, se mencionan los parámetros que se tomaron en cuenta en este estudio: porcentaje de recuperación de metanol en el sector de purificación de glicerol; contenido lipídico de las microalgas y consumos energéticos de DRY y TPBR en el sector de cultivo, cosecha y cultivo microalgal; productividad hacia PHA en el sector de biosíntesis del polímero; y precios de venta de biodiesel y PHA.

Como puede observarse en la Figura 6.8, la función objetivo resulta más sensible a cambios en los parámetros asociados al contenido de lípidos de las microalgas seguido por el consumo energético del DRY y el precio de venta del biodiesel. En principio, estos resultados podrían confirmar lo reportado por algunos autores en relación a los aspectos donde deberían enfocarse los esfuerzos, tanto tecnológicos como de mercado, para volver rentable este tipo de procesos. En este sentido, Martín & Grossmann (2013a) mencionan que la principal variable de decisión en su modelo NLP propuesto es la composición del alga empleada, encontrando que la fracción de lípidos tiende a tomar el valor de la cota máxima propuesta (60 % de la biomasa algal seca). Con relación al consumo energético destinado al secado del material microalgal, Rizwan *et al.* (2015a) muestran que la distribución de costos correspondiente a la ruta óptima para la generación de biodiesel obtenido a partir de un modelo MINLP, queda fuertemente determinado por la sección de secado, siendo los principales factores responsables de este hecho, los requerimientos energéticos. Por el lado del precio del biodiesel, ya se mencionaron en este capítulo antecedentes de la influencia que tiene el precio de venta de los biocombustibles en este tipo de análisis (Gebreslassie *et al.*, 2013). En nuestro modelo podríamos observar que si consideráramos el precio propuesto por estos autores (3,23 \$/kg biodiesel), se obtendrían rendimientos económicos mucho mayores a los alcanzados (VPN=234,19 MM\$). De lo anteriormente mencionado, se puede resaltar que, si bien el precio de venta del biodiesel depende fuertemente de las características de mercado y las decisiones políticas de cada uno de los países, técnicamente, las investigaciones podrían focalizarse en lograr mejoras de la eficiencia energética de los procesos de



secado, como así también encontrar cepas de algas con elevados contenidos de lípidos que resulten compatibles con este bioproceso.

Respecto del precio de venta del biopolímero, se puede mencionar que la influencia sobre el VPN es muy similar a la productividad del microorganismo empleado para su biosíntesis, encontrándose levemente por encima de este último. Por otro lado, se puede observar que el VPN sufre las menores variaciones a cambios en el parámetro de recuperación de metanol correspondiente al sector de purificación de glicerol. Por último, este estudio demuestra que variaciones en el parámetro que involucran al consumo energético del TPBR, no producen ningún efecto sobre la función objetivo, atribuyéndose esto último a que el modelo continúa optando la tecnología de OPs para llevar a cabo el crecimiento de las microalgas.



**Figura 6.8.** Análisis de sensibilidad de la biorrefinería integrada.

## 6.5. Conclusiones

En este capítulo se formula un problema MINLP para el diseño óptimo de una biorrefinería a partir de microalgas para la producción integrada de biodiesel y PHAs como un potencial coproducto de alto valor agregado. La superestructura propuesta incluye dos alternativas tecnológicas para el cultivo de microalgas (OPs y TPBR); tres alternativas para el empleo del subproducto del proceso productivo de biodiesel (glicerol para venta, fuente de carbono para biosíntesis

de PHA o sustrato en el proceso de digestión anaeróbica); y dos opciones para la extracción y purificación del biopolímero (extracción por solvente o surfactante y quelato).

Los resultados obtenidos luego de la optimización revelan que la mejor alternativa desde el punto de vista económico surge de considerar OPs para el cultivo de las microalgas, el glicerol para la producción de PHAs y su posterior extracción y purificación a partir de surfactante y quelato. Si bien en este escenario no se logra alcanzar un valor positivo de la función objetivo que se busca maximizar (VPN=-462,09 MM\$) se proponen distintas alternativas que contribuyan a tornar atractiva este tipo de biorrefinerías integradas. Un aporte en este sentido lo brinda el análisis de sensibilidad realizado, donde se permiten identificar aquellos parámetros que más influyen sobre el valor del VPN. En particular se halla que logrando mejoras en las tecnologías empleadas en la actualidad para el secado de algas y mediante el empleo de cepas de microalgas con mayor contenido lipídico, se podría impactar positivamente en la rentabilidad de los biocombustibles de tercera generación.

Asimismo, otra de las opciones que surgen de este tipo de estudios, implican la posibilidad de incluir diversos coproductos de valor agregado, los cuales transformen este tipo de biorrefinerías en alternativas prometedoras como se presenta en un trabajo realizado con Carla V. García Prieto (García Prieto *et al.*, 2017) en el marco de su tesis doctoral, donde mediante la incorporación de un proceso de producción de astaxantinas a la biorrefinería integrada expuesta en este capítulo, se logran alcanzar valores económicos muy superiores a los alcanzados aquí (VPN=174,02 MM\$), representando un costo de producción de biodiesel de 0,48 \$/kg biodiesel.

# CAPÍTULO 7

## CONCLUSIONES Y TRABAJOS FUTUROS

### 7.1. Conclusiones generales

En esta tesis se han realizado contribuciones para la optimización de bioprocesos destinados a la biosíntesis de PHAs. Para ello, se desarrollaron modelos matemáticos basados en primeros principios y técnicas avanzadas de optimización a partir de información bibliográfica y datos experimentales.

En primer lugar, se llevó a cabo trabajo experimental durante una estadía en la Universidad Federal de Río de Janeiro, Brasil, con el objetivo de obtener datos dinámicos de las principales variables de estado involucradas en la producción de biopolímeros. Asimismo, se realizó una caracterización térmica, estructural y morfológica del material polimérico extraído de la biomasa celular.

Por otro lado, se desarrolló un modelo dinámico de la cinética de crecimiento del microorganismo *Bacillus megaterium* BBST4 y biosíntesis de PHAs. Se formuló y resolvió un problema de estimación de parámetros para el modelo propuesto en un entorno de optimización empleando una función objetivo de máxima verosimilitud sujeto a un sistema de ecuaciones diferencial algebraico. El modelo fue ajustado y validado a partir de datos experimentales obtenidos en el marco de esta tesis.

Asimismo, se desarrolló un modelo de una biorrefinería asociado a la obtención de PHAs a partir de diferentes fuentes de carbono, incluyendo un estudio tecnoeconómico característico de este tipo de bioprocesos. De modo similar, se propuso un modelo de una biorrefinería integrada para la producción biodiesel y coproductos de alto valor agregado, dentro de los cuales se incluyen a los PHAs. Los modelos mencionados se formularon como problemas de programación matemática mixto entero no lineal.

### 7.2. Conclusiones particulares

A continuación, se mencionan las principales contribuciones del trabajo realizado en el marco de la presente tesis doctoral.

En el Capítulo 2 se estudia la capacidad de crecimiento de la cepa autóctona *B. megaterium* BBST4 y su producción de PHA a partir de glicerol como única fuente de carbono. Se realizaron experimentos *in vivo* en Erlenmeyers y biorreactores empleando concentraciones iniciales de glicerol y urea (fuente de nitrógeno) de 20 g/L y 2 g/L, respectivamente, como así también 40 g/L de glicerol y 4 g/L de urea para una experiencia en biorreactor. Con el fin de contar con datos necesarios para el modelado del crecimiento y producción se tomaron muestras de las principales variables cinéticas del bioproceso en diferentes tiempos del cultivo. Dentro de los resultados obtenidos se destacan el porcentaje de acumulación del biopolímero del 37 % en peso seco de la biomasa para el caso de la experiencia en Erlenmeyer, 68 % en biorreactores y 27 % en los biorreactores donde se duplicó la concentración inicial de sustratos. Asimismo, las productividades resultaron de 0,032 g P/(L h) en Erlenmeyer, 0,081 g P/(L h) al escalarlo a biorreactor y 0,068 g P/(L h) en biorreactor con 40 g/L de glicerol y 4 g/L de urea. Estos resultados permiten profundizar a nivel experimental en el estudio de la producción de PHAs utilizando residuos agroindustriales como fuente de carbono para su biosíntesis por parte de la cepa *B. megaterium* BBST4. Asimismo, se obtienen datos dinámicos del bioproceso, los cuales se utilizan para calibrar y validar un modelo matemático del crecimiento de la biomasa y la producción del biopolímero.

En el Capítulo 3 se emplean distintas técnicas de caracterización estructural y térmica de polímeros con el objetivo de estudiar las propiedades de los PHAs biosintetizados por *B. megaterium* y compararlo con uno comercial (PHB). Los resultados obtenidos sugieren que el biomaterial analizado podría ser identificado como el copolímero P(3HB-co-HV). A su vez, con el biopolímero producido, se forman películas y se evalúan sus características morfológicas dentro de las cuales se destaca su mayor capacidad de barrera al UV en comparación a las de PHB comercial, resultando esto último de especial interés para aplicaciones en el área alimenticia.

En el Capítulo 4 se lleva a cabo una estimación de parámetros empleando técnicas avanzadas de optimización dinámica para un modelo de la cinética de crecimiento y producción de PHA a partir *B. megaterium* BBST4 considerando

dos sustratos diferentes, glicerol y almidón. Los modelos propuestos se calibran a partir de datos experimentales que se obtuvieron como parte del trabajo de esta tesis (fuente de carbono: glicerol) y los presentados en el marco de la tesis doctoral del Dr. Mauricio Porras (fuente de carbono: almidón). En el presente capítulo, se formula un problema de optimización sujeto a restricciones diferenciales y algebraicas que representan el modelo de la cinética de crecimiento y producción de la cepa *B. megaterium*. Mediante la resolución del problema de optimización dinámico, se determinan los valores óptimos de los parámetros cinéticos correspondientes a cada uno de los escenarios presentados. El modelo propuesto, calibrado por la estimación de parámetros, provee para todas las experiencias una buena representación de la evolución dinámica de la biomasa total y residual, el biopolímero, el pH y las fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo observados durante los ensayos efectuados experimentalmente. De este modo, con el trabajo realizado en este capítulo, se logra realizar una contribución novedosa en el campo del modelado matemático de la cinética de crecimiento y producción para la cepa *B. megaterium* a partir de glicerol y almidón como fuentes de carbono.

En el Capítulo 5 se formula una superestructura que incluye diferentes alternativas tecnológicas para la producción de PHA, como un problema de programación mixto entero no lineal (MINLP). La función objetivo que se busca maximizar es el valor presente neto (VPN) sujeto a restricciones que incluyen balances de masa y energía, el diseño detallado de los equipos, ecuaciones de costos de capital y restricciones enteras para la selección de las tecnologías respectivas. Los resultados presentan a la alternativa donde se emplea caña de azúcar como materia prima y enzimas como agente de extracción como la óptima. El valor positivo de la función objetivo empleada, conjuntamente con el cálculo adicional de otros índices de rentabilidad en la evaluación económica, como la tasa interna de retorno (TIR), el retorno sobre la inversión ( $ROI_A$ ) y el período de repago ( $PR_A$ ), indican el atractivo de esta propuesta productiva. Del mismo modo, el costo de producción del biopolímero y el consumo energético para su producción, resultan similares a los que actualmente se encuentran en el mercado. Por último, el análisis de sensibilidad realizado permite identificar los potenciales parámetros que deberían tenerse en cuenta para lograr mejoras

en el proceso productivo del PHA. Así, la estrategia de programación matemática implementada junto con el análisis de sensibilidad efectuado, permiten explorar la producción de un biopolímero de alto interés como el PHA.

En el Capítulo 6 se propone el diseño óptimo de una biorrefinería integrada a partir de microalgas para la producción de biodiesel y PHAs como un potencial coproducto de alto valor agregado. La superestructura propuesta incluye dos alternativas tecnológicas para el cultivo de microalgas, tres alternativas para el empleo del subproducto del proceso productivo de biodiesel y dos opciones para la extracción y purificación del biopolímero, en caso de seleccionar la ruta de producción de PHAs. Los resultados obtenidos luego de resolver el problema MINLP considerando el VPN como función objetivo a maximizar, señalan que la mejor alternativa surge de considerar estanques abiertos para el cultivo de las microalgas, el glicerol para la producción de PHAs y la extracción y purificación de este último, a partir de surfactante y quelato. A pesar de que en este escenario no se alcanza un valor positivo del VPN, mediante un análisis de sensibilidad se logran identificar aquellos sectores de la biorrefinería integrada en donde se debería prestar especial atención para impactar positivamente en la rentabilidad de los biocombustibles de tercera generación.

### **7.3. Trabajos futuros**

Los resultados obtenidos en esta tesis permiten profundizar tanto a nivel experimental como teórico, en el estudio de la producción de biopolímeros empleando fuentes de carbono alternativas. Conjuntamente, las metodologías aplicadas en los modelos matemáticos formulados, contribuirán en el avance del desarrollo de estrategias más robustas para el diseño y optimización de bioprocesos para la producción de PHAs. De esta manera, el presente estudio provee las bases para desarrollar posibles líneas de investigación las cuales se detallan a continuación.

- Aplicación de técnicas de optimización dinámica para la determinación de los perfiles óptimos de alimentación de sustratos en una configuración de biorreactores semibatch y continua.

- Formulación de modelos integrados de plantas de producción como problemas de optimización biobjetivo, en donde se puedan identificar oportunidades económicas y al mismo tiempo mejoras medioambientales. Para ello se propone una combinación de funciones objetivo (maximización económica y minimización del impacto ambiental) sujeto a las restricciones de diseño de los equipos.
- Escalado del proceso productivo de PHA a partir del trabajo experimental realizado a escala Erlenmeyer y diferentes volúmenes de biorreactor.





## BIBLIOGRAFÍA

### A

Abdelaziz, O. Y.; Gadalla, M. A.; El-Halwagi, M. M.; Ashour, F. H. A hierarchical approach for the design improvements of an Organocat biorefinery. *Bioresource Technology*. 2015, 181, 321-329.

Abdelwahab, M. A.; Flynn, A.; Chiou, B.-S.; Imam, S.; Orts, W. Thermal, mechanical and morphological characterization of plasticized PLA-PHB blends. *Polymer Degradation and Stability*. 2012, 97, 1822-1828.

Åkerberg, C.; Hofvendahl, K.; Zacchi, G.; Hahn-Hagerdal, B. Modelling the influence of pH, temperature, glucose and lactic acid concentrations on the kinetics of lactic acid production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435 in whole-wheat flour. *Applied Microbial and Biotechnology*. 1998, 49, 682–690.

Akiyama, M.; Tsuge, T.; Doi, Y. Environmental life cycle comparison of polyhydroxyalkanoates produced from renewable carbon resources by bacterial fermentation. *Polymer Degradation and Stability*. 2003, 80, 183-194.

Albuquerque, P. B. S.; Malafaia, C. B. Perspectives on the production, structural characteristics and potential applications of bioplastics derived from polyhydroxyalkanoates. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018, 107, 615- 625.

Alibaba.com (último acceso 6.08.2017)

Ali Raza, Z.; Abid, S.; Banat, I. M. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2018, 126, 45-56.

Ali, I.; Jamil, N. Polyhydroxyalkanoates: Current applications in the medical field. *Frontiers in Biology*. 2016, 11, 19-27.

Ambienteplastico.com (último acceso 29.05.2019)

Amores, M. J.; Mele, F. D.; Jimenez, L.; Castells, F. Life cycle assessment of fuel ethanol from sugarcane in Argentina. *International Journal of Life Cycle Assessment*. 2013, 18, 1344–1357.

Anjum, A.; Zuber, M.; Zia, K. M.; Noreen, A.; Anjum, M. N.; Tabasum, S. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: a review of recent advancements. *International Journal of Biology and Macromolecules*. 2016, 89, 161-174.

Aoyagi, Y.; Yamashita, K.; Doi, Y. Thermal degradation of poly[(R)-3-hydroxybutyrate], poly[ $\epsilon$ -caprolactone], and poly[(S)-lactide]. *Polymer Degradation and Stability*. 2002, 76, 53-59.

Arrieta, M. P.; López, J.; Hernández, A.; Rayón, E. Ternary PLA-PHB-Limonene blends intended for biodegradable food packaging applications. *European Polymer Journal*. 2014, 50, 255-270.

Arrieta, M. P.; Samper, M. D.; Aldas, M.; López, J. On the use of PLA-PHB blends for sustainable food packaging applications. *Materials*. 2017, 10, 1008.

Arslan, H.; Yesilyurt, N.; Hazer, B. The synthesis of poly(3-hydroxybutyrate)-g-poly(methylmethacrylate) brush type graft copolymers by atom transfer radical polymerization method. *Journal of Applied Polymer Science*. 2007, 106, 1742-1750.

Ashby, R. D.; Solaiman, D. K.; Strahan, G. D.; Zhu, C.; Tappel, R. C.; Nomura, C. T. Glycerine and levulinic acid: renewable co-substrates for the fermentative synthesis of short-chain poly (hydroxyalkanoate) biopolymers. *Bioresource Technology*. 2012, 118, 272–280.

Aspen Plus. Cambridge, Massachusetts, USA: Aspen Technology, Inc. 2010.

## B

Bio-on. 2018.

<http://www.bio-on.it> (último acceso 01.03.18).

Biazar, E. Polyhydroxyalkanoates as potential biomaterials for neural tissue regeneration. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 2014, 63, 898-908.

Brandon, A. M.; Criddle, C. S. Can biotechnology turn the tide on plastics? *Current opinion in Biotechnology*. 2019, 57, 160-166.

Bugnicourt, E.; Cinelli, P.; Lazzeri, A.; Alvarez, V. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *Express Polymer Letters*. 2014, 8, 791-808.

Bao, B.; Ng, D. K.; Tay, D. H.; Jiménez-Gutiérrez, A.; El-Halwagi, M. M. A shortcut method for the preliminary synthesis of process-technology pathways: An optimization approach and application for the conceptual design of integrated biorefineries. *Computers & Chemical Engineering*. 2011, 35, 1374-1383.

Burniol-Figols, A.; Varrone, C.; Daugaard, A. E.; Le, S. B.; Skiadas, I. V.; Gavala, H. N. Polyhydroxyalkanoates (PHA) production from fermented crude glycerol: Study on the conversion of 1,3-propanediol to PHA in mixed microbial consortia. *Water Research*. 2018, 128, 255-266.

Braunegg, G.; Sonnleitner, B.; Lafferty, R. M. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in microbial biomass. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*. 1978, 6, 29-37.

Basnett, P.; Ravi, S.; Roy, I. Natural bacterial biodegradable medical polymers: Polyhydroxyalkanoates. *Science and Principles of Biodegradable and Bioresorbable Medical Polymers*. 2017, 257-277.

Barham, P.; Keller, A.; Otun, E. L.; Holmes, P. Crystallization and morphology of a bacterial thermoplastic: poly-3-hydroxybutyrate. *Journal of Material Science*. 1984, 19, 2781-2794.

Bloembergen, S.; Holden, D. A.; Hamer, G. K.; Bluhm, T. L.; Marchessault, R. H. Studies of composition and crystallinity of bacterial poly( $\beta$ -hydroxybutyrate-co- $\beta$ -hydroxyvalerate). *Macromolecules*. 1986, 19, 2865-2871.

Biegler, L. T.; Cervantes, A. M.; Wächter, A. Advances in simultaneous strategies for dynamic process optimization. *Chemical Engineering Sciences*. 2002, 57, 575-593.

Braunegg, G.; Lefebvre, G.; Genser, K. F. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects. *Journal of Biotechnology*. 1998, 65, 127–161.

Biegler, L. T.; Grossmann, I. E.; Westerberg, A. W. Basics concepts for algorithm methods. Prentice-Hall PTR, Upper Saddle River, New Jersey, Estados Unidos. 1997.

Biomer. 2018.

<http://www.biomer.de/> (último acceso 28.03.2018)

Brownbridge, G.; Azadi, P.; Smallbone, A.; Bhave, A.; Taylor, B.; Kraft, M. The future viability of algae-derived biodiesel under economic and technical uncertainties. *Bioresource Technology*. 2014, 151, 166-173.

Banerjee, S.; Ramaswamy, S. Dynamic process model and economic analysis of microalgae cultivation in open raceway ponds. *Algal Research*. 2017, 26, 330-340.

## C

Cámara de alcoholes. 2018.

[www.camaradealcoholes.org.ar](http://www.camaradealcoholes.org.ar) (último acceso 26.03.2018)

Carr, M. E.; Black, L. T.; Bagby, M. O. Continuous enzymatic liquefaction of starch for saccharification. *Biotechnology and Bioenergy*. 1982, 24, 2441-2449.

Carrasco, F.; Dionisi, D.; Martinelli, A.; Majone, M. Thermal stability of polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Polymer Science*. 2006, 100, 2111-2121.

Cavalheiro, J.; De Almeida, A.; Grandfils, C.; Da Fonseca, M. M. R. Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. *Process Biochemistry*. 2009, 44, 509-515.

Cha, S.; Son, J.; Jamal, Y.; Zafar, M.; Park, H. Characterization of polyhydroxyalkanoates extracted from wastewater sludge under different environmental conditions. 2016, 112, 1-12.

Chaijamrus, S.; Udpuay, N. Production and characterization of polyhydroxybutyrate from molasses and corn steep liquor produced by *Bacillus megaterium* ATCC 6748. Agricultural Engineering International: CIGRE Journal. 2008,1-12.

Chanprateep, S. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. Journal of Bioscience and Bioengineering. 2010, 110, 621–632.

Chauvel, A. Institut Français du Pétrole. Manual of economics analysis of chemical processes. 1981, McGraw-Hill, New York, United States.

Chauvel, A.; Fournier, G.; Raimbault, C. Manual of process economic evaluation. Technip, Paris, France. 2003.

Chee, J., Yoga, S., Lau, N., Ling, S., Abed, R. M. M. Bacterially produced Polyhydroxyalkanoate ( PHA ): converting renewable resources into bioplastics. In: Mendez-Vilas, A. (Ed.), Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. Formatex research center. 2010, 1395–1404.

[chemengonline.com/pci](http://chemengonline.com/pci) (último acceso 28.03.2018)

Chen, G. Q. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. Chemical Society Reviews. 2009, 8, 2434-2446.

Chen, G. Q.; Patel, M. Plastics derived from biological sources: Present and future- A technical and an environmental review. Chemical Reviews. 2012, 112, 2082-2099.

Chen, G. Q.; Wu, Q. Microbial production and applications of chiral hydroxyalkanoates. Applied Microbiology and Biotechnology. 2005, 67, 592-599.

Chen, G. Q.; Zhang, J. Microbial polyhydroxyalkanoates as medical implant biomaterials. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*. 2017, 29, 1-18.

Chen, G.-Q. Industrial production of PHA. In: Chen, G.G.-Q., *Plastics from bacteria: Natural functions and applications*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. 2010, 121–132.

Chen, Y. Chen, J.; Yu, C.; Du, G.; Lun, S. Recovery of poly-3-hydroxybutyrate from *Alcaligenes eutrophus* by surfactant-chelate aqueous system. *Process Biochemistry*. 1999, 34, 153–157.

Chen, Y.; Yang, H.; Zhou, Q.; Chen, J.; Gu, G. Cleaner recovery of poly(3-hydroxybutyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus*. *Process Biochemistry*. 2001, 36, 501–506.

Chemengonline.com (último acceso 8.04.2017)

Cherubini, F. The Biorefinery Concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*. 2010, 51, 1412-1421.

Chisti, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. 2007, 25, 294-306.

Chohan, S. N.; Copeland, L. Acetoacetyl coenzyme A reductase and polyhydroxybutyrate synthesis in rhizobium (*Cicer*) sp. strain CC 1192. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998, 64, 2859-2863.

Choi, G.-G.; Kim, H. W.; Kim, Y. B.; Rhee, Y. H. Biocompatibility of P3HB-co-HV copolyesters produced by *Alcaligenes* sp. MT-16. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2005, 10, 540-545.

Christopher, L.; Kumar, H.; Zambare, V. P. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. *Applied Energy*. 2014, 119, 497-520.

conversio-gmbh.com (último acceso 26.03.2018)

Coutinho de Paula, F.; Kakazu, S.; Chimello de Paula, C. B.; Cabrera Gomez, J. G.; Contiero, J. Polyhydroxyalkanoate production from crude

glycerol by newly isolated *Pandoraea* sp. *Journal of King Saud University-Science*. 2017, 29, 166-173.

Crawford, C. B.; Quinn, B. Plastic production, waste and legislation. In: *Microplastic Pollutants*. 2017, Elsevier, Amsterdam, Netherlands.

Cwsec-sc.org (último acceso 25.09.2016)

## D

D'Amico, D. A.; Iglesias Montes, M. L.; Manfredi, L. B.; Cyras, V. P. Fully bio-based and biodegradable polylactic acid/poly(3-hydroxybutirate) blends: Use of a common plasticizer as performance improvement strategy. *Polymer Testing*. 2016, 49, 22-28.

Dahiya, S.; Kumar, A. N.; Sravan, J. S.; Chatterjee, S.; Sarkar, O.; Mohan, S. V. Food waste biorefinery: Sustainable strategy for circular bioeconomy. *Bioresource Technology*. 2018, 248, 2-12.

Dall'Asta, V.; Berbenni, V.; Mustarelli, P.; Ravelli, D.; Samori, C.; Quartarone, E. A biomass-derived polyhydroxyalkanoate biopolymer as safe and environmental-friendly skeleton in highly efficient gel electrolytes for lithium batteries. *Electrochimica Acta*. 2017, 247, 63-70.

Danimer Scientific. 2018.

<http://danimerscientific.com/danimer-products/danimer-products-pha-biodegradable-plastics/> (Último acceso 28.03.2018)

Datta, R.; Tsai, S. P.; Bonsignore, P.; Moon, S. H.; Frank, J. R. Technological and economic potential of poly(lactic acid) and lactic acid derivatives. *Microbiological Reviews*. 1995, 16, 221-231.

Davis, R.; Aden, A.; Pienkos, P. T. Techno-economic analysis of autotrophic microalgae for fuel production. *Applied Energy*. 2011, 88, 3524-3531.

Delpino, C.; De Genaro, P.; Di Maggio, J.; Estrada, V.; Diaz, M. S. Dynamic parameter estimation problem for ethanol production from seaweed. *Chemical Engineering Transactions*. 2014, 37, 433-438.

Di Gregorio, B. E. Biobased performance bioplastic: Mirel. *Chemistry & Biology*. 2009, 16, 1–2.

Diaz, M. S.; Espinosa, S.; Brignole, E. A. Model-based cost minimization in noncatalytic biodiesel production plants. *Energy Fuels*. 2009, 23, 5587-5595.

Diaz, M. S.; Biegler, L. T. Dynamic optimization in process systems. En: Martin M., ed., *Introduction to software for chemical engineers*. 2015, 541-570. CRC Press, Boca Ratón, Florida, Estados Unidos.

Dietrich, K.; Dumont, M. J.; Del Rio, L. F.; Orsat, V. Sustainable PHA production in integrated lignocellulose biorefineries. *New Biotechnology*. 2019, 49, 161-168.

Dietrich, K.; Dumont, M. J.; Del Rio, L. F.; Orsat, V. Producing PHAs in the bioeconomy - Towards a sustainable bioplastic. *Sustainable Production and Consumption*. 2017, 9, 58-70.

Dinjaski, N.; Prieto, M. A. Smart polyhydroxyalkanoate nanobeads by protein based functionalization. *Nanomedicine*. 2015, 11, 885-99.

Dong, Z.; Sun, X. A new method of recovering polyhydroxyalkanoate from *Azotobacter chroococcum*. *Chinese Science Bulletin*. 2000, 45, 252–256.

Douglas, J. M. *Conceptual design of chemical processes*. McGraw-Hill, Nueva York, Estados Unidos. 1988.

Duran, M. A.; Grossmann, I. E. A mixed integer nonlinear programming algorithm for process synthesis. *AIChE Journal*. 1986, 32, 592–606.

Dutta, K.; Daverey, A.; Lin, J. G. Evolution retrospective for alternative fuels: First to fourth generation. *Renewable Energy*. 2014, 69, 114-122.

## E

Echarte, R. *Equipos para procesos químicos*. EdiUNS. Bahía Blanca, Argentina. 2010.

Eia.gov (último acceso 26.12.2017)



El-Halwagi, M. M. Macroscopic Approaches of Process Integration. In: Sustainable design through process integration. 2017a, Elsevier, Amsterdam, Países Bajos.

El-Halwagi, M. M. Integration of combined heat and power systems. In: Sustainable design through process integration. 2017b, Elsevier, Amsterdam, Países Bajos.

Elsayed, M. A.; Matthews, R.; Mortimer, N. D. Carbon and energy balances for a range of biofuel options. Report for Resources Research Unit. 2003, Sheffield Hallam University, Reino Unido.

Energy.gov (último acceso 25.02.2017)

Eroğlu, M. S.; Hazer, B.; Ozturk, T.; Caykara, T. Hydroxylation of pendant vinyl groups of poly(3-hydroxy undec-10-enoate) in high yield. Journal of Applied Polymer Science. 2005, 97, 2132-2139.

Estrada, V.; Parodi, E. R.; Diaz, M. S. Determination of biogeochemical parameters in eutrophication models with simultaneous dynamic optimization approaches. Computers & Chemical Engineering. 2009, 33, 1760–1769.

European-Bioplastics

[www.european-bioplastics.org/bioplastics/](http://www.european-bioplastics.org/bioplastics/) (último acceso 26.03.2018)

## F

Fabian, P.; Cusack, R.; Hennessey, P.; Neuman, M. Demystifying the selection of mist eliminators. Chemical Engineering. 1993, 100, 148-156.

Fabra, M. J.; Lopez-Rubio, A.; Lagaron, J. M. Nanostructured interlayers of zein to improve the barrier properties of high barrier polyhydroxyalkanoates and other polyesters. Journal of Food Engineering, 2014, 127, 1-9.

Ferreira, A. F.; Soares Dias, A. P.; Silva, C. M.; Costa, M. Evaluation of thermochemical properties of raw and extracted microalgae. Energy. 2015, 92, 365-372.

Ferreira, T. Controle ótimo da produção de poli((R)-3-hidróxi-butilato) a partir da bactéria *Bacillus* sp. em biorreator. 2013, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

Furrer, P.; Panke, S.; Zinn, M. Efficient recovery of low endotoxin medium-chain-length poly([R]-3-hydroxyalkanoate) from bacterial biomass. *Journal of Microbiological Methods*. 2007, 69, 206-213.

## G

Gadkar, K. G.; Doyle, F. J.; Crowley, T. J.; Varner, J. D. Cybernetic model predictive control of a continuous bioreactor with cell recycle. *Biotechnology progress*. 2003, 19, 1487-1497.

Gahlawat, G.; Soni, S. K. Valorization of waste glycerol for the production of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer by *Cupriavidus necator* and extraction in a sustainable manner. *Bioresource Technology*. 2017, 243, 492-501.

Gain.fas.usda.gov (último acceso 15.05.2017)

Gambetta, R. Análise teórica e experimental da curva de distribuição de massas molares do poli((R)-3-hidróxi-butilato) produzido pela bactéria *Alcaligenes latus*. 2006, Tesis Doctoral, Rio de Janeiro, Brasil.

Gambetta, R. Análise teórica e experimental da curva de distribuição de massas molares do poli((R)-3-hidróxi-butilato) produzido pela bactéria *Alcaligenes latus*. 2006, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

Gao, X.; Chen, J. C.; Wu, Q.; Chen, G. Q.. Polyhydroxyalkanoates as a source of chemicals, polymers, and biofuels. *Current Opinion in Biotechnology*. 2011, 22, 768-774.

García Prieto, C. V.; Ramos, F. D.; Estrada, V.; Diaz, M. S. Optimal design of an integrated microalgae biorefinery for the production of biodiesel and PHBs. *Chemical Engineering Transactions*. 2014, 37, 319-324.

García Prieto, C. V.; Ramos, F. D.; Estrada, V.; Villar, M. A.; Diaz, M. S. Optimization of an integrated algae-based biorefinery for the production of biodiesel, astaxanthin and PHB. *Energy*. 2017, 139, 1159-1172.

García, D. J.; You, F. Multiobjective optimization of product and process networks: General modeling framework, efficient global optimization algorithm, and case studies on bioconversion. *AIChE Journal*. 2015, 61, 530-554.

García, I. L.; López, J. A.; Dorado, M. P.; Kopsahelis, N.; Alexandri, M.; Papanikolaou, S.; Villar, M. A.; Koutinas, A. A. Evaluation of by-products from the biodiesel industry as fermentation feedstock for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by *Cupriavidus necator*. *Bioresource technology*. 2013, 130, 16–22.

Garlapati, V. K.; Shankar, U.; Budhiraja. Bioconversion technologies of crude glycerol to value added industrial products. *Biotechnology Reports*. 2016, 9, 9-14.

Gebreslassie, B. H.; Waymire R.; You F. Sustainable design and synthesis of algae-based biorefinery for simultaneous hydrocarbon biofuel production and carbon sequestration. *AIChE Journal*. 2013, 59, 1599-1621.

Geyer, R.; Jambeck, J. R.; Law, K. L. Production, use and fate of all plastics ever made. *Science Advances*. 2017, 3, e1700782.

Gnansounou, E. Coproducts performances in biorefineries: Development of Claiming-based allocation models for environmental policy. *Bioresource Technology*. 2018, 254, 31-39.

Gong, J.; You, F. Global optimization for sustainable design and synthesis of algae processing network for CO<sub>2</sub> mitigation and biofuel production using life cycle optimization. *AIChE Journal*. 2014a, 60, 3195–3210.

Gong, J.; You, F. Q. Optimal design and synthesis of algal biorefinery processes for biological carbon sequestration and utilization with zero direct greenhouse gas emissions: MINLP model and global optimization algorithm. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2014b, 53, 1563–1579.

Gong, J.; You, F. Value-added chemicals from microalgae: greener, more economical, or both? *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2015, 3, 82-96.

gPROMS, <http://www.psenterprise.com>

Grossmann, I. E. Mixed-integer Optimization Techniques for Algorithmic Process Synthesis. *Advances*. 1996, 23.

Grossmann, I. E. Mixed-Integer Programming Approach for the Synthesis of Integrated Process Flowsheets. *Computers & Chemical Engineering*. 1985, 9, 463–482.

Grossmann, I. E.; Kravanja, Z. Mixed integer nonlinear programming techniques for process systems engineering. *Computers & Chemical Engineering*. 1995, 19, 189-204.

Grossmann, I. E.; Ruiz, J. P. Generalized disjunctive programming: A framework for a formulation and alternative algorithms for MINLP optimization. IN: Lee, J.; Leyffer, S. (eds.) *Mixed Integer Nonlinear Programming. The IMA Volumes in Mathematics and its Applications*. Springer, New York, United States. 2012, 154, 93-115.

Grossmann, I. E.; Viswanathan, J.; Vecchiotti, A.; Raman, R.; Kalvelagen, E. *GAMS/DICOPT: A discrete continuous optimization package*. 2003.

Guerra-Blanco, P.; Cortes, O.; Poznyak, T.; Chairez, I.; García-Peña, E. I. Polyhydroxyalkanoates (PHA) production by photoheterotrophic microbial consortia: Effect of culture conditions over microbial population and biopolymer yield and composition. *European Polymer Journal*. 2018, 98, 94-104.

Guzman, D. Newlight, Biomer on PHA deal. *Green Chemicals blog*. 2013.

## H

Hahn, S. K.; Chang, Y. K.; Kim, B. S.; Chang, H. N. Optimization of microbial poly(3-hydroxybutyrate) recovery using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform. *Biotechnol. Bioeng*. 1994, 44, 256-261.

Han, J.; Li, M.; Hou, J.; Wu, L.; Zhou, J.; Xiang, H. Comparison of four phaC genes from *Haloferax mediterranei* and their function in different PHBV copolymer biosyntheses in *Haloarcula hispanica*. *Saline Systems*. 2010, 6, 9.

Hanko, E. K. R.; Minton, N. P.; Malys, N. Characterisation of a 3-hydroxypropionic acid inducible system from *Pseudomonas putida* for orthogonal gene expression control in *Escherichia coli* and *Cupriavidus necator*. *Scientific Report*. 2017, 7, 1724.

Harding, K. G.; Dennis, J. S.; von Blottnitz, H.; Harrison, S. T. L. Environmental analysis of plastic production processes: Comparing petroleum-based polypropylene and polyethylene with biologically-based poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid using life cycle analysis. *Journal of Biotechnology*. 2007, 130, 57-66.

Harvey, P.; Bailey, D.; Ben-Amotz, A.; Verdelho, V.; Harris, G.; Rooke, D.; Hoekstra, H.; Goacher, P.; Crespi, J.; Reinhardt, G.; Martinelli, L.; Schroder, D.; Pipe, R.; Igl-Schmid, N.; Kokossis, A.; Perrson, K. The CO<sub>2</sub> microalgae biorefinery: high value products and biofuels using halophilic microalgae in the "D-Factory". *New Biotechnology*. 2014, 31, 14-15.

He, Y.; Hu, Z.; Ren, M.; Ding, C.; Chen, P.; Gu, Q.; Wu, Q. Evaluation of PHBHHx and PHBV/PLA fibers used as medical sutures. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2013, 25, 1-11.

Heinrich, D.; Madkour, M. H.; Al-Ghamdi, M. A.; Shabbaj, I. I.; Steinbüchel, A. Large scale extraction of poly(3-hydroxybutyrate) from *Ralstonia eutropha* H16 using sodium hypochlorite. *AMB Express*. 2012, 2, 59.

Hirai, H.; Takada, H.; Ogata, Y.; Yamashita, R.; Mizukawa, K.; Saha, M.; Kwan, C. Moore, C.; Gray, H.; Laursen, D.; Zettler, E. R.; Farrington, J. W.; Reddy, C. M.; Peacock, E. E.; Ward, M. W. Organic micropollutants in marine plastics debris from the open ocean and remote and urban beaches. *Marine Pollution Bulletin*. 2011, 62, 1683-1692.

Höfer, P.; Vermette, P.; Groleau, D. Production and characterization of polyhydroxyalkanoates by recombinant *Methylobacterium extorquens*:

Combining desirable thermal properties with functionality. *Biochemical Engineering Journal*. 2011, 54, 26-33.

Huisman, G. W.; Deleeuw, O.; Eggink, G.; Witholt, B. Synthesis of poly-3-hydroxyalkanoates is a common feature of fluorescent pseudomonads. *Applied and Environmental Microbiology*. 1989, 55, 1949-1954.

Hysys. 2013. [www.aspentech.com](http://www.aspentech.com)

## I

Israni, N.; Shivakumar, S. Evaluation of upstream process parameters influencing the growth associated PHA accumulation in *Bacillus* sp. Ti3. *Journal of Scientific & Industrial Research*. 2015, 74, 290-295.

## J

Jacquel, N.; Lo, C.-W.; Wei, Y.-H.; Wu, H.-S.; Wang, S. S. Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). *Biochemical Engineering Journal*. 2008, 39, 15–27.

Jiang, G.; Hill, D. J.; Kowalczyk, M.; Johnston, B.; Adamus, G.; Irerere, V.; Radecka, I. Carbon sources for polyhydroxyalkanoates and an integrated biorefinery. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016, 17, 1157.

Jiang, Y., Mikova, G., Kleerebezem, R., van der Wielen, L.A., Cuellar, M.C. Feasibility study of an alkaline-based chemical treatment for the purification of polyhydroxybutyrate produced by a mixed enriched culture. *AMB Express*. 2015, 5, 5.

Jin, Q.; Yang, L.; Poe, N.; Huang, H. Integrated processing of plant-derived waste to produce value-added products based on the biorefinery concept. *Trends in Food Science & Technology*. 2018, 74, 119-131.

Joseph, K. Global agricultural information network report. 2017. Disponible en: [http://agriexchange.apeda.gov.in/marketreport/Reports/Sugar\\_Annual\\_Buenos\\_Aires\\_Argentina\\_4-28-2017.pdf](http://agriexchange.apeda.gov.in/marketreport/Reports/Sugar_Annual_Buenos_Aires_Argentina_4-28-2017.pdf)

# K

Kamm, B.; Kamm, M.; Gruber, P. R.; Kromus, S. Biorefinery systems—an overview. In: Kamm, B.; Gruber, P. R.; Kamm, M. eds. *Biorefineries—industrial processes and products (status quo and future directions)*. 2006, 1-40. Wiley-VCH, Weinheim, Alemania.

Kaplan, D. L. *Biopolymers from renewable resources*. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1998.

Kapritchkoff, F. M.; Viotti, A. P.; Alli, R. C. P.; Zuccolo, M.; Pradella, J. G. C.; Maiorano, A. E.; Miranda, E. A.; Bonomi, A. Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by *Ralstonia eutropha*. *Journal of Biotechnology*. 2006, 122, 453–462.

Kasivisvanathan, H.; Ng, R. T. L.; Tay, D. H. S.; Ng, D. K. S. Fuzzy optimisation for retrofitting a palm oil mill into a sustainable palm oil-based integrated biorefinery. *Chemical Engineering Journal*. 2012, 200–202, 694-709.

Khanna, S.; Srivastava, A. K. Computer simulated fed-batch cultivation for over production of PHB: A comparison of simultaneous and alternate feeding of carbon and nitrogen. *Biochemical Engineering Journal*. 2006a, 27, 197-203.

Khanna, S.; Srivastava, A. K. Optimization of nutrient feed concentration and addition time for production of poly( $\beta$ -hydroxybutyrate). *Enzyme and Microbial Technology*. 2006b, 39, 1145-1151.

Khanna, S.; Srivastava, A.K. Productivity enhancement of poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) by fed-batch cultivation of nutrients using variable (decreasing) nutrient rate by *Wautersia eutropha*. *Chemical Engineering Communications*. 2008, 195, 1424-1436.

Khanna, S.; Srivastava, A.K. Statistical media optimization studies for growth and PHB production by *Ralstonia eutropha*. *Process Biochemistry*. 2005, 40, 2173–2182.

Khosravi-Darani, K.; Mokhtari, Z. B.; Amai, T.; Tanaka, K. Microbial production of poly(hydroxybutyrate) from C1 carbon sources. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013, 97, 1407-1424.

King, A. Deals of Year Spotlight Financings, Collaborations, Emerging Stars. *Georgia Bio*. 2013.

Klinke S, Ren Q, Witholt B, Kessler B: Production of mediumchain-length poly(3-hydroxyalkanoates) from gluconate by recombinant *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999, 65, 540-548.

Kokossis, A. C. Design of integrated biorefineries. *Computers Aided Chemical Engineering*. 2014, 34, 173-185.

Kokossis, A. C.; Tsakalova, M.; Pyrgakis, K. Design of integrated biorefineries. *Computers and Chemical Engineering*. 2015, 81, 40-56.

Koller, M.; Salerno, A.; Dias, M.; Reiterer, A.; Braunegg, G. Modern biotechnological polymer synthesis: A review. *Food Technology & Biotechnology*. 2010a, 48, 255–269.

Koller, M.; Atlic, A.; Dias, M.; Reiterer, A.; Braunegg, G. Microbial PHA production from waste raw materials. IN: Chen, G. –Q. (ed.). *PLastics from bacteria*. Springer-VErlag, Berlin, Heidelberg, Alemania. 2010b.

Koller, M.; Gasser, I.; Schmid, F.; Berg, G. Linking ecology with economy: Insights into polyhydroxyalkanoate-producing microorganisms. *Engineering in Life Science*. 2011, 11, 222–237.

Koller, M.; Salerno, A.; Tuffner, P.; Koinigg, M.; Böchzelt, H.; Schober, S.; Pieber, S.; Schnitzer, H.; Mittelbach, M.; Braunegg, G. Characteristics and potential of micro algal cultivation strategies: a review. *Journal of cleaner production*. 2012, 37, 377-388.

Koller, M.; Marsálek, L.; Miranda de Sousa Diaz, M.; Braunegg, G. Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner. *New Biotechnology*. 2017, 37, 24-38.



Kosseva, M. R.; Rusbandi, E. Trends in the biomanufacture of polyhydroxyalkanoates with focus on downstream processing. *International Journal of Biological macromolecules*. 2018, 107, 762-778.

Koutinas, A.A.; Vlysidis, A.; Pleissner, D.; Kopsahelis, N.; Garcia, I.L.; Kookos, I. K.; Papanikolaou, S.; Kwan, T. H.; Lin, C. S. Valorization of industrial waste and by-product streams via fermentation for the production of chemicals and biopolymers. *Chemical Society Reviews*. 2014, 43, 2587–2627.

Kulpreecha, S.; Boonruangthavorn, A.; Meksiriporn, B.; Thongchul, N. Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2009, 107, 240-245.

Kumar, P.; Ray, S.; Patel, S. K. S.; Lee, J. K.; Kalia, V. C. Bioconversion of crude glycerol to polyhydroxyalkanoate by *Bacillus thuringiensis* under non-limiting nitrogen conditions. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2015, 78, 9-16.

Kumar, P.; Jun, H. B.; Kim, B. S. Co-production of polyhydroxyalkanoates and carotenoids through bioconversion of glycerol by *Paracoccus* sp. strain LL1. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018, 107, 2552-2558.

Kushwah, B.S.; Kushwah, A. V. S.; Singh, V. Towards understanding polyhydroxyalkanoates and their use. *Journal of Polymer Research*. 2016, 23.

Kyoto Protocol. Disponible online en:

<http://www.kyotoprotocol.com/resource/kpspan.pdf> (último acceso 28.03.2018).

## L

Lai, Y. Y.; Yik, K. C. H.; Hau, H. P.; Chow, C. P.; Ng, L. Y. Systematic decision making methodology for chemical product design in integrated biorefineries. *Computer Aided Chemical Engineering*. 2017, 40, 1771-1776.

Laird, K. Green Matter: why you should keep a close eye on Metabolix in 2013, *Plastics Today*. 2012.

Lasry Testa, R.; Delpino, C.; Estrada, V.; Diaz, M. S. *In silico* strategies to couple production of bioethanol with growth in *Cyanobacteria*. *Biotechnology and Bioengineering*. 2019. DOI: 10.1002/bit.26998

Ledda, C.; Schievano, A.; Scaglia, B.; Rossoni, M.; Ación, F. G.; Adani, F. Integration of microalgae production with anaerobic digestion of dairy cattle manure: an overall mass and energy balance of the process. *Journal of Cleaner Production*. 2016, 112, 103-112.

Lee, S. Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*. 1996, 49, 1–14.

Lee, S.; Grossmann, I. E. New Algorithms for Nonlinear Generalized Disjunctive Programming. *Computers and Chemical Engineering*. 2000, 24, 2125–2141.

Lee, A. K.; Lewis, D. M.; Ashman, P. J. Energy requirements and economic analysis of a full scale microbial flocculation system for microalgal harvesting. *Chemical Engineering Research & Design*. 2010, 88, 988-996.

Lemoigne, M.. Produits de deshydratation et de polymerisation de l'acide  $\beta$ -oxybutyric. *Bulletin de la Société Chimie Biologique*. 1926, 8, 770-782.

Levett, I.; Birkett, G.; Davies, N.; Bell, A.; Langford, A.; Laycock, B.; Lant, P.; Pratt, S. Techno-economic assessment of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) production from methane - The case for thermophilic bioprocessing. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2016, 4, 3724–3733.

Li, Q.; Du, W.; Liu, D. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008, 80, 749-756.

Li, S.-D.; Yu, P. H.; Cheung, M. K. Thermogravimetric analysis of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Journal of Applied Polymer Science*. 2001, 80, 2237-2244.

López García, I. Development of biorefineries using renewable raw materials for the production of biodegradable polymers. 2012, Tesis doctoral, Córdoba, España.

López Jiménez, J. A. Polímeros de interés industrial. Síntesis y caracterización de polihidroxibutirato (PHB). Tesis doctoral. 2011. Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina.

López, J. A.; Bucalá, V.; Villar, M. A. Application of dynamic optimization technique for poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) production in a fed-batch bioreactor", *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2010, 49, 1762-1769.

López, J. A.; Naranjo, J. M.; Higuera, J. C.; Cubitto, M. A.; Cardona, C. A.; Villar, M. A. Biosynthesis of PHB from a new isolated *Bacillus megaterium* strain: Outlook on future developments with endospore forming bacteria. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2012, 17, 250-258.

López, O. V.; Ninango, M. D.; Lencina, M. M. S.; García, M. A.; Andreucetti, N. A.; Ciolino, A. E.; Villar, M. A. Thermoplastic starch plasticized with alginate-glycerol mixtures: Melt-processing evaluation and film properties. *Carbohydrate Polymers*. 2015, 126, 83-90.

Lopez-Arenas, T.; Gonzalez-Contreras, M.; Anaya-Reza, O.; Sales-Cruz, M. Analysis of the fermentation strategy and its impact on the economics of the production process of PHB (polyhydroxybutyrate). *Computers and Chemical Engineering*. 2017, 107, 140-150.

López-Rubio, A.; Lagaron, J. M. Improvement of UV stability and mechanical properties of biopolyesters through the addition of  $\beta$ -carotene. *Polymer Degradation and Stability*. 2010, 95, 2162-2168.

Lourenco, W. C. F.; Macret, R.; Cielo, J. E. Process for the purification of crude alkaline glycerol. *Rhodia poliamida e especialidades Ltda*. EP20090171811. 2011.

Luo, R.; Chen J, Zhang L, Chen G. Polyhydroxyalkanoate copolyesters produced by *Ralstonia eutropha* PHB-4 harboring a low-substrate-specificity PHA synthase PhaC2Ps from *Pseudomonas stutzeri* 1317. *Biochemical Engineering Journal*. 2006, 32, 218-225.

Luo, X.; Ge, X.; Cui, S.; Li, Y. Value-added processing of crude glycerol into chemicals and polymers. *Bioresource Technology*. 2016, 215, 144-154.

Luvizetto, D. J. Cultivo da bacteria *Bacillus megaterium* para a produção do biopolímero poli(3-hidroxi butirato) e modelagem matemática do bioproceto. 2007, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

Luvizzetto Faccin, D. J.; Martins, I.; Medeiros Cardozo, N. S.; Rech, R.; Záchia Ayub, M. A.; Moitinho Alves, T. L.; Gambetta, R.; Resende Secchi, A. Optimization of C:N ratio and minimal initial carbon source for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Bacillus megaterium*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2009, 84, 1756-1761.

Luvizzetto Faccin, D. J.; Pacheco Correa, M.; Rech, R.; Záchia Ayub, M. A.; Resende Secchi, A.; Medeiros Cardozo, N. S. Modeling P(3HB) production by *Bacillus megaterium*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2012, 87, 325-333.

Luvizzetto Faccin, D. J.; Rech, R.; Resende Secchi, A.; Medeiros Cardozo, N. S.; Záchia Ayub, M. A. Influence of oxygen transfer rate on the accumulation of poly(3-hydroxybutyrate) by *Bacillus megaterium*. *Process Biochemistry*. 2013, 48, 420-425.

## M

Macrae, R. M.; Wilkinson, J. F. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism in washed suspensions of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium*. *Journal of General Microbiology*. 1958, 19, 210–222.

Made-in-china.com (último acceso 03.05.2017)

Manganaro, J. L.; Lawal, A. CO<sub>2</sub> life-cycle assessment of the production of algae-based liquid fuel compared to crude oil to diesel. *Energy Fuels*. 2016, 30, 3130-3139.

Manna, A.; Banarjee, R.; Paul, A. K. Accumulation of poly( $\beta$ -hydroxybutyric acid) by some soil *Streptomyces*. *Current Microbiology*. 1999, 39, 153-158.

Mannina, G.; Presti, D.; Mntriel-Jarillo, G.; Suárez-Ojeda, M. E. Bioplastic recovery from wastewater: A new protocol for polyhydroxyalkanoates (PHA)

extraction from mixed microbial cultures. *Bioresource Technology*. 2019, 282, 361-369.

Mantelatto, P. E.; Sertori Durao, N. A. Process for extracting and recovering polyhydroxyalkanoates (PHAs) from cellular biomass. US 8357508 B2. Estados Unidos. 2008.

Marlina, D.; Sato, H.; Hoshina, H.; Ozaki, Y. Intermolecular interactions of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (P(HB-co-HV)) with PHB-type cristal structure and PHV-type cristal structure studied by low-frequency Raman and terahertz spectroscopies. *Polymer*. 2018, 135, 331-337.

Martin, D.P.; Williams, S. F. Medical applications of poly-4-hydroxybutyrate: a strong flexible absorbable biomaterial. *Biochemical Engineering Journal*. 2003, 16, 97–105.

Martín, M.; Grossmann, I. E. Energy optimization of lignocellulosic bioethanol production via gasification. *AIChE Journal*. 2011, 57, 3408-3428.

Martín, M.; Grossmann, I. E. Simultaneous optimization of heat integration for biodiesel production from cooking oil and algae. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2012, 51, 7998–8014.

Martín, M.; Grossmann, I. E. Optimal engineered algae composition for the integrated simultaneous production of bioethanol and biodiesel. *AIChE Journal*. 2013a, 59, 2872-2883.

Martín, M.; Grossmann, I. E. ASI: Towards the optimal integrated production of biodiesel with internal recycling of methanol produced from glycerol. *Environmental Progress & Sustainable Energy*. 2013b, 32, 891– 801.

Martín, M.; Grossmann, I. E. Design of an optimal process for enhanced production of bioethanol and biodiesel from algae oil via glycerol fermentation. *Applied Energy*. 2014a, 135, 108-114.

Martín, M.; Grossmann, I. E. Simultaneous dynamic optimization and heat integration for the co-production of diesel substitutes: biodiesel (FAME & FAEE) and glycerol ethers from algae oil. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2014b, 53, 11371-11383.

Masaeli, E.; Wieringa, P. A.; Morshed, M.; Nasr-Esfahani, M.; Sadri, S.; van Blitterswijk, C. A.; Moroni, L. Peptide functionalised polyhydroxyalkanoate nanofibrous scaffolds enhance Schwann cells activity. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2014, 10, 1559-1569.

McCarl, B. A.; Meeraus A.; van der Eijk, P.; Bussieck, M.; Dirkse, S.; Steacy, P.; Nelissen, F. McCarl GAMS User Guide, Washington, DC, USA. 2017.

Menegazzo, M. L.; Fonseca, G. G. Biomass recovery and lipid extraction processes for microalgae biofuels production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2019, 107, 87-107.

Meng, D. C.; Shen, R.; Yao, H.; Chen, J. C.; Wu, Q.; Chen, G. Q. Engineering the diversity of polyesters. *Current Opinion in Biotechnology*. 2014, 29, 24-33.

Metabolix. 2018.

<http://www.yield10bio.com/> (Último acceso 28.03.2018)

Modi, S. J. Assesing the feasibility of Poly-(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHBV) and Poly-(lactic acid) for potential food packaging applications. Tesis magister. 2010. The Ohio State University, Columbus, Ohio, Estados Unidos.

Mohapatra, S.; Maity, S.; Dash, H. R.; Das, S.; Pattnaik, S.; Rath, C. C.; Samantaray, D. *Bacillus* and biopolymer: Prospects and challenges. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 2017a, 12, 206-213.

Mohapatra, S.; Sarkar, B.; Samantaray, D. P.; Daware, A.; Maity, S.; Pattanaik, S.; Bhattacharjee, S. Bioconversion of fish solid waste into PHB using *Bacillus subtilis* based submerged fermentation process. *Environmental Technology*. 2017b, 38, 3201-3208.

Moncada, J.; El-Halwagi, M. M.; Cardona, C. A. Techno-economic analysis for a asugarcane biorefinery: Colombian case. *Bioresource Technology*. 2013, 135, 533-543.

Moncada, J.; Tamayo, J. A.; Cardona, C. A. Integrating first , second , and third generation biorefineries : Incorporating microalgae into the sugarcane biorefinery. *Chemical Engineering Science*. 2014, 118, 126–140.

Monod, J. *Recherches sur la croissance des cultures bacteriennes*. 1942 Tesis doctoral Université de Paris Pans: Hermann Et Cie.

Montazeri, M.; Karbasi, S.; Foroughi, M.; Monshi, A.; Ebrahimi-Kahrizsangi, R. Evaluation of mechanical property and bioactivity of nano-bioglass 45S5 scaffold coated with poly-3-hydroxybutyrate. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2015. 26, 1-11.

Moreno, M. S.; Andersen, F. E.; Diaz, M. S. Dynamic modeling and parameter estimation for unit operations in lignocellulosic bioethanol production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2013, 52, 4146-4160.

Moreno, P.; Yañez, C.; Medeiros Cardozo, N. S.; Escalante, H.; Combariza, M. Y.; Guzman, C. Influence of nutritional and physicochemical variables on PHB production from raw glycerol obtained from a Colombian biodiesel plant by a wild-type *Bacillus megaterium* strain. *New Biotechnology*. 2015, 32, 682-689.

Morken, J.; Sapci, Z.; Strømme, J. E. T. Modeling of biodiesel production in algae cultivation with anaerobic digestion (ACAD). *Energy Policy*. 2013, 60, 98-2015.

Mothes, G.; Schnorpfeil, C.; Ackermann, C. J. U. Production of PHB from Crude Glycerol. *Engineering in Life Science*. 2007, 7, 475-479.

Mozejko-Ciesielska, J.; Kiewisz, R. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? *Microbiological Research*. 2016, 192, 271-282.

Mozumder, M. S.; Goormachtigh, L.; García Gonzalez, L.; De Wever, H.; Volcke, E. I. Modeling pure culture heterotrophic production of polyhydroxybutyrate (PHB). *Bioresource Technology*. 2014, 155, 272-280.

Muhammadi; Shabina; Afzal, M., Hameed, S. Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: Production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications. *Green Chemistry Letters and Review*. 2015, 8, 56–77.

Mulchandani, A.; Luong, J. H. T.; Groom, C. Substrate inhibition kinetics for microbial growth and synthesis of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid by *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17697. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1989, 30, 11-17.

Muller, W. C.; Miller, F. D. Process for the hydrolysis of starch and fermentable hydrolysates obtained therefrom. US4356266A. National Distillers and chemical corp A corp of, Enquistar Chemical LP. 1982.

Murueva, A. V.; Shishatskaya, E. I.; Kuzmina, A. M.; Volova, T. G.; Sinskey, A. J. Microparticles prepared from biodegradable polyhydroxyalkanoates as matrix for encapsulation of cytostatic drug. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2013, 24, 1905-1915.

## N

Naranjo, J. M.; Posada, J. A.; Higuera, J. C.; Cardona, C. A. Valorization of glycerol through the production of biopolymers: The PHB case using *Bacillus megateirum*. *Bioresource Technology*. 2013, 133, 38-44.

Neufeld, L.; Stassen, F.; Sheppard, R.; Gilman, T. The new plastics economy: rethinking the future of plastics. *World Economic Forum*. 2016.

Ng, D. K. S.; Ng, K. S.; Ng, R. T. L. Integrated biorefineries. *Encyclopedia of Sustainable Technologies*. 2017, 299-314.

Ng, L. M.; Sudesh, K.; Identification of a new polyhydroxyalkanoate (PHA) producer *Aquitalea* sp. USM4 (JCM 19919) and characterization of its PHA synthase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2016, 122, 550-557.

Nonato, R.; Mantelatto, P.; Rosell, C. Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2001, 57, 1-5.

nova-institut.de (último acceso 26.03.2018)



Novak, M.; Koller, M.; Braunegg, G.; Horvat, P. Mathematical modelling as a tool for optimized PHA production. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. 2015, 29, 183-220.

## P

Park, S.J.; Kim, T. W.; Kim, M. K.; Lee, S. Y.; Lim, S. C. Advanced bacterial polyhydroxyalkanoates: towards a versatile and sustainable platform for unnatural tailor-made polyesters. *Biotechnology Advances*. 2012, 30, 1196-206.

Parkin, G. F.; Owen, W. F. Fundamentals of anaerobic digestion of wastewater sludges. *Journal of Environmental Engineering*. 1986, 24, 867-920.

Patwardhan, P. R.; Srivastava, A. K. Fed-batch cultivation of *Wautersia eutropha*. *Bioresource Technology*. 2008, 99, 1787-1792.

Patwardhan, P. R.; Srivastava, A. K. Model-based fed-batch cultivation of *R. eutropha* for enhanced biopolymer production. *Biochemical Engineering Journal*. 2004, 20, 21–28.

Pérez-Arauz, A. O.; Aguilar-Rabiela, A. E.; Vargas-Torres, A.; Rodríguez-Hernández, A. –I.; Chavarría-Hernández, N.; Vergara-Porras, B.; López-Cuellar, M. R. Production and characterization of biodegradable films of a novel polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesized from peanut oil. *Food Packaging and Shelf Life*. 2019, 20, 100297.

Perez Rivero, C.; Sun, C.; Theodoropoulos, K.; Webb, C. Building a predictive model for PHB production from glycerol. *Biochemical Engineering Journal*. 2016, 116, 113-121.

Pessoa, Jr, A.; Conceicao Roberto, I.; Menossi, M.; dos Santos, R.R.; Ortega Filho, S.; Vessoni Penna, T. C. Perspectives on bioenergy and biotechnology in Brazil. *Applied Biochemistry & Biotechnology*. 2005, 121-124, 59–70.

Peters, M. S.; Timmerhaus, K. D. *Plant design and economics for chemical engineers*. 1991, McGraw-Hill, New York, United States.

PHB Industrial SA. 2018.

[https:// www.biocycle.com.br/site.htm](https://www.biocycle.com.br/site.htm). (Último acceso 28.03.2018)

Philip, S.; Keshavarz, T.; Roy, I. Polyhydroxyalkanoates: Biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2007,82, 233-247.

Pinedo, J.; García Prieto, C. V.; D'alessandro, A. A.; Ibañez, R.; Tonelli, S. M.; Diaz, M. S.; Irabien, A. Microalgae biorefinery alternatives and hazard evaluation. *Chemical Engineering Research & Design*. 2016, 107, 117-125.

Pittmann, T.; Steinmetz, H. Potential for polyhydroxyalkanoate production on German or European municipal waste water treatment plants. *Bioresource Technology*. 2016, 214, 9-15.

PlasticsEurope. *Plastics – the Facts 2016. An Analysis of European Plastics Production, Demand and waste data*. 2016

Polyferm Canada. 2018.

<http://www.polyfermcanada.com/> (último acceso 01.03.18)

Poomipuk, N.; Reungsang, A.; Plangklang, P. Poly- $\beta$ -hydroxyalkanoates production from cassava starch hydrolysate by *Cupriavidus* sp. KKU38. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2014, 65, 51–64.

Porrás, M. A. Producción de Poli(hidroxialcanoato)s (PHA)s a partir de fuentes renovables de bajo costo. Tesis doctoral. 2016. Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina.

Porrás, M. A.; Cubitto, M. A.; Villar, M. A. A new way of quantifying the production of poly(hydroxyalkanoate)s using FTIR. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2016, 91, 1240-1249.

Porrás, M. A.; Vitale, C.; Villar, M. A.; Cubitto, M. A. Bioconversion of glycerol to poly(HB-co-HV) copolymer in an inexpensive medium by a *Bacillus megaterium* strain isolated from marine sediments. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2017, 5, 1-9.

Porrás, M. A.; Ramos, F. D.; Diaz, M. S.; Cubitto, M. A.; Villar, M. A. Modeling the bioconversion of starch to P(HB-co-HV) optimized by experimental design

using *Bacillus megaterium* BBST4 strain. *Environmental Technology*. 2019, 40 (9), 1185-1202.

Posada, J. A.; Naranjo, J. M.; López, J. A.; Higuera, J. C.; Cardona, C. A. Design and analysis of PHB production processes from crude glycerol. *Process Biochemistry*. 2011, 46, 310-317.

Posada, J. A.; Rincón, L. E.; Cardona, C. A. Design and analysis of biorefineries based on raw glycerol: Addressing the glycerol problema. *Bioresource Technology*. 2012, 111, 282–293.

Psycha, M.; Pyrgakis, K.; Kokossis, A. C. Process design analysis for the valorisation and selection of integrated micro-algae biorefineries. *Computer Aided Chemical Engineering*. 2014, 34, 591-596.

## Q

Quillaguaman, J.; Guzman, H.; Van-Thuoc, D.; Hatti-Kaul, D. Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: current potential and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010, 85, 1687-1696.

Quintero, J. A.; Montoya, M. I.; Sánchez, O. J.; Giraldo, O. H.; Cardona, C. A. Fuel ethanol production from sugarcane and corn: Comparative analysis for a Colombian case. *Energy*. 2008, 33, 385–399.

## R

Raheem, A.; Prinsen, P.; Vuppaladadiyam, A. K.; Zhao, M.; Luque, R. A review on sustainable microalgae based biofuel and bioenergy production: Recent developments. *Journal of Cleaner Production*. 2018, 181, 42-59.

Raje, P.; Srivastava, A. K. Updated mathematical model and fed-batch strategies for poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) production by *Alcaligenes eutrophus*. *Bioresource Technology*. 1998, 64, 185-192.

Raman, R.; Grossmann, I. E. Modelling and computational techniques for logic based integer programming. *Computers and Chemical Engineering*. 1994, 18, 563–578.

Ramírez, E. C.; Johnston, D. B.; McAloon, A. J.; Yee, W.; Singh, V. Engineering process and cost model for a conventional corn wet milling facility. *Industrial Crops and Products*. 2008 27, 91–97.

Ramírez, E. C.; Johnston, D. B.; McAloon, A. J.; Singh, V. Enzymatic corn wet milling: engineering process and cost model. *Biotechnology for Biofuels*. 2009, 2, 2.

Ramos, F. D.; Estrada, V.; Villar, M. A.; Diaz, S. D. Producción de poli( $\beta$ -hidroxibutirato) utilizando glicerol como fuente de carbono. *Revista Científica*. 2014a, 24, 71-79.

Ramos, F. D.; Estrada, V.; Diaz, S. D.; Villar, M. A. Optimización de la producción de poli( $\beta$ -hidroxibutirato) a partir de glicerol. *Iberoamerican Journal of Industrial Engineering*. 2014b, 6, 261-270.

Ramos, F. D.; Diaz, M. S.; Villar, M. A. Biocombustibles. *Ciencia Hoy*. 2016, 25, 69-73.

Ramos, F. D.; Villar, M. A.; Diaz, M. S. Optimal Design of poly(3-hydroxybutyrate) production using alternative carbon sources. *Computer Aided Chemical Engineering*. 2017, 40, 877-882.

Ramsay, J. A.; Berger, E.; Ramsay, B. A.; Chavarie, C. Recovery of poly-3-hydroxyalkanoic acid granules by a surfactant-hypochlorite treatment. *Biotechnology Techniques*. 1990, 4, 221-226.

Rathbone, S.; Furrer, P.; L€ubben, J.; Zinn, M.; Cartmell, S. Biocompatibility of polyhydroxyalkanoate as a potential material for ligament and tendon scaffold material. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2010, 93, 1391-1403.

- Ray, S.; Prajapati, V.; Patel, K.; Trivedi, U. Optimization and characterization of PHA from isolate *Pannonibacter phragmitetus* ERC8 using glycerol waste. *International Journal of Biology and Macromolecules*. 2016, 86, 741-749.
- Razza, Z. A.; Abid, S.; Banat, I. M. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2018, 126, 45-56.
- Reddy, S. V.; Thirumala, M.; Mahmood, S. K. Production of PHB and P(3HB-co-3HV) biopolymers by *Bacillus megaterium* strain OU303A isolated from municipal sewage sludge. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2009, 25, 391–397.
- Reddy, M. M.; Vivekanandhan, S.; Misra, M.; Bhatia, S. K.; Mohanty, A. K. Biobased plastics and bionanocomposites: current status and future opportunities. *Progress in Polymer Science*. 2013, 38, 1653-1689.
- Rehm, B. H. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochemical Journal*. 2003, 376, 15–33.
- Reusch, R. N. Transmembrane ion transport by polyphosphate/poly-(R)-3-hydroxybutyrate complexes. *Biochemistry*. 2000, 65, 280-295.
- Rhim, J.; Park, H.; Ha, C. 2013. Bio-nanocomposites for food packaging applications. *Progress in Polymer Science*, 2013, 38, 1629-1652.
- Rincón, L. E.; Becerra, L. A.; Moncada, J. Cardona, C. A. Techno-economic analysis of the use of fired cogeneration systems based on sugar cane bagasse in south eastern and mid-western regions of Mexico. *Waste and Biomass Valorization*. 2014, 5, 189–198.
- Riss, V.; Mai, E. W. Gas chromatographic determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. *Journal of Chromatography*. 1988, 445, 285-289.
- Rizwan, M.; Lee, J. H.; Gani, R. Optimal processing pathway for the production of biodiesel from microalgal biomass: A superstructure based approach. *Computers and Chemical Engineering*. 2013, 58, 305-314.

Rizwan, M.; Lee, J. H.; Gani, R. Optimal design of microalgae-based biorefinery: Economics, opportunities and challenges. *Applied Energy*. 2015a, 150, 69-79.

Rizwan, M.; Zaman, M.; Lee, J. H.; Gani, R. Optimal processing pathway selection for microalgae-based biorefinery under uncertainty. *Computers and Chemical Engineering*. 2015b, 82, 362-373.

Rodriguez Reartes, S. B.; Estrada, V.; Bazán, R.; Larrosa, N.; Cossavella, A.; López, A.; Busso, F.; Diaz, M. S. Evaluation of ecological effects of anthropogenic nutrient loading scenarios in Los Molinos reservoir through a mathematical model. *Ecological Modelling*. 2016, 320, 393-406.

Rodriguez-Perez, S.; Serrano, A.; Pantión, A. A.; Alonso-Farriñas, B. Challenges of scaling-up PHA production from waste streams. A review. *Journal of Environmental Management*. 2018, 205, 215-230.

Rojas Fernández, E.; Hoyos Concha, J. L.; Mosquera Sánchez, S. A. Producción de polihidroxialcanoatos (PHAs) a partir de *Ralstonia eutropha*, en un medio con harina de yuca como fuente de carbono. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*. 2016, 14, 19-26.

Romo-Urbe, A.; Meneses Acosta, A.; Dominguez Díaz, M. Viability of HEK 293 cells on poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) biosynthesized from a mutant *Azotobacter vinelandii* strain. Cast film and electrospun scaffolds. *Materials Science & Engineering C*. 2017, 81, 236-246.

Rossell, C. E. V.; Mantelatto, P. E.; Agnelli, J. A. M.; Nascimento, J. Sugar based biorefinery- Technology for integrated production of poly(3-hydroxybutyrate), sugar and ethanol. IN: Kamm, B.; Gruber, P. R.; Kamm, M. (eds.), *Biorefineries- Industrial processes and products: status quo and future directions*. Wiley VCH, Weinheim, Alemania. 2010.

**S**

Sabol, A. M.; Bertran, M. O.; Raftery, J. P.; Woodley, J. M.; Gani, R.; Karim, M. N. Separation and recovery of intracelular  $\beta$ -carotene using a process synthesis framework. *Computer Aided Chemical Engineering*. 2017, 40, 2851-2856.

Sahinidis, N. V. BARON 14.4.0: global optimization of mixed-integer nonlinear programs. User's manual. 2014.

Salgaonkar, B. B.; Bragança, J. M. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Halogeometricum borinquense* strain E3. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2015, 78, 339-346.

Sanchez-Garcia, M. D.; Lopez-Rubio, A.; Lagaron, J. M. Natural micro and nanobiocomposites with enhanced barrier properties and novel functionalities for food biopackaging applications. *Trends in Food Science & Technology*. 2010, 21, 528-536.

Sander, K.; Murthy, G. S. Life cycle analysis of algae biodiesel. *International Journal of Life Cycle Assessment*. 2010, 15, 704-714.

Santibañez-Aguilar, J. E.; González-Campos, J. B.; Ponce-Ortega, J. M.; Serna-González, M.; El-Halwagi, M. M. Optimal planning and site selection for distributed multiproduct biorefineries involving economic, environmental and social objectives. *Journal of Cleaner Production*. 2014, 65, 270-294.

Sawant, S. S.; Khadamkar, H. P.; Mathpati, C. S.; Pandit, R.; Lali, A. M. Computational and experimental studies of high depth algal raceway pond photo-bioreactor. *Renewable Energy*. 2018, 118, 152-159.

Severson, K.; Martin, M.; Grossmann, I. E. Optimal production of biodiesel using bioethanol. *AIChE Journal*. 2012, 59, 834–844.

Shahhosseini, S. Simulation and optimisation of PHB production in fed-batch culture of *Ralstonia eutropha*. *Process Biochemistry*. 2004, 39, 963–969.

Shahid, S.; Mosrati, R.; Ledauphin, J.; Amiel, C.; Fontaine, P.; Gaillard, J. -L.; Corroler, D. Impact of carbon source and variable nitrogen conditions on bacterial biosynthesis of polyhydroxyalkanoates: Evidence of an atypical metabolism in *Bacillus megaterium* DSM 509. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2013, 116, 302-308.

Sheu, D.-S.; Chen, W.-M.; Yang, Jr.-Y.; Chang, R.-C. Thermophilic bacterium *Caldimonas taiwanensis* produces poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from starch and valerate as carbon sources. *Enzyme and Microbial Technology*. 2009, 44, 289–294.

Shishatskaya, E.I.; Nikolaeva, E.D.; Vinogradova, O.N.; Volova, T.G. Experimental wound dressings of degradable PHA for skin defect repair. *Journal of Material Science: Materials in Medicine*. 2016, 27, 165.

Singh, J.; Gu, S. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2010, 14, 2596-2610.

Slater, S. C.; Voige, W. H.; Dennis, D. E. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes-eutrophus* H16 poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthesis-pathway. *Journal of Bacteriology*. 1988, 170, 4431-4436.

Smock, D. Meredian Christens world's largest PHA bioplastic plant. *Molding Blog*. 2012.

Sodian, R.; Hoerstrup, S. P.; Sperling, J. S.; Daebritz, S. H.; Martin, D. P.; Schoen, F.J.; Vacanti, J. P.; Mayer Jr. J. E. Tissue engineering of heart valves: in vitro experiences. *The Annals of Thoracic Surgery*. 2000, 70, 140-144

Somashekara, D. M.; Rasgotogi, N. K.; Ramachandriah, S. T. A simple kinetic model for growth and biosynthesis of polyhydroxyalkanoate in *Bacillus flexus*. *New Biotechnology*. 2009, 26, 92-98.

Špoljarić, I. V.; Lopar, M.; Koller, M.; Muhr, A.; Salerno, A.; Reiterer, A.; Horvat, P. In silico optimization and low structured kinetic model of poly ((R)-3-hydroxybutyrate) synthesis by *Cupriavidus necator* DSM 545 by fed-batch cultivation on glycerol. *Journal of Biotechnology*. 2013a, 168, 625-635.



Špoljarić, I. V.; Lopar, M.; Koller, M.; Muhr, A.; Salerno, A.; Reiterer, A.; Malli, K.; Angerer, H.; Strohmeier, K.; Schober, S.; Mittelbach, M. Horvat, P. Mathematical modeling of poly((R)-3-hydroxybutyrate) synthesis by *Cupriavidus necator* DSM 545 on substrates stemming from biodiesel production. *Bioresource Technology*. 2013b, 133, 482-494.

Squio, C. R.; Aragão, G. M. F. Estratégias de cultivo para produção dos plásticos biodegradáveis poli(3-Hidroxibutirato) e poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) por bacterias. *Química Nova*. 2004, 27, 615–622.

Sridewi, N.; Lee, Y.; Sudesh, K. Simultaneous adsorption and photocatalytic degradation of malachite green using electrospun P(3HB)-TiO<sub>2</sub> nanocomposite fibers and films. *International Journal of Photoenergy*. 2011, 1-10.

Stats.bls.gov (último acceso 25.8.2017)

Steinbüchel, A.; Valentin, H. E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbial Letters*. 1995, 128, 219- 228.

Stephanopoulos, G. N., Aristidou, A. A., Nielsen, J., 1998. *Metabolic Engineering. Principles and methodologies*. Academic Press, San Diego.

Stephens, E.; Ross, I. L.; King, Z.; Mussgnug, J. H.; Kruse, O.; Posten, C.; Borowitzka, M. A.; Hankamer, B. An economic and technical evaluation of microalgal biofuels. *Nature Biotechnology*. 2010, 28, 126-128.

Strømme, J. Modeling a biorefinery – An ecotechnological approach to energy production using microalgae and anaerobic digestion. MSc Dissertation, Department of Mathematical Science and Technology, Norwegian University of Life Sciences. 2010.

Sudesh, K.; Bhubalan, K.; Chuah, J.; Kek, Y.; Kamilah, H.; Sridewi, N.; Lee, Y. Synthesis of polyhydroxyalkanoate from palm oil and some new applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011, 89, 1373-1386.

Sudesh, K.; Loo, C.; Goh, L.; Iwata, T.; Maeda, M. The oil-absorbing property of polyhydroxyalkanoate films and its practical application: a refreshing new

outlook for an old degrading material. *Macromolecular Bioscience*. 2007, 7, 1199-1205.

Sugaronline.com (último acceso 16.5.2017)

Sun, S.; Liu, P.; Ji, N.; Hou, H.; Dong, H. Effects of low polyhydroxyalkanoate content on the properties of films based on modified starch acquired by extrusion blowing. *Food Hydrocolloids*. 2017, 72, 81-89.

Swinnen, I. A. M.; Bernaerts, K.; Dens, E. J. J.; Geeraerd, A. H.; Van Impe, J. F. Predictive modelling of the microbially lag phase: a review. *International Journal of Food Microbiology*. 2004, 94, 137-159.

## T

Tamer, I. M.; Moo-Young, M.; Chisti, Y. Optimization of poly( $\beta$ -hydroxybutyric acid) recovery from *Alcaligenes latus*: Combined mechanical and chemical treatments. *Bioprocess Engineering*. 1998, 19, 459–468.

Tan, G. -Y. A.; Chen, C. -L.; Ge, L.; Li, L.; Wang, L.; Zhao, L.; Mo, Y.; Tan, S. N.; Wang, J. -Y. Enhanced gas chromatography–mass spectrometry method for bacterial polyhydroxyalkanoates analysis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2014, 117, 379-382.

Tan, X. J.; Yin, J.; Chen, G. -Q. Production of Polyhydroxyalkanoates. IN: Pandey, A.; Negi, S.; Soccol, C. R. (Eds.), *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products*. 2017, 655-692.

Tănase, E. E.; Popa, M. E.; Rapă, M.; Popa, O. PHB/Cellulose fibers based materials: physical, mechanical and barrier properties. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*. 2015, 6, 608-615.

Tao, J.; Song, C.; Cao, M.; Hu, D.; Liu, L.; Wang, S. Thermal properties and degradability of poly(propylene carbonate)/ poly( $\beta$ -hydroxybutyrate-co- $\beta$ -hydroxyvalerate) (PPC/PHBV) blends. *Polymer Degradation and Stability*. 2009, 94, 575-583.

Tapasvi, D.; Wiesenborn, D.; Gustafson, C. Process model for biodiesel production from various feedstocks. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*. 2005, 48, 2215-2221.

Thaitapiocastarch.org (último acceso 18.05.2017)

Tawarmalani, M.; Sahinidis, N. V. A polyhedral branch and cut approach to global optimization. *Mathematical Programming*. 2005, 103, 225-249.

Ten, E.; Jiang, L.; Zhang, J.; Wolcott, M. P. Mechanical performance of polyhydroxyalkanoate (PHA)-based biocomposites. *Biocomposites: design and mechanical performance*. 2015, 39-52.

Tepha, 2017.

<http://www.tepha.com/products/monofilament-suture/> (último acceso 26.03.2018)

Thiré, R. M. da S. M.; Arruda, L. C.; Barreto, L. S. Morphology and Thermal Properties of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/ Attapulгите Nanocomposites. *Materials Research*. 2011, 14.

Thirumala, M.; Reddy, S. V.; Mahmood, S. K. Production and characterization of PHB from two novel strains of *Bacillus* spp. Isolated from soil and activated sludge. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2010, 37, 271-278.

Thinkkentucky.com (último acceso 27.02.2017)

Thomson, R. C.; Moore, C. J.; Vom Saal, F. S.; Swan, S. H. Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. *Philosophical Transactions of the Royal Society: Biological Sciences*. 2009, 364, 2153-2166.

Tian, J.; Sinskey, A. J.; Stubbe, J. Kinetic studies of polyhydroxybutyrate granule formation in *Waustersia eutropha* H16 by transmission electron microscopy. *Journal of Bacteriology*. 2005, 187, 3814-3824.

TianAn. 2018.

<http://www.tianan-enmat.com/> (Último acceso 28.03.2018)

Tianjin GreenBio Materials. 2018.

<http://www.tjgreenbio.com/en/newsText.aspx?nid=99> (último acceso 26.03.18).

Tripathi, A. D.; Yadav, A.; Jha, A.; Srivastava, S. K. Utilizing of sugar refinery waste (cane molasses) for production of bio-plastic under submerged fermentation process. *Journal of Polymers and the Environment*. 2012, 20, 446–453.

Turkay, M.; Grossmann, I. E. Logic-based MINLP algorithms for the optimal synthesis of process networks. *Computers & Chemical Engineering*. 1996, 20, 959–978.

## U

Ubando, A. T.; Culaba, A. B.; Aviso, K. B.; Tan, R. R.; Cuello, J. L.; Ng, D. K. S.; El-Halwagi, M. M. Fuzzy mixed integer non-linear programming model for the design of an algae-based eco-industrial park with prospective selection of support tenants under product price variability. *Journal of Cleaner Production*. 2016, 136, 183-196.

Ulrich, G. D.; Vasudevan, P. T. *Chemical engineering process design and economics: A practical guide*. 2004, Process Publishing, Durham, New Hampshire, Estados Unidos.

Urtuvia, V.; Villegas, P.; Gonzalez, M.; Seeger, M. Bacterial production of the biodegradable plastics polyhydroxyalkanoates. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2014, 70, 208-213.

## V

Valappil, S. P.; Boccaccini, A. R.; Bucke, C.; Roy, I. Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. *Antoine van Leeuwenhoek*. 2007a, 91, 1-17.

Valappil, S. P.; Misra, S. K.; Boccaccini, A. R.; Keshavarz, T.; Bucke, C.; Roy, I. Large-scale production and efficient recovery of PHB with desirable material

properties, from the newly characterised *Bacillus cereus* SPV. *Journal of Biotechnology*. 2007b, 132, 251-258.

Van der Veen, M. E.; Veelaert, S.; Van der Goot, A. J.; Boom, R. M. Starch hydrolysis under low water conditions: A conceptual process design. *Journal of Food Engineering*. 2006, 75, 178–186.

Vecchiotti, A.; Grossmann, I. E. Modeling issues and implementation of language for disjunctive programming. *Computers & Chemical Engineering*. 2000, 24, 2143–2155.

Vecchiotti, A.; Lee, S.; Grossmann, I. E. Modeling of discrete/continuous optimization problems: characterization and formulation of disjunctions and their relaxations. *Computers & Chemical Engineering*. 2003, 27, 433-448.

Verwoert, I. .; Verbree, E. C.; van der Linden, K. H.; Nijkamp, H. J.; Stuitje, A. R. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Escherichia coli* fabD gene, encoding malonyl coenzyme A-acyl carrier protein transacylase. *Journal of Bacteriology*. 1992, 174, 2851-2857.

## W

Wächter, A.; Biegler, L. T. On the implementation of an interior-point filter line-search algorithm for large-scale nonlinear programming. *Mathematical Programming*. 2006, 106, 25–57.

Walas, S. M. *Chemical process equipment: selection and design*. Butterworth-Heinemann, Boston, Estados Unidos. 1990.

Wallen, L. L.; Rohwedder, W. K. Poly- $\beta$ -hydroxyalkanoate from activated sludge. *Environmental Science & Technology*. 1974, 8, 576–579.

Walsem, J. V.; Zhong, L.; Shih, S. S. *Polymer extraction methods*. US 7252980 B2. United States. 2007.

Wang, H. -H.; Zhou, X. -R.; Liu, Q.; Chen, G. -Q. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate homopolymers by *Pseudomonas putida*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011, 89, 1497-1507.

Wang, L.; Du, J.; Cao, D.; Wang, Y. Recent Advances and the Application of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) as tissue Engineering Materials. *Journal of Macromolecules Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*. 2013, 50, 885-893.

Wang, G.; Tang, W.; Xia, J.; Chu, J.; Noorman, H.; van Gulik, W. M. Integration of microbial kinetics and fluid dynamics toward model-driven scale-up of industrial bioprocesses. *Engineering in Life Sciences*. 2015, 15, 20-29.

Wellen, R. M. R.; Rabello, M. S.; Fachine, G. J. M.; Canedo, E. L. The meltin behaviour of poly(3-hydroxybutyrate) by DSC. Reproducibility study. *Polymer Testing*. 2013, 32, 215-220.

Williams, S. F.; Martin, D. P.; Horowitz, D. M.; Peoples, O. P. 1999. PHA applications: addressing the price performance issue: I. Tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1999, 25, 111-121.

Willmott, C. J. On the validation of models. *Physical geography*. 1981, 2, 184-194.

Witholt, B.; Kessler, B. Review – perspectives of medium chain length poly(hydroxyalkanoates), a versatile set of bacterial bioplastics. *Current Opinion on Biotechnology*. 1999, 10, 279–285.

Woiciechowski, A. L.; Nitsche S.; Pandey, A.; Soccol, C. R. Acid and enzymatic hydrolysis to recover reducing sugars from cassava bagasse: An economic study. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2002, 45, 393-400.

Wu, Q.; Huang H.; Hu, G.; Chen J.; Ho, K. P.; Chen, G. Q. Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus* sp. JMa5 cultivated in molasses media. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2001, 80,111–118.

Wu, Q.; Wang, Y.; Chen, G. Q. Medical application of microbial biopolyesters polyhydroxyalkanoates. *Artificial Cells, Blood Substitutes*. 2009, 37, 1-12.

Wu, X. F.; Chen, G. Q. Global primary energy use associated with production, consumption and international trade. *Energy Policy*. 2017, 111, 85-94.

**X**

Xu, J., Guo, B. H., Yang, R., Wu, Q., Chen, G. Q., Zhang, Z. M. In situ FTIR study on melting and crystallization of polyhydroxyalkanoates. *Polymer*. 2002, 43, 6893- 6899.

**Y**

Yan, Y.; Li, X.; Wang, G.; Gui, X.; Li, G.; Su, F.; Wang, X.; Liu, T. Biotechnological preparation of biodiesel and its high-valued derivatives: a review. *Applied Energy*. 2014a, 113, 1614-1631.

Yan, C.; Zhang, L.; Luo, X.; Zheng, Z. Influence of influent methane concentration on biogas upgrading and biogas slurry purification under various LED (light-emitting diode) light wavelengths using *Chlorella* sp. *Energy*. 2014b, 69, 419-426.

Yazdani, S. S.; Gonzalez, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Current Opinion in Biotechnology*. 2007, 18, 213-219.

Yen, H. W.; Brune, D. E. Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane. *Bioresource Technology*. 2007, 98, 130-134.

Yeomans, H. and Grossmann, I. E. A systematic modeling framework of superstructure optimization in process synthesis. *Computers and Chemical Engineering*. 1999, 23, 709–731.

Yilmaz, H., Soran, H. and Beyatli, Y. Determination of poly-b-hydroxybutyrate (PHB) production by some *Bacillus* spp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2005, 21, 565–566.

Yuan, Z.; Chen, B.; Gani, R. Applications of process synthesis: Moving from conventional chemical processes towards biorefinery processes. *Computers & Chemical Engineering*. 2013, 49, 217–229.

Yüksekdağ, Z. N.; Aslim, B.; Beyatli, Y.; Mercan, N. Effect of carbon and nitrogen sources and incubation times on poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) synthesis by *Bacillus subtilis* 25 and *Bacillus megaterium* 12. African Journal of Biotechnology. 2004, 3, 63-66.

## Z

Zafar, M., Kumar, S., Kumar, S., Dhiman, A.K. Artificial intelligence based modeling and optimization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production process by using *Azohydromonas lata* MTCC 2311 from cane molasses supplemented with volatile fatty acids: a genetic algorithm paradigm. Bioresource Technology. 2012, 104, 631-641.

Zavala, V. M.; Biegler, L. T. Large-scale parameter estimation in low-density polyethylene tubular reactors. Computers & Chemical Engineering. 2006, 45, 7867-7881.

Zavala, V. M.; Laird, C. D.; Biegler, L. T. Interior-point decomposition approaches for parallel solution of large-scale nonlinear parameter estimation problems. Chemical Engineering Science. 2008, 63, 4834-4845.

Zhang, F.; Zhang, Y.; Chen, Y.; Dai, K.; van Loosdrecht, M. C. M.; Zeng, R. J. Simultaneous production of acetate and methane from glycerol by selective enrichment of hydrogenotrophic methanogens in extreme-thermophilic (70 °C) mixed culture fermentation. Applied Energy. 2015, 148, 326-333.

Zhang, J.; Shishatskaya, E. I.; Volova, T. G.; Ferreira da Silva, L.; Chen, G. Q. Polyhydroxyalkanoates (PHA) for therapeutic applications. Materials Science & Engineering C. 2018, 86, 144-150.

Zhang, X.; Luo, R.; Wang, Z.; Deng, Y.; Chen, G. Application of (R)-3-hydroxyalkanoate methyl esters derived from microbial polyhydroxyalkanoates as novel biofuels. Biomacromolecules. 2009, 10, 707-711.

Zhong, C.; Jiang, A.; Huang, W.; Qi, X.; Cao, G. Studies on the acid-production characteristics of *Bacillus megaterium* strain P17. AIP Conference Proceedings, 2017, 1839, 020054.



## ANEXO A

En el presente Anexo se muestran las curvas de calibrados realizadas para cada uno de los métodos analíticos empleados para cuantificar las concentraciones de las principales variables del proceso biotecnológico exhibido en el Capítulo 2 de esta tesis.

### A.1. Métodos analíticos

#### A.1.1. Determinación de la biomasa

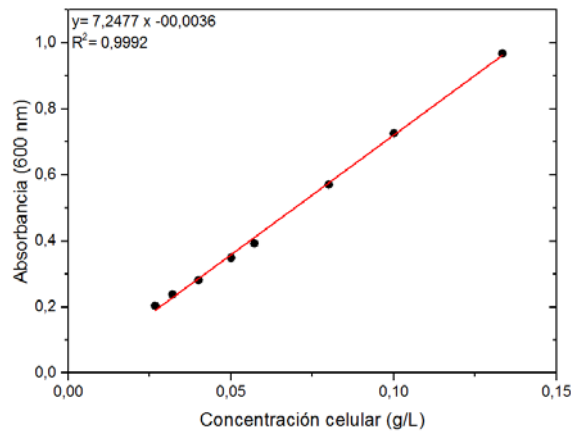


Figura A.1. Curva de calibrado para la determinación de la biomasa.

#### A.1.2. Determinación del biopolímero

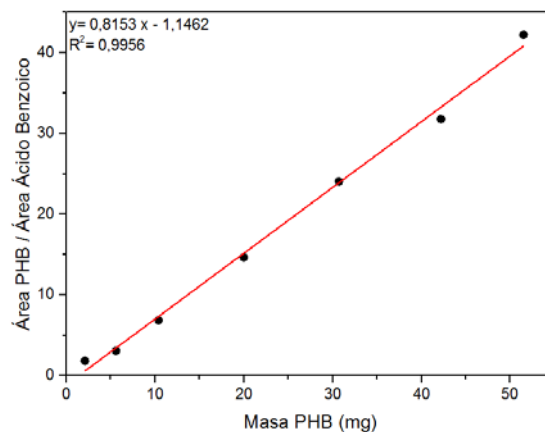


Figura A.2. Curva de calibrado para la determinación de PHB.

### A.1.3. Determinación de glicerol

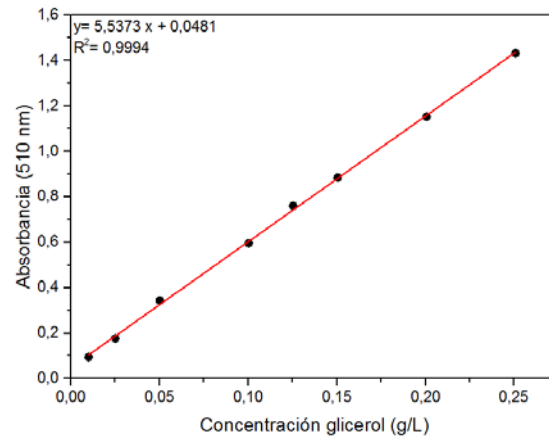


Figura A.3. Curva de calibrado para la determinación del glicerol.

### A.1.4. Determinación de urea

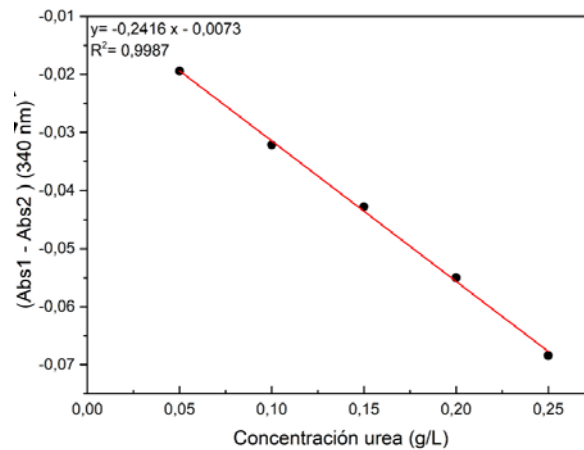


Figura A.4. Curva de calibrado para la determinación de urea.

### A.1.5. Determinación de fósforo

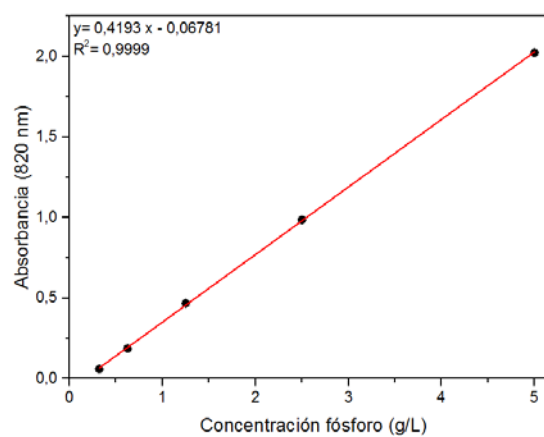


Figura A.5. Curva de calibrado para la determinación de fósforo.

## ANEXO B

En este Anexo se presentan de manera detallada los balances de masa, de energía y las correlaciones empleadas en el cálculo de los aspectos del modelo formulado en el Capítulo 5 de la presente tesis.

### B.1. Balances de masa

A continuación, se describen los balances de masa planteados en cada uno de los sectores de producción de PHA, asimismo, se reportan los parámetros utilizados en dichos balances para cada una de las distintas alternativas tecnológicas propuestas en la superestructura que se presenta en la Figuras 5.2, 5.3 y 5.4.

#### B.1.1. Pretratamiento de las materias primas

##### B.1.1.1. Materia prima: Glicerol crudo

La corriente de glicerol crudo (*glics*) puede purificarse o emplearse directamente como fuente de carbono sin ser purificado.

$$y_1 \cdot f_{DU1,j}^{glics} = y_8 \cdot f_{FL1,j}^{DU1} + y_9 \cdot f_{ST1,j}^{DU1} \quad (B.1)$$

$$\forall j \in \{agu, cen, glic, jab, met, moxs\}$$

##### Flash 1 (FL1)

El balance de masa en el flash asegura que la suma de los componentes que ingresan desde la unidad ficticia (*DU1*) igualan a la suma de las especies en las corrientes ricas en metanol ( $f_{DS1,j}^{FL1}$ ) y glicerol ( $f_{RC1,j}^{FL1}$ ).

$$f_{FL1,j}^{DU1} = f_{DS1,j}^{FL1} + f_{RC1,j}^{FL1} \quad (B.2)$$

$$\forall j \in \{agu, cen, glic, jab, met, moxs\}$$

El flujo que ingresa a la columna de destilación se determina como función de un parámetro de separación de cada uno de los componentes ( $P_j^{FL1}$ ) calculado en Hysys (2013) para una temperatura de 120 °C.

$$f_{DS1,j}^{FL1} = P_j^{FL1} \cdot f_{FL1,j}^{DU1} \quad (B.3)$$

$$\forall j \in \{agu, cen, glic, jab, met, moxs\}$$

### Columna de destilación (DS1)

El balance de masa sobre la columna de destilación asegura que la corriente de entrada de los componentes es igual a lo que sale por tope ( $f_{mets,j}^{DS1}$ ) más lo que se obtiene por debajo de la misma ( $f_{wst1,j}^{DS1}$ ).

$$f_{DS1,j}^{FL1} = f_{mets,j}^{DS1} + f_{wst1,j}^{DS1} \quad (B.4)$$

$$\forall j \in \{agu, met\}$$

La cantidad metanol extraída por el tope de la columna de destilación  $DS1$  viene dada por la pureza deseada del mismo ( $P_{met}^{DS1}$ ). Para ello se plantea la siguiente ecuación.

$$f_{mets,met}^{DS1} = P_{met}^{DS1} \cdot \sum_j f_{mets,j}^{DS1} \quad (B.5)$$

$$\forall j \in \{agu, met\}$$

### Reactor de neutralización (RC1)

La corriente de salida del reactor de neutralización  $RC1$  es igual a la suma de los caudales de entrada más/menos lo que se genera/consume en el interior del mismo.

$$f_{RC1,j}^{FL1} + f_{RC1,j}^{hcls1} + R_j^{RC1} \cdot (f_{RC1,j}^{FL1} + f_{RC1,j}^{hcls1}) = f_{CN1,j}^{RC1} \quad (B.6)$$

$$\forall j \in \{agu, cen, glic, hcl, jab, moxs\}$$

$$f_{RC1,j}^{FL1} + f_{RC1,j}^{hcls1} + R_j^{RC1} \cdot (f_{RC1,moxs}^{FL1} + f_{RC1,moxs}^{hcls1}) = f_{CN1,j}^{RC1} \quad (B.7)$$

$$\forall j \in \{ffa, met, nacl\}$$

La cantidad de HCL al 33 % en peso (Posada *et al.*, 2011) que ingresa al reactor es función de la cantidad de glicerol como se muestra a continuación.

$$\sum_j f_{RC1,j}^{hcls1} = Q_{RC1}^{hcls1} \cdot f_{RC1,glic}^{FL1} \quad (B.8)$$

$$\forall j \in \{agu, hcl\}$$

$$f_{RC1,j}^{hcls1} = Q_j^{hcls1} \cdot \sum_j f_{RC1,j}^{hcls1} \quad (B.9)$$

$$\forall j \in \{agu, hcl\}$$

### Centrífuga (CN1)

El balance de masa en la centrífuga CN1 asegura que el caudal másico proveniente del reactor de neutralización es igual a la suma de la corriente que se dirige al decantador y una corriente de desperdicios.

$$f_{CN1,j}^{RC1} = f_{DC1,j}^{CN1} + f_{wst2,j}^{CN1} \quad (B.10)$$

$$\forall j \in \{agu, cen, ffa, glic, hcl, met, nacl\}$$

Los componentes que se extraen como desperdicio en la centrífuga se calculan a partir de la siguiente ecuación.

$$f_{wst2,j}^{CN1} = P_j^{CN1} \cdot f_{CN1,j}^{RC1} \quad (B.11)$$

$$\forall j \in \{cen, nacl\}$$

### Decantador (DC1)

El caudal proveniente de la centrífuga CN1 y el agua de lavado que ingresan al decantador es igual a lo que se envía al flash y lo que se retira como desperdicio.

$$f_{DC1,j}^{CN1} + f_{DC1,j}^{h2os1} = f_{FL2,j}^{DC1} + f_{wst3,j}^{DC1} \quad (B.12)$$

$$\forall j \in \{agu, ffa, glic, hcl, met\}$$

El caudal de agua para lavado que ingresa al decantador DC1 viene dado como función de la cantidad de glicerol.

$$f_{DC1,agu}^{h2os1} = Q_{agu}^{CN1} \cdot f_{DC1,glic}^{CN1} \quad (B.13)$$

La corriente de componentes que se retiran del proceso luego del lavado se calcula con la siguiente ecuación.

$$f_{wst3,j}^{DC1} = P_j^{DC1} \cdot f_{DC1,j}^{CN1} \quad (B.14)$$

$$\forall j \in \{ffa, hcl, \}$$

### Flash (FL2)

El balance de masa en el flash *FL2* asegura que la suma de los componentes que ingresan desde el decantador *DC1* igualan a la suma de las especies que se van por tope y fondo.

$$f_{FL2,j}^{DC1} = f_{wst4,j}^{FL2} + f_{DS2,j}^{FL2} \quad (B.15)$$

$$\forall j \in \{agu, glic, met\}$$

El flujo que ingresa a la columna de destilación se determina como función de un parámetro de separación de cada uno de los componentes ( $P_j^{FL2}$ ) calculado en Hysys (2013) para una temperatura de 111 °C.

$$f_{DS2,j}^{FL2} = P_j^{FL2} \cdot f_{FL2,j}^{DC1} \quad (B.16)$$

$$\forall j \in \{agu, glic, met\}$$

### Columna de destilación (DS2)

El balance de masa sobre la columna de destilación *DS2* asegura que la corriente de entrada de los componentes es igual a lo que sale por tope más lo que se envía a venta o alternativamente se utiliza como fuente de carbono para la biosíntesis de PHA.

$$f_{DS2,j}^{FL2} = f_{wst5,j}^{DS2} + f_{DU2,j}^{DS2} \quad (B.17)$$

$$\forall j \in \{agu, glic, met\}$$

La cantidad glicerol extraída por el fondo de la columna de destilación viene dada por la pureza deseada del mismo ( $P_{glic}^{DS2}$ ). Para ello se plantea la siguiente ecuación.

$$f_{DU2,glic}^{DS2} = P_{glic}^{DS2} \cdot \sum_j f_{DU,j}^{DS1} \quad (B.18)$$

$$\forall j \in \{agu, glic, met\}$$

En este punto del proceso de purificación de glicerol se plantea la alternativa de vender el glicerol purificado ( $f_{glips,j}^{DU2}$ ) o utilizarlo como sustrato para el crecimiento de los microorganismos y la producción de biopolímero ( $f_{ST1,j}^{DU2}$ ). Esto se representa mediante la siguiente ecuación.

$$f_{DU2,j}^{DS2} = y_{10} \cdot f_{glips,j}^{DU2} + y_{11} \cdot f_{ST1,j}^{DU2} \quad (B.19)$$

$$\forall j \in \{agu, glic\}$$

En la Tabla B.1 se muestran los parámetros utilizados en los balances de masa detallados para el sector de purificación de glicerol crudo.

**Tabla B.1.** Parámetros de balance de masa del sector de purificación de glicerol crudo.

Parámetro	Valor	Unidades	Referencia
$P_{agu}^{FL1}$	0,916	-	Hysys (2013)
$P_{met}^{FL1}$	0,7681	-	Hysys (2013)
$P_{met}^{DS1}$	0,917	kg met/kg tot	Posada <i>et al.</i> (2011)
$R_{hcl}^{RC1}$	-0,4142	-	Lourneco <i>et al.</i> (2011)
$R_{jab}^{RC1}$	-1	-	Lourneco <i>et al.</i> (2011)
$R_{moxs}^{RC1}$	-1	-	Lourneco <i>et al.</i> (2011)
$R_{ffa}^{RC1}$	0,3279	-	Lourneco <i>et al.</i> (2011)
$R_{met}^{RC1}$	0,5926	-	Lourneco <i>et al.</i> (2011)
$R_{nacl}^{RC1}$	1,1474	-	Lourneco <i>et al.</i> (2011)

$Q_{RC1}^{hcls1}$	0,355	kg ácido/kg glic	Lourneco et al. (2011)
$Q_{agu}^{hcls1}$	0,69	kg agu/kg ácido	Posada et al. (2011)
$Q_{hcl}^{hcls1}$	0,31	kg hcl/kg ácido	Posada et al. (2011)
$P_{cenz}^{CN1}$	1	-	N/A
$P_{nacl}^{CN1}$	1	-	N/A
$Q_{agu}^{CN1}$	2,4	kg agu/kg glic	Posada et al. (2011)
$P_{ffa}^{DC1}$	1	-	N/A
$P_{hcl}^{DC1}$	1	-	N/A
$P_{agu}^{FL2}$	0,2009	-	Hysys (2013)
$P_{glic}^{FL2}$	0,9991	-	Hysys (2013)
$P_{met}^{FL2}$	0,04	-	Hysys (2013)
$P_{glic}^{DS2}$	0,98	kg glic/kg tot	Posada et al. (2011)

### B.1.1.2. Materia prima: Almidón

#### Cinta transportadora (CT)

El grano de maíz es transportado mediante cintas transportadoras hasta la sección de remojo. Las pérdidas de material se consideran mediante las siguientes ecuaciones.

$$y_2 \cdot f_{CT,j}^{mzs} = f_{TK1,j}^{CT} + f_{wst6,j}^{CT} \quad (B.20)$$

$$\forall j \in \{agu, amd, cenz, fbr, lpd, prt\}$$

$$f_{wst6,j}^{CT} = P^{CT} \cdot f_{CT,j}^{mzs} \quad (B.21)$$

$$\forall j \in \{agu, amd, cenz, fbr, lpd, prt\}$$



Tanque de remojo (TK1)

La corriente de salida del tanque de remojo es igual a la suma de la corriente proveniente de la cinta transportadora y el caudal de agua que ingresa al mismo.

$$f_{TK1,j}^{CT} + f_{TK1,agu}^{h2os2} = f_{ML1,j}^{TK1} \quad (B.22)$$

$$\forall j \in \{agu, amd, cenz, fbr, lpd, prt\}$$

La cantidad de agua que ingresa al tanque de remojo se calcula a partir de la siguiente ecuación.

$$f_{TK1,agu}^{CT} + f_{TK1,agu}^{h2os2} = P^{TK1} \cdot \sum_j f_{TK1,j}^{CT} \quad (B.23)$$

$$\forall j \in \{agu, amd, cenz, fbr, lpd, prt\}$$

Malla 1 (ML1)

El balance de especies en la malla indica que la suma de los componentes que ingresan es igual a la suma de los componentes que se envían al evaporador más los componentes que se dirigen a la sección de extracción del germen.

$$f_{ML1,j}^{TK1} = f_{FL3,j}^{ML1} + f_{MO1,j}^{ML1} \quad (B.24)$$

$$\forall j \in \{agu, amd, cenz, fbr, lpd, prt\}$$

La cantidad de los componentes que se separan para formar aguas abajo del proceso el gluten feed se determinan mediante un factor de separación como se indica a continuación.

$$f_{FL3,j}^{ML1} = P_j^{ML1} \cdot f_{ML1,j}^{TK1} \quad (B.25)$$

$$\forall j \in \{agu, amd, prt\}$$

Evaporador (FL3)

El balance de masa en el evaporador flash asegura que la suma de los componentes que ingresan desde el tanque de remojo iguala a la suma de las especies que se evaporan por tope y las que se extraen por el fondo.

$$f_{FL3,j}^{ML1} = f_{wst7,j}^{FL3} + f_{SD1,j}^{FL3} \quad (B.26)$$

$$\forall j \in \{agu, amd, prt\}$$

El flujo que ingresa a la secadora por spray se recomienda que tenga un 50 % de humedad, por lo que la siguiente ecuación se plantea para calcular el caudal que abandona el flash por fondo.

$$f_{SD2,agu}^{FL3} = P^{FL3} \cdot \sum_j f_{SD2,j}^{FL3} \quad (B.27)$$

$$\forall j \in \{agu, amd, prt\}$$

Molino 1 (M01)

Los componentes que ingresan al molino resultan los mismos que salen debido a que no se considera pérdida de material en el mismo.

$$f_{M01,j}^{ML1} = f_{HC1,j}^{M01} \quad (B.28)$$

$$\forall j \in \{agu, amd, cenz, fbr, lpd, prt\}$$

Hidrociclón 1 (HC1)

El balance de masa en el hidrociclón HC1 asegura que el caudal proveniente del molino es igual al que se envía a la malla 2 más el que se retira como desperdicio.

$$f_{HC1,j}^{M01} = f_{ML2,j}^{HC1} + f_{wst8,j}^{HC1} \quad (B.29)$$

$$\forall j \in \{agu, amd, cenz, fbr, lpd, prt\}$$

Los componentes que se eliminan por la utilización del hidrociclón se calculan a partir de la siguiente ecuación.

$$f_{wst8,j}^{HC1} = P_j^{HC1} \cdot f_{HC1,j}^{MO1} \quad (B.30)$$

$$\forall j \in \{agu, amd, cenz, fbr, lpd, prt\}$$

#### Malla (ML2)

El balance de masa en la malla *ML2* confirma que la suma de los flujos de los componentes que provienen del hidrociclón *HC1* es igual al caudal másico que circula hacia el molino 2 más lo que se retira como desperdicio.

$$f_{ML2,j}^{HC1} = f_{MO2,j}^{ML2} + f_{wst9,j}^{ML2} \quad (B.31)$$

$$\forall j \in \{agu, amd, cenz, fbr, lpd, prt\}$$

La cantidad de agua que se retira mediante la utilización de la malla 2 se calcula mediante la siguiente ecuación.

$$f_{wst9,agu}^{ML2} = P^{ML2} \cdot f_{ML2,agu}^{HC1} \quad (B.32)$$

#### Molino (MO2)

Los componentes que ingresan al molino *MO2* resultan los mismos que se envían a la malla *ML3* debido a que no se considera pérdida de material en el mismo.

$$f_{MO2,j}^{ML2} = f_{ML3,j}^{MO2} \quad (B.33)$$

$$\forall j \in \{agu, amd, cenz, fbr, lpd, prt\}$$

#### Malla (ML3)

El balance de masa en la malla *ML3* confirma que la suma de los flujos de los componentes que provienen del molino *MO2* es igual al caudal másico que circula hacia el hidrociclón *HC2* y hacia el secador por spray *SD1* más lo que se retira como desperdicio.

$$f_{ML3,j}^{MO2} = f_{HC2,j}^{ML3} + f_{SD1,j}^{ML3} + f_{wst10,j}^{ML3} \quad (B.34)$$

$$\forall j \in \{agu, amd, cenz, fbr, lpd, prt\}$$

La cantidad removida de los componentes que se envían al secador por spray queda determinada a partir de un factor de separación como se muestra a continuación.

$$f_{SD1,j}^{ML3} = P_j^{ML3} \cdot f_{ML3,j}^{MO2} \quad (B.35)$$

$$\forall j \in \{agu, amd, cenz, fbr, lpd, prt\}$$

La cantidad de agua que se retira mediante la utilización de la malla 3 se calcula mediante la siguiente ecuación.

$$f_{wst10,agu}^{ML3} = P^{ML3} \cdot f_{ML3,agu}^{MO2} \quad (B.36)$$

### Secador spray (SD1)

El balance de masa por componentes en el secador tipo spray confirma que la suma de las corrientes que ingresa desde evaporador flash 3 y la malla 3 es igual a la corriente de agua que se retira del proceso más la de gluten feed.

$$f_{SD1,j}^{FL3} + f_{SD1,j}^{ML3} = f_{glutfs,j}^{SD1} + f_{wst11,j}^{SD1} \quad (B.37)$$

$$\forall j \in \{agu, amd, cenz, fbr, lpd, prt\}$$

La cantidad de agua que debe eliminarse en este proceso de secado para que el porcentaje de humedad en la corriente del sub-producto sea del 10% viene dado por la siguiente ecuación.

$$f_{SD1,agu}^{FL3} + f_{SD1,agu}^{ML3} = P^{SD1} \cdot \sum_j f_{glutfs,j}^{SD1} + f_{wst11,agu}^{SD1} \quad (B.38)$$

$$\forall j \in \{agu, amd, cenz, fbr, lpd, prt\}$$

### Hidrociclón (HC2)

El balance de masa en el hidrociclón HC2 asegura que el caudal proveniente de la malla ML3 es igual al que se envía al tanque aglutinante más el que se retira como desperdicio.

$$f_{HC2,j}^{ML3} = f_{TA,j}^{HC2} + f_{wst12,j}^{HC2} \quad (B.39)$$

$$\forall j \in \{agu, amd, cenz, fbr, lpd, prt\}$$

#### Tanque aglutinante (TA)

El caudal que ingresa al tanque se separa en tres corrientes: la que se envía a lavado, desperdicios y la correspondiente a la formación de gluten meal como sub-producto.

$$f_{TA,j}^{HC2} = f_{TK2,j}^{TA} + f_{wst13,j}^{TA} + f_{glutms,j}^{TA} \quad (B.40)$$

$$\forall j \in \{agu, amd, cenz, fbr, lpd, prt\}$$

El caudal de gluten meal se calcula mediante la siguiente ecuación.

$$f_{glutms,j}^{TA} = P_j^{TA} \cdot f_{HC2,j}^{ML3} \quad (B.41)$$

$$\forall j \in \{agu, amd, cenz, fbr, lpd, prt\}$$

Las corrientes de desperdicios resultantes del proceso de separación de gluten se calculan mediante la siguiente ecuación

$$f_{wst13,agu}^{TA} + f_{wst12,agu}^{HC2} = P^{TA} \cdot f_{HC2,agu}^{ML3} \quad (B.42)$$

#### Tanque de lavado (TK2)

El balance de masa en el tanque de lavado TK2 confirma que el ingreso de las corrientes de agua y la corriente proveniente del tanque aglutinante es igual al caudal que se dirige a la unidad ficticia DU3.

$$f_{TK2,j}^{TA} + f_{TK2,j}^{h2os3} = f_{DU3,j}^{TK2} \quad (B.43)$$

$$\forall j \in \{agu, amd, cenz, fbr, lpd, prt\}$$

La cantidad de agua necesaria para el lavado del almidón de maíz en el tanque correspondiente viene dado por la siguiente expresión con el objetivo que haya un 60 % de humedad.

$$f_{TK2,agu}^{TA} + f_{TK2,agu}^{h2os3} = P^{TK2} \cdot \sum_j f_{DU3,j}^{TK2} \quad (B.44)$$

$$\forall j \in \{agu, amd, cenz, fbr, lpd, prt\}$$

En esta instancia, se plantea la posibilidad de emplear el almidón de maíz que se obtuvo a partir del procesamiento descrito anteriormente como fuente de carbono para el crecimiento y biosíntesis de PHA o enviarlo a un segundo sector de procesamiento donde mediante sacarificación se obtendrá glucosa que podrá ser utilizada como sustrato en los biorreactores. Asimismo, se tiene en cuenta la adquisición de almidón de maíz o mandioca ya procesado para ser utilizado en la fermentación o sacarificación.

$$f_{DU3,j}^{TK2} + y_3 \cdot f_{DU3,j}^{amzs} + y_4 \cdot f_{DU3,j}^{amdcs} = y_{12} \cdot f_{HX1,j}^{DU3} + y_{13} \cdot f_{DU4,j}^{DU3} \quad (B.45)$$

$$\forall j \in \{agu, amd, cenz, fbr, lpd, prt\}$$

En la Tabla B.2 se muestran los parámetros utilizados en los balances de masa descriptos anteriormente relacionados con el sector de tratamiento del grano de maíz para la obtención de almidón.

**Tabla B.2.** Parámetros utilizados en los balances de masa del sector de tratamiento de grano de maíz.

Parámetro	Valor	Unidades	Referencia
$P^{CT}$	0,02395	-	Ramirez <i>et al.</i> (2008)
$P^{TK1}$	0,45	kg agu/kg tot	Ramirez <i>et al.</i> (2008)
$P_{agu}^{ML1}$	0,295	-	Ramirez <i>et al.</i> (2008) Ramirez <i>et al.</i> (2009)
$P_{amz}^{ML1}$	0,037	-	Ramirez <i>et al.</i> (2008) Ramirez <i>et al.</i> (2009)
$P_{prt}^{ML1}$	0,28	-	Ramirez <i>et al.</i> (2008) Ramirez <i>et al.</i> (2009)
$P^{FL3}$	0,5	kg agu/kg tot	Ramirez <i>et al.</i> (2008)
$P_{agu}^{HC1}$	0,004	-	Ramirez <i>et al.</i> (2009)
$P_{amz}^{HC1}$	0,033	-	Ramirez <i>et al.</i> (2009)

$P_{cenz}^{HC1}$	0,105	-	Ramirez <i>et al.</i> (2009)
$P_{fbr}^{HC1}$	0,062	-	Ramirez <i>et al.</i> (2009)
$P_{lpd}^{HC1}$	0,794	-	Ramirez <i>et al.</i> (2009)
$P_{prt}^{HC1}$	0,142	-	Ramirez <i>et al.</i> (2009)
$P^{ML2}$	0,315	-	Ramirez <i>et al.</i> (2009)
$P_{agu}^{HC1}$	0,022	-	Ramirez <i>et al.</i> (2009)
$P_{amz}^{HC1}$	0,0215	-	Ramirez <i>et al.</i> (2009)
$P_{cenz}^{HC1}$	0,115	-	Ramirez <i>et al.</i> (2009)
$P_{fbr}^{HC1}$	0,96	-	Ramirez <i>et al.</i> (2009)
$P_{lpd}^{HC1}$	0,474	-	Ramirez <i>et al.</i> (2009)
$P_{prt}^{HC1}$	0,105	-	Ramirez <i>et al.</i> (2009)
$P^{ML3}$	0,315	-	Ramirez <i>et al.</i> (2009)
$P^{SD1}$	0,1	-	Ramirez <i>et al.</i> (2009)
$P_{agu}^{TA}$	0,028	-	Ramirez <i>et al.</i> (2009)
$P_{amz}^{TA}$	0,017	-	Ramirez <i>et al.</i> (2009)
$P_{cenz}^{TA}$	0,067	-	Ramirez <i>et al.</i> (2009)
$P_{fbr}^{TA}$	0,83	-	Ramirez <i>et al.</i> (2009)
$P_{lpd}^{TA}$	0,5	-	Ramirez <i>et al.</i> (2009)
$P_{prt}^{TA}$	0,884	-	Ramirez <i>et al.</i> (2009)
$P^{TA}$	0,315	-	Ramirez <i>et al.</i> (2009)
$P^{TK2}$	0,6	<i>kg agu/kg tot</i>	Ramirez <i>et al.</i> (2009)

### Intercambiador de calor (HX1)

En el caso de elegir la ruta tecnológica de sacarificación para la obtención de glucosa a partir de almidón, el balance de masa para el intercambiador de calor

se establece como una igualdad entre la suma de los componentes a la salida y los de entrada.

$$f_{HX1,j}^{DU3} = f_{FL4,j}^{HX1} \quad (B.46)$$

$$\forall j \in \{agu, amd, cenz, fbr, lpd, prt\}$$

#### Flash (FL4)

El balance de masa en el flash *FL4* asegura que la suma de los componentes que ingresan desde el intercambiador de calor igualan a la suma de las especies que se van por tope y fondo.

$$f_{FL4,j}^{HX1} = f_{wst14,j}^{FL4} + f_{HX2,j}^{FL4} \quad (B.47)$$

$$\forall j \in \{agu, amd, cenz, fbr, lpd, prt\}$$

La cantidad de agua que se evapora mediante la destilación instantánea viene dada por la siguiente ecuación de manera tal que la concentración de almidón en la corriente de proceso sea del 69 % en peso.

$$f_{HX2,amd}^{FL4} = P_{amd}^{FL4} \cdot \sum_j f_{HX2,j}^{FL4} \quad (B.48)$$

$$\forall j \in \{agu, amd, cenz, fbr, lpd, prt\}$$

#### Intercambiador de calor (HX2)

El balance de masa para el intercambiador de calor *HX2* se establece como una igualdad entre la suma de los componentes a la salida y los de entrada debido a que no ocurre reacción química ni hay separación de corrientes.

$$f_{HX2,j}^{FL4} = f_{HX3,j}^{HX2} \quad (B.49)$$

$$\forall j \in \{agu, amd, cenz, fbr, lpd, prt\}$$

#### Intercambiador de calor (HX3)

El balance de masa para el intercambiador de calor *HX3* se establece como una igualdad entre la suma de los componentes a la salida y los de entrada.



$$f_{HX3,j}^{HX2} = f_{RL,j}^{HX3} \quad (\text{B.50})$$

$$\forall j \in \{agu, amd, cenz, fbr, lpd, prt\}$$

#### Reactor de licuefacción (RL)

El balance de masa en el reactor de licuefacción  $RL$  considera la reacción química de los componentes que vienen aguas arriba del proceso con  $\alpha$ -amilasa como se describe a continuación.

$$f_{RL,j}^{HX3} + f_{RL,j}^{\alpha m l s s} + R_j^{RL} \cdot (f_{RL,j}^{HX3} + f_{RL,j}^{\alpha m l s s}) = f_{HX4,j}^{RL} \quad (\text{B.51})$$

$$\forall j \in \{amd, \alpha m l s\}$$

$$f_{RL,j}^{HX3} + f_{RL,j}^{\alpha m l s s} + R_j^{RL} \cdot f_{RL,amd}^{HX3} = f_{HX4,j}^{RL} \quad (\text{B.52})$$

$$\forall j \in \{agu, cenz, fbr, lpd, mdx, prt\}$$

La cantidad de  $\alpha$ -amilasa que ingresa al reactor de licuefacción es función de la cantidad de almidón que ingresa al reactor por la corriente de proceso como se muestra a continuación.

$$f_{RL,j}^{\alpha m l s s} = Q_{RL,j}^{\alpha m l s s} \cdot f_{RL,amd}^{HX3} \quad (\text{B.53})$$

$$\forall j \in \{agu, \alpha m l s\}$$

#### Intercambiador de calor (HX4)

El balance de masa para el intercambiador de calor  $HX4$  se establece como una igualdad entre la suma de los componentes a la salida y los de entrada.

$$f_{HX4,j}^{RL} = f_{RS,j}^{HX4} \quad (\text{B.54})$$

$$\forall j \in \{agu, cenz, fbr, lpd, mdx, prt\}$$

Reactor de sacarificación (RS)

El balance de masa en el reactor de sacarificación *RS* considera la reacción química de los componentes que provienen del intercambiador de calor con glucoamilasa como se describe a continuación.

$$f_{RS,j}^{HX4} + f_{RS,j}^{\gamma mlss} + R_j^{RS} \cdot (f_{RS,j}^{HX4} + f_{RS,j}^{\gamma mlss}) = f_{FL4,j}^{RS} \quad (B.55)$$

$$\forall j \in \{\gamma mlss, mdx\}$$

$$f_{RS,j}^{HX4} + f_{RS,j}^{\gamma mlss} + R_j^{RS} \cdot f_{RS,mdx}^{HX4} = f_{FL5,j}^{RS} \quad (B.56)$$

$$\forall j \in \{agu, cenx, fbr, lpd, gluc, prt\}$$

La cantidad de glucoamilasa que ingresa al reactor de sacarificación es función de la cantidad de maltodextrina que ingresa al reactor por la corriente de proceso como se muestra a continuación.

$$f_{RS,j}^{\gamma mlss} = Q_{RS,j}^{\gamma mlss} \cdot f_{RS,mdx}^{HX4} \quad (B.57)$$

$$\forall j \in \{agu, \gamma mlss\}$$

Flash (FL5)

El balance de masa global en el flash *FL5* considera que la suma de los componentes que ingresan desde el reactor de sacarificación igualan a la suma de las especies que se van por tope y fondo.

$$f_{FL5,j}^{RS} = f_{wst15,j}^{FL5} + f_{DU4,j}^{FL5} \quad (B.58)$$

$$\forall j \in \{agu, cenx, fbr, lpd, gluc, prt\}$$

La cantidad de agua removida en esta etapa de separación se calcula mediante un balance de masa como se muestra a continuación

$$f_{wst15,agu}^{FL5} = f_{FL5,agu}^{RS} - P_{agu}^{FL5} \cdot \sum_j f_{DU4,j}^{FL5} \quad (B.59)$$

$$\forall j \in \{agu, cenx, fbr, lpd, gluc, prt\}$$

En la Tabla B.3 se encuentran los parámetros involucrados en los balances de masa realizados para el sector de sacarificación de almidón.

**Tabla B.3.** Parámetros utilizados en los balances de masa de sacarificación de almidón.

Parámetro	Valor	Unidades	Referencia
$P_{amd}^{FL4}$	0,69	kg amd/kg tot	Van der Veen <i>et al.</i> (2006)
$R_{amd}^{RL}$	-1	-	N/A
$R_{amls}^{RL}$	-1	-	N/A
$R_{mdx}^{RL}$	0,88	kg mdx/kg amd	Van der Veen <i>et al.</i> (2006)
$Q_{RL,agu}^{\alpha mls}$	0,2	kg agu/kg amd	Carr <i>et al.</i> (1982)
$Q_{RL,\alpha mls}^{\alpha mls}$	0,001	kg $\alpha$ mls/kg amd	Muller & Miller (1982)
$R_{\gamma mls}^{RS}$	-1	-	N/A
$R_{mdx}^{RS}$	-1	-	N/A
$R_{gluc}^{RS}$	1	kg gluc/kg mdx	N/A
$Q_{RS,agu}^{\gamma mls}$	2,778	kg agu/kg mdx	Carr <i>et al.</i> (1982)
$Q_{RS,\gamma mls}^{\gamma mls}$	0,025	kg $\gamma$ mls/kg mdx	Muller & Miller (1982)
$P_{agu}^{FL5}$	0,2	kg agu/kg tot	Van der Veen <i>et al.</i> (2006)

### B.1.1.3. Materia prima: Caña de azúcar

#### Tanque de lavado (TK3)

El balance de masa global en el tanque de lavado TK3 afirma que la suma de los componentes de salida iguala a los de entrada debido a que no existe reacción química.

$$f_{TK3,j}^{c\tilde{n}zs} = f_{M03,j}^{TK3} \quad (B.60)$$

$$\forall j \in \{agu, cenz, fbr, otr, prt, sac\}$$

Molino (M03)

En la molienda se considera la separación del bagazo de caña de azúcar del resto de los componentes ricos en azúcar mediante las siguientes ecuaciones.

$$f_{M03,j}^{TK3} = f_{DR,j}^{M03} + f_{CL,j}^{M03} \quad (B.61)$$

$$\forall j \in \{agu, cen, fbr, otr, prt, sac\}$$

$$f_{DR,j}^{M03} = P_j^{M03} \cdot f_{M03,j}^{TK3} \quad (B.62)$$

$$\forall j \in \{agu, cen, fbr, otr, prt, sac\}$$

Secador (DR)

El balance de masa alrededor del secador *DR* confirma que los componentes de entrada al equipo son iguales a la suma de los que se eliminan como humedad al ambiente y aquellos que se dirigen al horno ubicado aguas abajo.

$$f_{DR,j}^{M03} = f_{wst16,j}^{DR} + f_{FR,j}^{DR} \quad (B.63)$$

$$\forall j \in \{agu, cen, fbr, otr, prt, sac\}$$

La cantidad de agua que se elimina en este proceso de secado viene dado por un parámetro como se muestra en la siguiente ecuación.

$$f_{FR,fbr}^{DR} = P^{DR} \cdot \sum_j f_{FR,j}^{DR} \quad (B.64)$$

$$\forall j \in \{agu, cen, fbr, otr, prt, sac\}$$

Horno (FR)

El balance de masa por componentes en el horno *FR* confirma que el ingreso de material lignocelulósico y el agua necesaria para combustión iguala a las salidas de gas de escape, cenizas y la corriente que se envía a la turbina de vapor para la generación de energía.

$$f_{FR,j}^{DR} + f_{FR,j}^{h20s4} = f_{wst17,j}^{FR} + f_{wst18,j}^{FR} + f_{TB,j}^{FR} \quad (B.65)$$

$$\forall j \in \{agu, cen, fbr, otr, prt, sac\}$$

$$P_{f_{gs}}^{FR} \cdot f_{FR, fbr}^{DR} = f_{wst18, fgs}^{FR} \quad (B.66)$$

$$f_{FR, agu}^{h20s4} = P_{agu}^{FR} \cdot \sum_j f_{FR, j}^{DR} \quad (B.67)$$

$$\forall j \in \{agu, cen, fbr, otr, prt, sac\}$$

$$f_{wst17, cnz}^{FR} = P_{cnz}^{FR} \cdot \sum_j f_{FR, j}^{DR} \quad (B.68)$$

$$\forall j \in \{agu, cen, fbr, otr, prt, sac\}$$

### Turbina de vapor (TB)

La cantidad de vapor generada en la turbina de vapor *TB* se determina a partir de la cantidad de bagazo seco como se muestra en la siguiente ecuación.

$$f_{vaps}^{TB} = P_{vap}^{TB} \cdot \sum_j f_{FR, j}^{DR} \quad (B.69)$$

$$\forall j \in \{agu, cen, fbr, otr, prt, sac\}$$

### Clarificador (CL)

El balance de masa en el clarificador *CL* se plantea mediante las siguientes ecuaciones que tienen en cuenta los ingresos de la corriente de proceso, ácido sulfúrico e hidróxido de calcio junto con la proveniente del tambor rotario luego del proceso de generación de cachaza. Asimismo, se considera un reciclo de ácido sulfúrico e hidróxido de calcio.

$$f_{CL, j}^{MO3} + (1 + P_j^{CL})(f_{CL, j}^{asulfs1} + f_{CL, j}^{cals1} + f_{CL, j}^{RD}) = f_{RD, j}^{CL} + f_{DU5, j}^{CL} \quad (B.70)$$

$$\forall j \in \{agu, asulf, cal, cen, fbr, otr, prt, sac\}$$

La cantidad de ácido sulfúrico que ingresa al sistema de clarificación de jugos se modela mediante las siguientes ecuaciones.

$$\sum_j f_{CL, j}^{asulfs1} = P_{asulfs1} \cdot f_{CL, sac}^{MO3} \quad (B.71)$$

$$\forall j \in \{agu, asulf, \}$$

$$f_{CL,j}^{asulfs1} = P_j^{asulfs1} \cdot \sum_j f_{CL,j}^{asulfs1} \quad (B.72)$$

$$\forall j \in \{agu, asulf, cal, cenz, fbr, otr, prt, sac\}$$

El hidróxido de calcio que se utiliza se calcula a partir de la cantidad de sacarosa que contienen los jugos.

$$f_{CL,cal}^{cals1} = P^{cals1} \cdot f_{CL,sac}^{MO3} \quad (B.73)$$

La composición de los jugos clarificados se calcula mediante la ecuación que se muestra a continuación.

$$f_{RD,j}^{CL} = P_j^{CL} \cdot f_{CL,j}^{MO3} \quad (B.74)$$

$$\forall j \in \{agu, cenz, fbr, otr, prt, sac\}$$

#### Tambor rotatorio (RD)

El balance de masa global alrededor del tambor rotatorio *RD* viene dado por la siguiente ecuación.

$$f_{RD,j}^{CL} = f_{CL,j}^{RD} + f_{cachs1,j}^{RD} \quad (B.75)$$

$$\forall j \in \{agu, cenz, fbr, otr, prt, sac\}$$

La composición de la cachaza se calcula mediante la expresión matemática que se muestra debajo.

$$f_{cachs1,j}^{RD} = P_j^{RD} \cdot f_{RD,j}^{CL} \quad (B.76)$$

$$\forall j \in \{agu, cenz, fbr, otr, prt, sac\}$$

En la Tabla B.4 se reportan los valores de los parámetros utilizados en los balances de masa del sector de acondicionamiento de la caña de azúcar.

**Tabla B.4.** Parámetros utilizados en los balances de masa del sector de acondicionamiento de la caña de azúcar.

Parámetro	Valor	Unidades	Referencia
$P_{agu}^{MO3}$	0,1891	-	Moncada <i>et al.</i> (2014)
$P_{cnz}^{MO3}$	0,2707	-	Moncada <i>et al.</i> (2014)
$P_{fbr}^{MO3}$	0,93	-	Moncada <i>et al.</i> (2014)
$P_{otr}^{MO3}$	0,0444	-	Moncada <i>et al.</i> (2014)
$P_{prt}^{MO3}$	0,0795	-	Moncada <i>et al.</i> (2014)
$P_{sac}^{MO3}$	0,0193	-	Moncada <i>et al.</i> (2014)
$P^{DR}$	0,48	kg fbr/kg tot	Rincón <i>et al.</i> (2014)
$P_{fgs}^{FR}$	16,4518	-	Moncada <i>et al.</i> (2014)
$P_{agu}^{FR}$	0,5585	-	Moncada <i>et al.</i> (2014)
$P_{cnz}^{FR}$	0,01396	-	Moncada <i>et al.</i> (2014)
$P_{vap}^{TB}$	5,077	-	Moncada <i>et al.</i> (2014)
$P_{asulf}^{CL}$	-1	-	N/A
$P_{lime}^{CL}$	-0,1	-	N/A
$p_{asulfs1}$	0,0014	-	Amores <i>et al.</i> (2013)
$p_{agu}^{asulfs1}$	0,96	-	Moncada <i>et al.</i> (2014)
$p_{asulf}^{asulfs1}$	0,04	-	Moncada <i>et al.</i> (2014)
$p_{cals1}$	0,00932	-	Mele <i>et al.</i> (2011)
$P_{agu}^{CL}$	0,9169	-	Quintero <i>et al.</i> (2008)
$P_{cnz}^{CL}$	0,5355	-	Quintero <i>et al.</i> (2008)
$P_{otr}^{CL}$	0,1889	-	Quintero <i>et al.</i> (2008)
$P_{prot}^{CL}$	0,6332	-	Quintero <i>et al.</i> (2008)
$P_{sac}^{CL}$	1	-	Quintero <i>et al.</i> (2008)
$P_{agu}^{RD}$	1	-	Quintero <i>et al.</i> (2008)

$P_{cnz}^{RD}$	1	-	Quintero <i>et al.</i> (2008)
$P_{otr}^{RD}$	1	-	Quintero <i>et al.</i> (2008)
$P_{prot}^{RD}$	1	-	Quintero <i>et al.</i> (2008)
$P_{sac}^{RD}$	1	-	Quintero <i>et al.</i> (2008)

### B.1.2. Biosíntesis

A continuación, se describen las ecuaciones implementadas correspondientes al sector de biosíntesis del PHA.

#### Esterilizador (ST1)

Las corrientes de entrada al esterilizador *ST1* es igual a la de salida que se envía al intercambiador de calor debido a que este equipo solo se utiliza para elevar la presión de la corriente que contiene la fuente de carbono.

$$f_{ST1,j}^{DU2} + f_{ST1,j}^{DU1} = f_{HX5,j}^{ST1} \quad (B.77)$$

$$\forall j \in \{agu, glic\}$$

#### Intercambiador de calor (HX5)

La corriente de entrada al intercambiador *HX5* de calor es igual a la corriente de salida del mismo debido a que este equipo se utiliza para esterilizar la corriente del sustrato.

$$f_{HX5,j}^{ST1} = f_{DU6,j}^{HX5} \quad (B.78)$$

$$\forall j \in \{agu, glic\}$$

Asimismo, dependiendo del estado del glicerol (crudo o purificado), se utilizan diferentes biorreactores para la síntesis del biopolímero. Por lo tanto, la corriente de salida se formula como se muestra a continuación.

$$f_{DU6,j}^{HX5} = y_{14} \cdot f_{BR1,j}^{DU6} + y_{15} \cdot f_{BR3,j}^{DU6} \quad (B.79)$$

$$\forall j \in \{agu, glic\}$$



Biorreactor 1 (BR1)

La corriente de salida del biorreactor es igual a la suma de los caudales de entrada más/menos lo que se genera/consume en el interior del mismo.

$$f_{BR1,j}^{DU6} + f_{BR1,j}^{mculst1} + R_j^{BR1} \cdot (f_{BR1,j}^{DU6} + f_{BR1,j}^{mculst1}) = f_{BR2,j}^{BR1} \quad (B.80)$$

$$\forall j \in \{agu, glic\}$$

$$f_{BR1,j}^{DU6} + f_{BR1,j}^{mculst1} + R_j^{BR1} \cdot (f_{BR1,glic}^{DU6} - f_{BR2,glic}^{BR1}) = f_{BR2,j}^{BR1} \quad (B.81)$$

$$\forall j \in \{bmr, pha\}$$

La cantidad de medio de cultivo que ingresa al biorreactor se simula como si fuese agua y la misma viene dada a partir de datos de concentración del sustrato principal dentro del equipo.

$$CONC_{glic} = \frac{f_{BR1,glic}^{DU6}}{\frac{f_{BR1,glic}^{DU6}}{\rho_{glic}} + \frac{f_{BR1,agu}^{DU6}}{\rho_{agu}} + \frac{f_{BR1,agu}^{mculst1}}{\rho_{agu}}} \quad (B.82)$$

Biorreactor 2 (BR2)

El segundo biorreactor se utiliza para la producción de biopolímero, por lo tanto, el balance de masa de este equipo viene dado por las siguientes ecuaciones.

$$f_{BR2,j}^{BR1} + R_j^{BR2} \cdot f_{BR2,j}^{BR1} = f_{CN2,j}^{BR2} \quad (B.83)$$

$$\forall j \in \{agu, glic\}$$

$$f_{BR2,j}^{BR1} + R_j^{BR2} \cdot (f_{BR2,glic}^{BR1} - f_{CN2,glic}^{BR2}) = f_{CN2,j}^{BR2} \quad (B.84)$$

$$\forall j \in \{bmr, pha\}$$

Biorreactor 3 (BR3)

La corriente de salida del biorreactor destinado al incremento de la biomasa celular es igual a la suma de los caudales de entrada más/menos lo que se genera/consume en el interior del mismo.

$$f_{BR3,j}^{DU6} + f_{BR3,j}^{mculs2} + R_j^{BR3} \cdot (f_{BR3,j}^{DU6} + f_{BR3,j}^{mculs2}) = f_{BR4,j}^{BR3} \quad (\text{B.85})$$

$$\forall j \in \{agu, glic\}$$

$$f_{BR3,j}^{DU6} + f_{BR3,j}^{mculs2} + R_j^{BR3} \cdot (f_{BR3,glic}^{DU6} - f_{BR4,glic}^{BR3}) = f_{BR4,j}^{BR3} \quad (\text{B.86})$$

$$\forall j \in \{bmr, pha\}$$

La cantidad de medio de cultivo que ingresa al biorreactor se simula como si fuese agua y la misma viene dada a partir de datos de concentración del sustrato principal dentro del equipo.

$$CONC_{glic} = \frac{f_{BR3,glic}^{DU6}}{\sum_j \frac{f_{BR3,j}^{DU6}}{\rho_j} + \frac{f_{BR3,agu}^{mculs2}}{\rho_{agu}}} \quad (\text{B.87})$$

$$\forall j \in \{agu, cenz, glic, jab, met, moxs\}$$

#### Biorreactor 4 (BR4)

El biorreactor posterior al destinado al aumento de la biomasa celular se utiliza para la producción de biopolímero, por lo tanto, el balance de masa de este equipo viene dado por las siguientes ecuaciones.

$$f_{BR4,j}^{BR3} + R_j^{BR4} \cdot f_{BR4,j}^{BR3} = f_{CN2,j}^{BR4} \quad (\text{B.88})$$

$$\forall j \in \{agu, cenz, glic, jab, met, moxs\}$$

$$f_{BR4,j}^{BR3} + R_j^{BR4} \cdot (f_{BR4,glic}^{BR3} - f_{CN2,glic}^{BR4}) = f_{CN2,j}^{BR4} \quad (\text{B.89})$$

$$\forall j \in \{bmr, pha\}$$

#### Esterilizador (ST2)

La corriente de entrada al esterilizador es igual a la de salida que se envía al intercambiador de calor debido a que este equipo solo se utiliza para elevar la presión de la corriente que contiene la fuente de carbono.

$$f_{ST2,j}^{DU4} = f_{HX6,j}^{ST2} \quad (B.90)$$

$$\forall j \in \{agu, amd, cenz, fbr, gluc, lip, prt\}$$

#### Intercambiador de calor (HX6)

La corriente de entrada al intercambiador de calor es igual a la corriente de salida del mismo debido a que este equipo se utiliza para esterilizar la corriente del sustrato.

$$f_{HX6,j}^{ST2} = f_{DU7,j}^{HX6} \quad (B.91)$$

$$\forall j \in \{agu, amd, cenz, fbr, gluc, lip, prt\}$$

En función de la fuente de carbono seleccionada previamente, se plantea la utilización de diferentes biorreactores para el proceso de biosíntesis como se muestra a continuación.

$$f_{DU7,j}^{HX6} = y_{16} \cdot f_{BR5,j}^{DU7} + y_{17} \cdot f_{BR7,j}^{DU7} + y_{18} \cdot f_{BR9,j}^{DU7} \quad (B.92)$$

$$\forall j \in \{agu, amd, cenz, fbr, gluc, lip, prt\}$$

#### Biorreactor 5 (BR5)

La corriente de salida del biorreactor es igual a la suma de los caudales de entrada más/menos lo que se genera/consume en el interior del mismo.

$$f_{BR5,j}^{DU7} + f_{BR5,j}^{mcul3} + R_j^{BR5} \cdot (f_{BR5,j}^{DU7} + f_{BR5,j}^{mcul3}) = f_{BR6,j}^{BR5} \quad (B.93)$$

$$\forall j \in \{agu, amd, cenz, fbr, gluc, lip, prt\}$$

$$f_{BR5,j}^{DU7} + R_j^{BR5} \cdot (f_{BR5,j}^{DU7,gluc} - f_{BR6,j}^{BR5,gluc}) = f_{BR6,j}^{BR5} \quad (B.94)$$

$$\forall j \in \{bmr, pha\}$$

La cantidad de medio de cultivo que ingresa al biorreactor se considera agua y la misma viene dada a partir de datos de concentración del sustrato principal dentro del equipo.

$$CONC_{gluc} = \frac{f_{BR5,gluc}^{DU7}}{\frac{f_{BR5,gluc}^{DU7}}{\rho_{gluc}} + \frac{f_{BR5,agu}^{DU7}}{\rho_{agu}} + \frac{f_{BR5,agu}^{mcults3}}{\rho_{agu}}} \quad (B.95)$$

### Biorreactor 6 (BR6)

El segundo biorreactor se utiliza para la producción de biopolímero, por lo tanto, el balance de masa de este equipo viene dado por las siguientes ecuaciones.

$$f_{BR6,j}^{BR5} + R_j^{BR6} \cdot f_{BR6,j}^{BR5} = f_{CN2,j}^{BR6} \quad (B.96)$$

$$\forall j \in \{agu, amd, cenz, fbr, gluc, lip, prt\}$$

$$f_{BR6,j}^{BR5} + R_j^{BR6} \cdot (f_{BR6,gluc}^{BR5} - f_{CN2,gluc}^{BR6}) = f_{CN2,j}^{BR6} \quad (B.97)$$

$$\forall j \in \{bmr, pha\}$$

### Biorreactor 7 (BR7)

La corriente de salida del biorreactor destinado al incremento de la biomasa celular es igual a la suma de los caudales de entrada más/menos lo que se genera/consume en el interior del mismo.

$$f_{BR7,j}^{DU7} + f_{BR7,j}^{mcults4} + R_j^{BR7} \cdot (f_{BR7,j}^{DU7} + f_{BR7,j}^{mcults4}) = f_{BR8,j}^{BR7} \quad (B.98)$$

$$\forall j \in \{agu, amd, cenz, fbr, gluc, lip, prt\}$$

$$f_{BR7,j}^{DU7} + f_{BR7,j}^{mcults4} + R_j^{BR7} \cdot (f_{BR7,amd}^{DU7} - f_{BR8,amd}^{BR7}) = f_{BR8,j}^{BR7} \quad (B.99)$$

$$\forall j \in \{bmr, pha\}$$

La cantidad de medio de cultivo que ingresa al biorreactor se simula como si fuese agua y la misma viene dada a partir de datos de concentración del sustrato principal dentro del equipo.

$$CONC_{amd} = \frac{f_{BR7,amd}^{DU7}}{\sum_j \frac{f_{BR7,j}^{DU7}}{\rho_j} + \frac{f_{BR7,agu}^{mcults4}}{\rho_{agu}}} \quad (B.100)$$

$$\forall j \in \{agu, amd, cenz, fbr, gluc, lip, prt\}$$

### Biorreactor 8 (BR8)

El biorreactor posterior al destinado al aumento de la biomasa celular se utiliza para la producción de biopolímero, por lo tanto, el balance de masa de este equipo viene dado por las siguientes ecuaciones.

$$f_{BR8,j}^{BR7} + R_j^{BR8} \cdot f_{BR8,j}^{BR7} = f_{CN2,j}^{BR8} \quad (B.101)$$

$$\forall j \in \{agu, amd, cenz, fbr, gluc, lip, prt\}$$

$$f_{BR8,j}^{BR7} + R_j^{BR8} \cdot (f_{BR8,amd}^{BR7} - f_{CN2,amd}^{BR8}) = f_{CN2,j}^{BR8} \quad (B.102)$$

$$\forall j \in \{bmr, pha\}$$

### Biorreactor 9 (BR9)

La corriente de salida del biorreactor destinado al incremento de la biomasa celular es igual a la suma de los caudales de entrada más/menos lo que se genera/consume en el interior del mismo.

$$f_{BR9,j}^{DU7} + f_{BR9,j}^{mcults5} + R_j^{BR9} \cdot (f_{BR9,j}^{DU7} + f_{BR9,j}^{mcults5}) = f_{BR10,j}^{BR9} \quad (B.103)$$

$$\forall j \in \{agu, amd, cenz, fbr, gluc, lip, prt\}$$

$$f_{BR9,j}^{DU7} + f_{BR9,j}^{mcults5} + R_j^{BR9} \cdot (f_{BR9,amd}^{DU7} - f_{BR8,amd}^{BR9}) = f_{BR10,j}^{BR9} \quad (B.104)$$

$$\forall j \in \{bmr, pha\}$$

La cantidad de medio de cultivo que ingresa al biorreactor se simula como si fuese agua y la misma viene dada a partir de datos de concentración del sustrato principal dentro del equipo.

$$CONC_{amd} = \frac{f_{BR9,amd}^{DU7}}{\sum_j \frac{f_{BR9,j}^{DU7}}{\rho_j} + \frac{f_{BR9,agu}^{mcults5}}{\rho_{agu}}} \quad (B.105)$$

$$\forall j \in \{agu, amd, cenz, fbr, gluc, lip, prt\}$$

### Biorreactor 10 (BR10)

El biorreactor posterior al destinado al aumento de la biomasa celular se utiliza para la producción de biopolímero, por lo tanto, el balance de masa de este equipo viene dado por las siguientes ecuaciones.

$$f_{BR10,j}^{BR9} + R_j^{BR10} \cdot f_{BR10,j}^{BR9} = f_{CN2,j}^{BR10} \quad (B.106)$$

$$\forall j \in \{agu, amd, cenz, fbr, gluc, lip, prt\}$$

$$f_{BR10,j}^{BR9} + R_j^{BR10} \cdot (f_{BR10,amd}^{BR9} - f_{CN2,amd}^{BR10}) = f_{CN2,j}^{BR10} \quad (B.107)$$

$$\forall j \in \{bmr, pha\}$$

### Esterilizador (ST3)

La corriente de entrada al esterilizador es igual a la de salida que se envía al intercambiador de calor debido a que este equipo solo se utiliza para elevar la presión de la corriente que contiene la fuente de carbono.

$$f_{ST3,j}^{DU5} = f_{HX7,j}^{ST3} \quad (B.108)$$

$$\forall j \in \{agu, cenz, fbr, otr, prt, sac\}$$

### Intercambiador de calor (HX7)

La corriente de entrada al intercambiador de calor es igual a la corriente de salida del mismo debido a que este equipo se utiliza para esterilizar la corriente del sustrato.

$$f_{HX7,j}^{ST3} = f_{DU8,j}^{HX7} \quad (B.109)$$

$$\forall j \in \{agu, cenz, fbr, otr, prt, sac\}$$

En función de la fuente de carbono seleccionada previamente, se plantea la utilización de diferentes biorreactores para el proceso de biosíntesis como se muestra a continuación.

$$f_{DU8,j}^{HX7} = y_{19} \cdot f_{BR11,j}^{DU8} + y_{20} \cdot f_{BR13,j}^{DU8} \quad (B.110)$$

$$\forall j \in \{agu, cen, fbr, otr, prt, sac\}$$

### Biorreactor 11 (BR11)

La corriente de salida del biorreactor destinado al incremento de la biomasa celular es igual a la suma de los caudales de entrada más/menos lo que se genera/consume en el interior del mismo.

$$f_{BR11,j}^{DU8} + f_{BR11,j}^{mculs6} + R_j^{BR11} \cdot (f_{BR11,j}^{DU8} + f_{BR11,j}^{mculs6}) = f_{BR12,j}^{BR11} \quad (B.111)$$

$$\forall j \in \{agu, cen, fbr, otr, prt, sac\}$$

$$f_{BR11,j}^{DU8} + f_{BR11,j}^{mculs6} + R_j^{BR11} \cdot (f_{BR11,sac}^{DU8} - f_{BR12,sac}^{BR11}) = f_{BR12,j}^{BR11} \quad (B.112)$$

$$\forall j \in \{bmr, pha\}$$

La cantidad de medio de cultivo que ingresa al biorreactor se simula como si fuese agua y la misma viene dada a partir de datos de concentración del sustrato principal dentro del equipo.

$$CONC_{sac} = \frac{f_{BR11,sac}^{DU8}}{\sum_j \frac{f_{BR11,j}^{DU8}}{\rho_j} + \frac{f_{BR11,agu}^{mculs6}}{\rho_{agu}}} \quad (B.113)$$

$$\forall j \in \{agu, cen, fbr, otr, prt, sac\}$$

### Biorreactor 12 (BR12)

El biorreactor posterior al destinado al aumento de la biomasa celular se utiliza para la producción de biopolímero, por lo tanto, el balance de masa de este equipo viene dado por las siguientes ecuaciones.

$$f_{BR12,j}^{BR11} + R_j^{BR12} \cdot f_{BR12,j}^{BR11} = f_{DU9,j}^{BR12} \quad (B.114)$$

$$\forall j \in \{agu, cenz, fbr, otr, prt, sac\}$$

$$f_{BR12,j}^{BR11} + R_j^{BR12} \cdot (f_{BR12,sac}^{BR11} - f_{CN2,sac}^{BR12}) = f_{CN2,j}^{BR12} \quad (B.115)$$

$$\forall j \in \{bmr, pha\}$$

### Biorreactor 13 (BR13)

La corriente de salida del biorreactor destinado al incremento de la biomasa celular es igual a la suma de los caudales de entrada más/menos lo que se genera/consume en el interior del mismo.

$$f_{BR13,j}^{DU8} + f_{BR13,j}^{mculs7} + R_j^{BR11} \cdot (f_{BR13,j}^{DU8} + f_{BR13,j}^{mculs7}) = f_{BR14,j}^{BR13} \quad (B.116)$$

$$\forall j \in \{agu, cenz, fbr, otr, prt, sac\}$$

$$f_{BR13,j}^{DU8} + f_{BR13,j}^{mculs7} + R_j^{BR13} \cdot (f_{BR13,sac}^{DU8} - f_{BR12,sac}^{BR13}) = f_{BR14,j}^{BR13} \quad (B.117)$$

$$\forall j \in \{bmr, pha\}$$

La cantidad de medio de cultivo que ingresa al biorreactor se simula como si fuese agua y la misma viene dada a partir de datos de concentración del sustrato principal dentro del equipo.

$$CONC_{sac} = \frac{f_{BR13,sac}^{DU8}}{\sum_j \frac{f_{BR13,j}^{DU8}}{\rho_j} + \frac{f_{BR13,agu}^{mculs7}}{\rho_{agu}}} \quad (B.118)$$

$$\forall j \in \{agu, cenz, fbr, otr, prt, sac\}$$

### Biorreactor 14 (BR14)

El biorreactor posterior al destinado al aumento de la biomasa celular se utiliza para la producción de biopolímero, por lo tanto, el balance de masa de este equipo viene dado por las siguientes ecuaciones.



$$f_{BR14,j}^{BR13} + R_j^{BR14} \cdot f_{BR14,j}^{BR13} = f_{CN2,j}^{BR14} \quad (\text{B.119})$$

$$\forall j \in \{agu, cenz, fbr, otr, prt, sac\}$$

$$f_{BR14,j}^{BR13} + R_j^{BR14} \cdot (f_{BR12,sac}^{BR13} - f_{CN2,sac}^{BR14}) = f_{CN2,j}^{BR14} \quad (\text{B.120})$$

$$\forall j \in \{bmr, pha\}$$

La Tabla B.5 muestra los valores los parámetros que se utilizan en los balances de masa correspondientes al sector de biosíntesis de PHA.

**Tabla B.5.** Parámetros utilizados en los balances de masa asociados al sector de biosíntesis de PHA.

Parámetro	Valor	Unidades	Referencia
$R_{glic}^{BR1}$	-0,33	-	Cavalheiro <i>et al.</i> (2009)
$R_{bmr}^{BR1}$	0,37	-	Cavalheiro <i>et al.</i> (2009)
$R_{pha}^{BR1}$	0,07	-	Cavalheiro <i>et al.</i> (2009)
$CONC_{glic}$	249	$kg/m^3$	Posada <i>et al.</i> (2011)
$R_{glic}^{BR2}$	-0,66	-	Cavalheiro <i>et al.</i> (2009)
$R_{bmr}^{BR2}$	-0,06	-	Cavalheiro <i>et al.</i> (2009)
$R_{pha}^{BR2}$	0,36	-	Cavalheiro <i>et al.</i> (2009)
$R_{glic}^{BR3}$	-0,45	-	Cavalheiro <i>et al.</i> (2009)
$R_{bmr}^{BR3}$	0,45	-	Cavalheiro <i>et al.</i> (2009)
$R_{pha}^{BR3}$	0,04	-	Cavalheiro <i>et al.</i> (2009)
$R_{glic}^{BR4}$	-0,48	-	Cavalheiro <i>et al.</i> (2009)
$R_{bmr}^{BR4}$	-0,07	-	Cavalheiro <i>et al.</i> (2009)
$R_{pha}^{BR4}$	0,34	-	Cavalheiro <i>et al.</i> (2009)
$R_{gluc}^{BR5}$	-0,6	-	Chanprateep (2010)
$R_{bmr}^{BR5}$	0,095	-	Chanprateep (2010)

$R_{pha}^{BR5}$	0,38	-	Chanprateep (2010)
$CONC_{gluc}$	250	$kg/m^3$	N/A
$R_{amd}^{BR7}$	-0,93	-	Sheu <i>et al.</i> (2009)
$R_{bmr}^{BR7}$	0,074	-	Sheu <i>et al.</i> (2009)
$R_{pha}^{BR7}$	0,138	-	Sheu <i>et al.</i> (2009)
$CONC_{amd}$	250	$kg/m^3$	N/A
$R_{amd}^{BR9}$	-0,35	-	Poomipuk <i>et al.</i> (2014)
$R_{bmr}^{BR9}$	0,48	-	Poomipuk <i>et al.</i> (2014)
$R_{pha}^{BR9}$	0,17	-	Poomipuk <i>et al.</i> (2014)
$R_{amd}^{BR10}$	-0,77	-	Poomipuk <i>et al.</i> (2014)
$R_{amd}^{BR10}$	-0,1	-	Poomipuk <i>et al.</i> (2014)
$R_{amd}^{BR10}$	0,13	-	Poomipuk <i>et al.</i> (2014)
$R_{sac}^{BR11}$	-0,97	-	Nonato <i>et al.</i> (2001)
$R_{bmr}^{BR11}$	0,133	-	Chanprateep (2010)
$R_{pha}^{BR11}$	0,4	-	Chanprateep (2010)
$CONC_{sac}$	220	$kg/m^3$	N/A
$R_{sac}^{BR13}$	-0,97	-	Nonato <i>et al.</i> (2001)
$R_{bmr}^{BR13}$	0,08	-	Tripathi <i>et al.</i> (2012)
$R_{pha}^{BR13}$	0,24	-	Tripathi <i>et al.</i> (2012)

### B.1.3. Extracción y purificación del biopolímero

Mediante las siguientes ecuaciones se modelan las distintas tecnologías de extracción propuestas.

Previo al ingreso del sector de extracción, se retiran los componentes indeseables mediante la formulación de la siguiente ecuación.

$$\begin{aligned}
f_{CN2,j}^{BR2} + f_{CN2,j}^{BR4} + f_{CN2,j}^{BR6} + f_{CN2,j}^{BR8} + f_{CN2,j}^{BR10} + f_{CN2,j}^{BR12} + f_{CN2,j}^{BR14} \\
= f_{wst19,j}^{CN2} + f_{DU9,j}^{CN2}
\end{aligned}
\tag{B.121}$$

La cantidad de cada uno de los componentes que se desecharán mediante centrifugación se determinará a partir de la ecuación que se presenta debajo.

$$\begin{aligned}
f_{wst19,j}^{CN2} = P_j^{CN2} \cdot (f_{CN2,j}^{BR2} + f_{CN2,j}^{BR4} + f_{CN2,j}^{BR6} + f_{CN2,j}^{BR8} + f_{CN2,j}^{BR10} + f_{CN2,j}^{BR12} \\
+ f_{CN2,j}^{BR14})
\end{aligned}
\tag{B.122}$$

$$\forall j \in J$$

donde  $P_j^{CN2}$  tendrá un valor de 1 para todos los componentes involucrados en el proceso con excepción de *bmr* y *pha*. Por su parte,  $J$  representa a todo el conjunto de componentes que lleguen al sector de extracción.

La corriente proveniente del sector de biosíntesis puede ser purificada mediante una de las tecnologías de extracción y purificación planteadas. Para ello, se formula la siguiente ecuación en donde se incluyen variables binarias.

$$f_{DU9,j}^{CN2} = y_{21} \cdot f_{HX8,j}^{DU9} + y_{22} \cdot f_{TK5,j}^{DU9} + y_{23} \cdot f_{TK6,j}^{DU9} + y_{24} \cdot f_{DG3,j}^{DU9}
\tag{B.123}$$

$$\forall j \in \{bmr, pha\}$$

### B.1.3.1 Extracción enzimática

Las ecuaciones que se detallan a continuación son las implementadas con el objetivo de modelar el sector de extracción mediante la utilización de enzimas.

#### Intercambiador de calor (HX8)

La corriente de entrada al intercambiador de calor es igual a la corriente de salida del mismo como se plantea a continuación.

$$f_{HX8,j}^{DU9} = f_{DG1,j}^{HX8}
\tag{B.124}$$

$$\forall j \in \{agu, bmr, pha\}$$

Digestor (DG1)

La corriente de salida del digestor es igual a la suma de los caudales de entrada proveniente del intercambiador de calor previo y las corrientes de enzimas e hipoclorito de sodio destinados a la lisis celular más/menos lo que se genera/consume en el interior del mismo.

$$f_{DG1,j}^{HX8} + f_{DG1,j}^{enzs1} + f_{DG1,j}^{naocls1} = f_{CN3,j}^{DG1} \quad (B.125)$$

$$\forall j \in \{agu, enz, naocl\}$$

$$f_{DG1,j}^{HX8} + f_{DG1,j}^{enzs1} + f_{DG1,j}^{naocls1} + R_j^{DG1} \cdot (f_{DG1,pha}^{HX8}) = f_{CN3,j}^{DG1} \quad (B.126)$$

$$\forall j \in \{bmr, pha\}$$

La concentración enzimática dentro del digestor resulta del 2 % (Posada *et al.*, 2011), para ello se plantea la siguiente ecuación.

$$f_{DG1,enz}^{enzs1} = Q_{enz}^{enzs1} \cdot \sum_j (f_{DG1,j}^{HX8} + f_{DG1,j}^{enzs1} + f_{DG1,j}^{naocls1}) \quad (B.127)$$

$$\forall j \in \{agu, bmr, enz, naocl, pha\}$$

La cantidad de NaOCl al 30 % en peso (Posada *et al.*, 2011) que ingresa al digestor es función de la cantidad de biomasa total dentro del mismo como se muestra a continuación.

$$\sum_j f_{DG1,j}^{naocls1} = Q_{DG1}^{naocls1} \cdot (f_{DG1,bmr}^{HX8} + f_{DG1,pha}^{HX8}) \quad (B.128)$$

$$\forall j \in \{agu, naocl\}$$

$$f_{DG1,j}^{naocls1} = Q_j^{naocls1} \cdot \sum_j f_{DG1,j}^{naocls1} \quad (B.129)$$

$$\forall j \in \{agu, naocl\}$$

Centrífuga (CN3)

El balance de masa en la centrífuga asegura que el caudal másico proveniente del reactor de neutralización es igual a la suma de la corriente que se dirige al decantador y una corriente de desperdicios.

$$f_{CN3,j}^{DG1} = f_{TK4,j}^{CN3} + f_{wst20,j}^{CN3} \quad (B.130)$$

$$\forall j \in \{agu, bmr, enz, naocl, pha\}$$

Los componentes que se extraen como desperdicio en la centrífuga se calculan a partir de la siguiente ecuación.

$$f_{wst20,j}^{CN3} = P_j^{CN3} \cdot f_{CN3,j}^{DG1} \quad (B.131)$$

$$\forall j \in \{bmr, enz, naocl\}$$

Tanque de lavado (TK4)

La corriente de salida del tanque de lavado es igual a la suma de la corriente proveniente de la centrífuga y el caudal de peróxido de hidrógeno que ingresa al mismo como se muestra en la siguiente ecuación.

$$f_{TK4,j}^{CN3} + f_{TK4,h2o2}^{h2o2s1} = f_{HX9,j}^{TK4} \quad (B.132)$$

$$\forall j \in \{agu, h2o2, pha\}$$

La cantidad de peróxido de hidrogeno que ingresa al tanque de remojo se calcula a partir de la siguiente ecuación.

$$f_{TK4,j}^{h2o2s1} = Q_j^{h2o2s1} \cdot f_{TK4,pha}^{CN3} \quad (B.133)$$

$$\forall j \in \{agu, h2o2\}$$

Intercambiador de calor (HX9)

La corriente de entrada al intercambiador de calor es igual a la corriente de salida del mismo como se plantea a continuación.

$$f_{HX9,j}^{TK4} = f_{FL6,j}^{HX9} \quad (B.134)$$

$$\forall j \in \{agu, h2o2, pha\}$$

#### Flash 6 (FL6)

El balance de masa en el flash asegura que la suma de los componentes que ingresan desde el intercambiador de calor iguala a la suma de las especies que se van por tope y fondo.

$$f_{FL6,j}^{HX9} = f_{SD2,j}^{FL6} + f_{wst21,j}^{FL6} \quad (B.135)$$

$$\forall j \in \{agu, h2o2, pha\}$$

En este punto, la pureza del PHA en la corriente de salida del destilador flash es del 53%, lo cual se representa mediante la siguiente ecuación.

$$f_{wst21,pha}^{FL6} = P_{pha}^{FL6} \cdot \sum_j f_{FL6,j}^{HX9} \quad (B.136)$$

$$\forall j \in \{agu, h2o2, pha\}$$

La Tabla B.6 muestra los valores los parámetros que se utilizan en los balances de masa correspondientes al sector de extracción enzimática.

**Tabla B.6.** Parámetros utilizados en los balances de masa asociados al sector de extracción enzimática.

Parámetro	Valor	Unidades	Referencia
$R_{bmr}^{DG1}$	0,097	-	Tan <i>et al.</i> (2014)
$R_{pha}^{DG1}$	-0,097	-	Tan <i>et al.</i> (2014)
$Q_{enz}^{enzs1}$	0,02	kg enz/kg tot	Posada <i>et al.</i> (2011)
$Q_{DG1}^{naocls1}$	0,5	kg sol/kg tot	Posada <i>et al.</i> (2011)
$Q_{agu}^{naocls1}$	0,7	kg agu/kg tot	Posada <i>et al.</i> (2011)
$Q_{naocl}^{naocls1}$	0,3	kg naocl/kg tot	Posada <i>et al.</i> (2011)
$P_{bmr}^{CN3}$	1	-	N/A

$P_{enz}^{CN3}$	1	-	N/A
$P_{naocl}^{CN3}$	1	-	N/A
$Q_{agu}^{h2o2s1}$	3,00135	kg agu/kg pha	Harding et al. (2007)
$Q_{h2o2}^{h2o2s1}$	0,0529	kg h2o2/kg pha	Harding et al. (2007)
$P_{pha}^{FL6}$	0,53	kg pha/kg tot	Posada et al. (2011)

### B.1.3.2. Extracción con solvente

El sector de extracción mediante el empleo de solvente como principal agente extractor se modela matemáticamente mediante la implementación de las siguientes ecuaciones.

#### Homogeneizador (TK5)

La suma de los componentes que ingresan al homogeneizador es igual al caudal de salida del equipo debido a que no existe reacción química.

$$f_{TK5,j}^{DU9} = f_{CN4,j}^{TK5} \quad (B.137)$$

$$\forall j \in \{agu, bmr, pha\}$$

#### Centrífuga (CN4)

El balance de masa en la centrífuga asegura que el caudal másico proveniente del homogeneizador es igual a la suma de la corriente que se dirige al intercambiador y una corriente de desperdicios.

$$f_{CN4,j}^{TK5} = f_{HX10,j}^{CN4} + f_{wst21,j}^{CN4} \quad (B.138)$$

$$\forall j \in \{agu, bmr, pha\}$$

Los componentes que se envían al intercambiador de calor se modelan mediante la siguiente ecuación.

$$f_{HX10,j}^{CN4} = P_j^{CN4} \cdot f_{CN4,j}^{TK5} \quad (B.139)$$

$$\forall j \in \{agu, bmr, pha\}$$

Intercambiador de calor (HX10)

La corriente de entrada al intercambiador de calor es igual a la corriente de salida del mismo como se plantea a continuación.

$$f_{HX10,j}^{CN4} = f_{EX,j}^{HX10} \quad (B.140)$$

$$\forall j \in \{agu, bmr, pha\}$$

Extractor (EX)

El balance de masa en este equipo afirma que la suma de los componentes que ingresan desde los intercambiadores de calor HX10 y HX11 resulta igual a la corriente de salida que se dirige a la centrífuga CN5. En este equipo, también se tiene en cuenta una pérdida de solvente y un porcentaje en la recuperación del solvente como se muestra a continuación.

$$f_{EX,j}^{HX10} + f_{EX,j}^{HX11} + R_j^{EX} \cdot (f_{EX,j}^{HX10} + f_{EX,j}^{HX11}) = f_{CN5,j}^{EX} \quad (B.141)$$

$$\forall j \in \{agu, des\}$$

$$f_{EX,j}^{HX10} + f_{EX,j}^{HX11} + R_j^{EX} \cdot f_{EX,j}^{HX10} = f_{CN5,j}^{EX} \quad (B.142)$$

$$\forall j \in \{bmr, pha\}$$

Intercambiador de calor (HX11)

Las corrientes de entrada al intercambiador de calor se igualan a la corriente másica que se dirige al extractor EX.

$$f_{HX11,j}^{DC2} + f_{HX11,j}^{dess} = f_{EX,j}^{HX11} \quad (B.143)$$

$$\forall j \in \{agu, bmr, des, pha\}$$

La cantidad del solvente que ingresa al sector de extracción mediante el intercambiador de calor HX11 se establece mediante la siguiente ecuación.

$$f_{HX11,j}^{DC2} + f_{HX11,j}^{dess} = P_j^{dess} \cdot (f_{EX,bmr}^{HX10} + f_{EX,pha}^{HX10}) \quad (B.144)$$



$$\forall j \in \{des\}$$

### Centrífuga (CN5)

El balance de masa en la centrífuga asegura que el caudal másico proveniente del extractor es igual a la suma de la corriente que se dirige al intercambiador de calor *HX12* y una corriente de desperdicios.

$$f_{CN5,j}^{EX} = f_{HX12,j}^{CN5} + f_{wst22,j}^{CN5} \quad (B.145)$$

$$\forall j \in \{agu, bmr, des, pha\}$$

Los componentes eliminados mediante el proceso de centrifugación se calculan mediante la siguiente ecuación.

$$f_{wst22,j}^{CN5} = P_j^{CN5} \cdot f_{CN5,j}^{EX} \quad (B.146)$$

$$\forall j \in \{agu, bmr, des, pha\}$$

### Intercambiador de calor (HX12)

La corriente de entrada al intercambiador de calor es igual a la corriente de salida del mismo debido a que existe reacción química.

$$f_{HX12,j}^{CN5} = f_{DC2,j}^{HX12} \quad (B.147)$$

$$\forall j \in \{agu, bmr, des, pha\}$$

### Decantador (DC2)

El balance de masa en el decantador asegura que la suma de componentes provenientes del intercambiador de calor *HX12* es igual a la suma de los componentes que se recirculan por *HX11* y los que se dirigen al secador por spray *SD2*

$$f_{DC2,j}^{HX12} = f_{HX11,j}^{DC2} + f_{SD2,j}^{DC2} \quad (B.148)$$

$$\forall j \in \{agu, bmr, des, pha\}$$

La composición de la corriente que se recircula mediante el intercambiador de calor  $HX11$  queda establecida mediante la siguiente ecuación.

$$f_{HX11,j}^{DC2} = P_j^{DC2} \cdot f_{DC2,j}^{HX12} \quad (B.149)$$

$$\forall j \in \{agu, des\}$$

La Tabla B.7 muestra los valores los parámetros que se utilizan en los balances de masa correspondientes al sector de extracción mediante el empleo de solvente.

**Tabla B.7.** Parámetros utilizados en los balances de masa asociados al sector de extracción por solvente.

Parámetro	Valor	Unidades	Referencia
$P_{agu}^{CN4}$	0,3	-	N/A
$P_{bmr}^{CN4}$	1	-	N/A
$P_{pha}^{CN4}$	1	-	N/A
$R_{bmr}^{EX}$	0,1	-	Jacquel <i>et al.</i> (2008)
$R_{des}^{EX}$	-0,01	-	N/A
$R_{pha}^{EX}$	-0,1	-	Jacquel <i>et al.</i> (2008)
$P_{des}^{dess}$	20	<i>kg des/kg tot</i>	Jacquel <i>et al.</i> (2008)
$P_{agu}^{CN5}$	0,3	-	N/A
$P_{bmr}^{CN5}$	1	-	N/A
$P_{des}^{CN5}$	0,05	-	N/A
$P_{pha}^{CN5}$	0,05	-	N/A
$P_{agu}^{DC2}$	0,1	-	N/A
$P_{des}^{DC2}$	0,98	-	N/A

### B.1.3.3. Extracción con surfactante-NaOCI

Los balances de masas correspondientes a la tercera tecnología de extracción la cual involucra la utilización de surfactante se modelan mediante las ecuaciones que se muestran a continuación.

#### Tanque (TK6)

La suma de los componentes que ingresan al tanque *TK6* es igual al caudal de salida del equipo debido a que no existe reacción química.

$$f_{TK6,j}^{DU9} + f_{TK6,j}^{naohs1} = f_{DG2,j}^{TK6} \quad (B.150)$$

$$\forall j \in \{agu, bmr, naoh, pha\}$$

La cantidad NaOH que ingresa al tanque *TK6* es función de la cantidad de biomasa total dentro del mismo como se muestra a continuación.

$$\sum_j f_{TK6,j}^{naohs1} = Q_{TK6}^{naohs1} \cdot (f_{TK6,bmr}^{DU9} + f_{TK6,pha}^{DU9}) \quad (B.151)$$

$$\forall j \in \{agu, naoh\}$$

$$f_{TK6,j}^{naohs1} = Q_j^{naohs1} \cdot \sum_j f_{TK6,j}^{naohs1} \quad (B.152)$$

$$\forall j \in \{agu, naoh\}$$

#### Digestor (DG2)

La corriente de salida del digestor *DG2* es igual a la suma de los caudales de entrada proveniente del tanque *TK6* y las corrientes de químicos destinados a la lisis celular más/menos lo que se genera/consume en el interior del mismo.

$$f_{DG2,j}^{TK6} + f_{DG2,j}^{sdss} + f_{DG2,j}^{naocls2} = f_{CN6,j}^{DG2} \quad (B.153)$$

$$\forall j \in \{agu, naocl, naoh, sds\}$$

$$f_{DG2,j}^{TK6} + f_{DG2,j}^{sdss} + f_{DG2,j}^{naocls2} + R_j^{DG2} \cdot (f_{DG2,pha}^{TK6}) = f_{CN6,j}^{DG2} \quad (B.154)$$

$$\forall j \in \{bmr, pha\}$$

La cantidad de surfactante que ingresa al digestor se establece a partir de la cantidad de biomasa total que ingresa al equipo mediante la siguiente ecuación.

$$f_{DG2,sds}^{sdss} = Q_{sds}^{sdss} \cdot (f_{DG2,bmr}^{TK6} + f_{DG2,pha}^{TK6}) \quad (B.155)$$

La cantidad de NaOCl necesaria para la ruptura de la membrana celular para esta alternativa tecnológica se determina a partir de la siguiente ecuación.

$$\sum_j f_{DG2,j}^{naocls2} = Q_{DG2}^{naocls2} \cdot (f_{DG2,bmr}^{TK6} + f_{DG2,pha}^{TK6}) \quad (B.156)$$

$$\forall j \in \{agu, naocl\}$$

$$f_{DG2,j}^{naocls2} = Q_j^{naocls2} \cdot \sum_j f_{DG2,j}^{naocls2} \quad (B.157)$$

$$\forall j \in \{agu, naocl\}$$

### Centrífuga (CN6)

La suma de los componentes provenientes del digestor *DG2* es equivalente a la suma de los componentes que se envían al tanque de lavado *TK7* y la corriente de desecho *wst23*.

$$f_{CN6,j}^{DG2} = f_{TK7,j}^{CN6} + f_{wst23,j}^{CN6} \quad (B.158)$$

$$\forall j \in \{agu, bmr, naocl, naoh, pha, sds\}$$

Los componentes eliminados mediante el proceso de centrifugación se calculan mediante la siguiente ecuación.

$$f_{wst23,j}^{CN6} = P_j^{CN6} \cdot f_{CN6,j}^{DG2} \quad (B.159)$$

$$\forall j \in \{agu, bmr, naocl, naoh, pha, sds\}$$

### Tanque (TK7)

El balance de masa en el tanque *TK7* confirma que la suma de los componentes que ingresan por las corrientes provenientes desde la centrífuga

CN6 y la de lavado  $h2o2s2$  es igual a la suma de componentes que se dirigen al intercambiador de calor  $HX13$

$$f_{TK7,j}^{CN6} + f_{TK7,j}^{h2o2s2} = f_{HX13,j}^{TK7} \quad (B.160)$$

$$\forall j \in \{agu, h2o2, pha\}$$

La cantidad de peróxido de hidrogeno diluido que ingresa al tanque de lavado viene dado por la siguiente ecuación.

$$f_{TK7,j}^{h2o2s2} = P_j^{TK7} \cdot f_{CN6,pha}^{DG2} \quad (B.161)$$

$$\forall j \in \{agu, h2o2\}$$

#### Intercambiador de calor (HX13)

La corriente de entrada al intercambiador de calor es igual a la corriente de salida del mismo debido a que existe reacción química.

$$f_{HX13,j}^{TK7} = f_{FL7,j}^{HX13} \quad (B.162)$$

$$\forall j \in \{agu, h2o2, pha\}$$

#### Flash 7 (FL7)

El balance de masa en el flash asegura que la suma de los componentes que ingresan desde el intercambiador de calor  $HX13$  igualan a la suma de las especies que se van por tope y fondo.

$$f_{FL7,j}^{HX3} = f_{SD2,j}^{FL7} + f_{wst24,j}^{FL7} \quad (B.163)$$

$$\forall j \in \{agu, h2o2, pha\}$$

En este punto, la pureza del PHA en la corriente de salida del destilador flash es del 25,2 %, lo cual se representa mediante la siguiente ecuación.

$$f_{SD2,pha}^{FL7} = P_{pha}^{FL7} \cdot \sum_j f_{FL7,j}^{HX13} \quad (B.164)$$

$$\forall j \in \{agu, h2o2, pha\}$$

La Tabla B.8 muestra los valores los parámetros que se utilizan en los balances de masa correspondientes al sector de extracción con surfactante.

**Tabla B.8.** Parámetros utilizados en los balances de masa asociados al sector de extracción con surfactante.

Parámetro	Valor	Unidades	Referencia
$Q_{TK6}^{naohs1}$	0,4	kg base/kg tot	Tamer <i>et al.</i> (1998)
$Q_{agu}^{naohs1}$	0,8929	kg agu/kg base	Tamer <i>et al.</i> (1998)
$Q_{naoh}^{naohs1}$	0,1071	kg naoh/kg base	Tamer <i>et al.</i> (1998)
$R_{bmr}^{DG2}$	0,13001	kg bmr/kg pha	Dong & Sun (2000)
$R_{pha}^{DG2}$	-0,13001	-	Dong & Sun (2000)
$Q_{sds}^{sdss}$	0,3333	kg sds/kg tot	Dong & Sun (2000)
$Q_{DG2}^{naocls2}$	0,3333	kg naocl/kg tot	Posada <i>et al.</i> (2011)
$Q_{agu}^{naocls2}$	0,7	kg agu/kg tot	Posada <i>et al.</i> (2011)
$Q_{naocl}^{naocls2}$	0,3	kg naocl/kg tot	Posada <i>et al.</i> (2011)
$P_{agu}^{CN6}$	0,3	-	N/A
$P_{bmr}^{CN6}$	1	-	N/A
$P_{naocl}^{CN6}$	1	-	N/A
$P_{naoh}^{CN6}$	1	-	N/A
$P_{pha}^{CN6}$	0,05	-	N/A
$P_{sds}^{CN6}$	1	-	N/A
$P_{agu}^{TK7}$	3,00135	kg agu/kg pha	Harding (2007)
$P_{h2o2}^{TK7}$	0,0529	kg h2o2/kg pha	Harding (2007)
$P_{pha}^{FL7}$	0,252	kg pha/kg tot	Posada <i>et al.</i> (2011)

#### B.1.3.4. Extracción con surfactante y quelato

Los balances de masa del sector de extracción por surfactante y quelato se representan mediante las siguientes ecuaciones.

Digestor (DG3)

La corriente de salida del digestor  $DG3$  es igual a la suma de los caudales de entrada más/menos lo que se genera/consume en el interior del mismo.

$$f_{DG3,j}^{DU} + f_{DG3,j}^{srfs1} + f_{DG3,j}^{h2os5} + f_{DG3,j}^{chels1} + R_j^{DG3} (f_{DG3,j}^{DU} + f_{DG3,j}^{srfs1} + f_{DG3,j}^{h2os5} + f_{DG3,j}^{chels1}) = f_{CN7,j}^{DG3} \quad (B.165)$$

$$\forall j \in \{agu, chel, srf\}$$

$$f_{DG3,j}^{DU} + f_{DG3,j}^{srfs1} + f_{DG3,j}^{h2os5} + f_{DG3,j}^{chels1} + R_j^{DG3} \cdot (f_{DG3,pha}^{DU}) = f_{CN7,j}^{DG3} \quad (B.166)$$

$$\forall j \in \{bmr, pha\}$$

La cantidad de surfactante que ingresa al digestor se establece a partir de la cantidad de biomasa total que ingresa al equipo mediante la siguiente ecuación.

$$f_{DG3,srf}^{srfs1} = Q_{srf}^{srfs1} \cdot (f_{DG3,bmr}^{DU} + f_{DG3,pha}^{DU}) \quad (B.167)$$

La cantidad de quelato que ingresa al digestor se establece a partir de la cantidad de biomasa total que ingresa al equipo mediante la siguiente ecuación.

$$f_{DG3,chel}^{chels1} = Q_{chel}^{chels1} \cdot (f_{DG3,bmr}^{DU} + f_{DG3,pha}^{DU}) \quad (B.168)$$

La cantidad de agua necesaria para la dilución del surfactante y quelato mediante la corriente  $h2os5$  se calcula a partir de la ecuación que se muestra a continuación.

$$f_{DG3,agu}^{h2os5} = Q_{agu}^{h2os5} \cdot (f_{DG3,srf}^{srfs1} + f_{DG3,chel}^{chels1}) \quad (B.169)$$

Centrífuga (CN7)

La suma de los componentes provenientes del digestor  $DG3$  es equivalente a la suma de los componentes que se envían al digestor  $DG4$ .

$$f_{CN7,j}^{DG3} = f_{DG4,j}^{CN7} \quad (B.170)$$

$$\forall j \in \{agu, bmr, chel, pha, srf\}$$

#### Digestor (DG4)

La corriente de salida del digestor  $DG4$  es igual a la suma de los caudales de entrada más/menos lo que se genera/consume en el interior del mismo.

$$\begin{aligned} f_{DG4,j}^{CN7} + f_{DG4,j}^{srfs2} + f_{DG4,j}^{naohs2} + f_{DG4,j}^{h2os6} + f_{DG4,j}^{chels2} + f_{DG4,j}^{RC3} \\ + R_j^{DG4} (f_{DG4,j}^{CN7} + f_{DG4,j}^{srfs2} + f_{DG4,j}^{naohs2} + f_{DG4,j}^{h2os6} + f_{DG4,j}^{chels2} \\ + f_{DG4,j}^{RC3}) = f_{CN8,j}^{DG4} \end{aligned} \quad (B.171)$$

$$\forall j \in \{agu, chel, naoh, srf\}$$

$$f_{DG4,j}^{CN7} + R_j^{DG4} \cdot (f_{DG4,j}^{CN7}) = f_{CN8,j}^{DG4} \quad (B.172)$$

$$\forall j \in \{bmr, pha\}$$

La cantidad de surfactante que ingresa al digestor se establece a partir de la cantidad de biomasa total que ingresa al equipo mediante la siguiente ecuación.

$$f_{DG4,srf}^{srfs2} = Q_{srf}^{srfs2} \cdot (f_{DG4,bmr}^{CN7} + f_{DG4,pha}^{CN7}) \quad (B.173)$$

La cantidad de quelato que ingresa al digestor se establece a partir de la cantidad de biomasa total que ingresa al equipo mediante la siguiente ecuación.

$$f_{DG4,chel}^{chels2} = Q_{chel}^{chels2} \cdot (f_{DG4,bmr}^{CN7} + f_{DG4,pha}^{CN7}) \quad (B.174)$$

La cantidad de hidróxido de sodio que ingresa al digestor se establece a partir de la cantidad de agua que se encuentra contenida por el digestor según la siguiente ecuación.



$$f_{DG4,naoh}^{naohs2} = Q_{naoh}^{naoh2} \cdot f_{CN8,agu}^{DG4} \quad (B.175)$$

La cantidad de agua necesaria para la dilución del surfactante y quelato junto con el hidróxido de sodio se establece a mediante la siguiente ecuación.

$$f_{DG4,agu}^{h2os6} + f_{DG4,agu}^{RC3} = Q_{agu}^{h2os6} \cdot (f_{DG4,bmr}^{CN7} + f_{DG4,pha}^{CN7}) + Q_{agunaoh}^{h2os6} \cdot f_{DG4,naoh}^{naohs2} \quad (B.176)$$

### Centrífuga (CN8)

La suma de los componentes provenientes del digestor *DG4* es equivalente a la suma de los componentes que se envían al reactor *RC2* y la corriente que se envía al reactor *RC4*.

$$f_{CN8,j}^{DG4} = f_{RC2,j}^{CN8} + f_{RC4,j}^{CN8} \quad (B.177)$$

$$\forall j \in \{agu, bmr, pha\}$$

Los componentes que se envían al reactor *RC4* se establecen mediante la siguiente ecuación.

$$f_{RC4,j}^{CN8} = P_j^{CN8} \cdot f_{CN8,j}^{DG4} \quad (B.178)$$

$$\forall j \in \{agu, bmr, pha\}$$

### Reactor (RC2)

La corriente de salida del reactor *RC2* es igual a la suma de los caudales de entrada ya que no se considera reacción química en este equipo.

$$f_{RC2,j}^{CN8} + f_{RC2,j}^{hcls2} = f_{CN9,j}^{RC2} \quad (B.179)$$

$$\forall j \in \{agu, hcl\}$$

La cantidad de HCL que ingresa al reactor *RC2* se calcula a partir de las siguientes ecuaciones de modo que el pH del agua alcance un valor de 3 dentro de este equipo según la recomendación de Chen *et al.* (2001).

$$f_{RC2,hcl}^{hcls2} = Q_{RC2}^{hcls2} \cdot f_{CN9,agu}^{RC2} \quad (B.180)$$

$$f_{RC2,j}^{hcls2} = Q_j^{hcls2} \cdot f_{RC2,hcl}^{hcls2} \quad (B.181)$$

$$\forall j \in \{agu, hcl\}$$

### Centrífuga (CN9)

La suma de los componentes provenientes del reactor  $RC2$  es equivalente a la suma de los componentes que se envían al reactor  $RC3$  y la corriente de desperdicios  $wst25$ .

$$f_{CN9,j}^{RC2} = f_{RC3,j}^{CN9} + f_{wst25,j}^{CN9} \quad (B.182)$$

$$\forall j \in \{agu, hcl\}$$

Los componentes que se eliminan vienen descritos mediante la ecuación que se muestra a continuación.

$$f_{wst25,j}^{CN9} = P_j^{CN9} \cdot f_{CN9,j}^{RC2} \quad (B.183)$$

$$\forall j \in \{agu, hcl\}$$

### Reactor (RC3)

La corriente de salida del reactor  $RC3$  es igual a la suma de los caudales de entrada menos lo que se consume de carbón activado dentro de este equipo como se muestra a continuación.

$$f_{RC3,j}^{CN9} + f_{RC3,j}^{cacts} + R_j^{RC3} \cdot f_{RC3,j}^{cacts} = f_{DG4,j}^{RC3} + f_{wst26,j}^{RC3} \quad (B.184)$$

$$\forall j \in \{agu, cact\}$$

La cantidad de carbón activado que se añade al reactor  $RC3$  se establece mediante la siguiente ecuación con el objetivo que la concentración del mismo sea del 5 % en peso como sugiere Chen *et al.* (2001).

$$f_{RC3,cact}^{cacts} = Q_{RC3}^{cacts} \cdot (f_{RC3,agu}^{CN9} + f_{RC3,cact}^{cacts}) \quad (B.185)$$

En este punto, se considera una pérdida de agua del 10 % la cual se modela mediante la utilización de la siguiente ecuación.

$$f_{wst26,agu}^{RC3} = P_{agu}^{RC3} \cdot f_{RC3,agu}^{CN9} \quad (B.186)$$

### Reactor (RC4)

La corriente de salida del reactor  $RC4$  es igual a la suma de los caudales de entrada como se muestra a continuación.

$$f_{RC4,j}^{CN8} + f_{RC4,j}^{FL8} + f_{RC4,j}^{h2os7} + f_{RC4,j}^{acets} = f_{CN10,j}^{RC4} \quad (B.187)$$

$$\forall j \in \{acet, agu, bmr, pha\}$$

Las cantidades de agua y acetona que ingresan a este equipo donde se realiza el lavado del biopolímero se calculan a partir de las siguientes ecuaciones.

$$f_{RC4,agu}^{h2os7} = Q_{RC4}^{h2os7} \cdot \left( \frac{\rho_{agu}}{\rho_{pha}} \right) \cdot f_{RC4,pha}^{CN8} \quad (B.188)$$

$$f_{RC4,acet}^{FL8} + f_{RC4,acet}^{acets} = Q_{RC4}^{acets} \cdot \left( \frac{\rho_{acet}}{\rho_{pha}} \right) \cdot f_{RC4,pha}^{CN8} \quad (B.189)$$

### Centrífuga (CN10)

La suma de los componentes provenientes del reactor  $RC4$  es equivalente a la suma de los componentes que se envían al flash  $FL8$  con el objetivo de recuperar la acetona y la corriente de procesos que se envía al sector de purificación de PHA.

$$f_{CN10,j}^{RC4} = f_{FL8,j}^{CN10} + f_{SD2,j}^{CN10} \quad (B.190)$$

$$\forall j \in \{acet, agu, bmr, pha\}$$

Los componentes que se envían al secador tipo spray  $SD2$  se modelan mediante la siguiente ecuación.

$$f_{SD2,j}^{CN10} = P_j^{CN10} \cdot f_{CN10,j}^{RC4} \quad (\text{B.191})$$

$$\forall j \in \{agu, pha\}$$

### Flash 8 (FL8)

El balance de masa en el flash asegura que la suma de los componentes que ingresan desde la centrífuga CN10 igualan a la suma de las especies que se van por tope y fondo.

$$f_{FL8,j}^{CN10} = f_{RC4,j}^{FL8} + f_{wst27,j}^{FL8} \quad (\text{B.192})$$

$$\forall j \in \{acet, agu\}$$

En este punto, se considera que la recuperación de acetona es un 50 % respecto a lo que ingresa al destilador flash como se muestra en la siguiente ecuación.

$$f_{RC4,acet}^{FL8} = P_{acet}^{FL7} \cdot f_{FL8,acet}^{CN10} \quad (\text{B.193})$$

La Tabla B.9 muestra los valores los parámetros que se utilizan en los balances de masa correspondientes al sector de extracción con surfactante y quelato.

**Tabla B.9.** Parámetros utilizados en los balances de masa asociados al sector de extracción con surfactante y quelato.

Parámetro	Valor	Unidades	Referencia
$R_{chel}^{DG3}$	-1	-	Chen <i>et al.</i> (2001)
$R_{srf}^{DG3}$	-1	-	Chen <i>et al.</i> (2001)
$R_{bmr}^{DG3}$	0,1	kg bmr/kg pha	N/A
$R_{pha}^{DG3}$	-0,1	-	N/A
$Q_{srf}^{srf s1}$	0,12	kg srf/kg tot	Chen <i>et al.</i> (2001)
$Q_{agu}^{h2os5}$	125	kg agu/kg tot	Chen <i>et al.</i> (1999)
$Q_{chel}^{chels1}$	0,08	kg chel/kg tot	Chen <i>et al.</i> (2001)

$R_{chel}^{DG4}$	-1	-	N/A
$R_{naoh}^{DG4}$	-1	-	N/A
$R_{srf}^{DG4}$	-1	-	N/A
$Q_{srf}^{srf s2}$	0,0075	kg srf/kg tot	Chen et al. (2001)
$Q_{chel}^{chels2}$	0,01	kg chel/kg tot	Chen et al. (2001)
$Q_{naoh}^{naohs2}$	0,004	kg naoh/kg agu	Chen et al. (2001)
$Q_{agu}^{h2os6}$	50	kg agu/kg tot	N/A
$Q_{agunaoh}^{h2os6}$	5	-	Chen et al. (2001)
$P_{agu}^{CN8}$	0,15	-	N/A
$P_{bmr}^{CN8}$	1	-	N/A
$P_{pha}^{CN8}$	1	-	N/A
$Q_{RC2}^{hcls2}$	0,0000365	kg hcl/kg agu	Chen et al. (2001)
$Q_{RC2,agu}^{hcls2}$	6,84932	kg agu/kg hcl	Chen et al. (2001)
$P_{agu}^{CN9}$	0,15	-	N/A
$P_{hcl}^{CN9}$	1	-	N/A
$R_{cact}^{RC3}$	-1	-	N/A
$Q_{RC3}^{cacts}$	0,05	kg cact/kg tot	Chen et al. (2001)
$P_{agu}^{RC3}$	0,1	-	N/A
$Q_{RC4}^{h2os7}$	1	$m^3agu/ m^3pha$	N/A
$Q_{RC4}^{acets}$	4	$m^3acet/ m^3pha$	Chen et al. (2001)
$P_{agu}^{CN10}$	0,4	-	N/A
$P_{pha}^{CN10}$	0,98	-	N/A
$P_{acet}^{FL7}$	0,5	-	N/A

### B.1.4. Purificación

#### Secador spray (SD2)

El balance de masa por componentes en el secador tipo spray destinado a la purificación del biopolímero confirma que la suma de las corrientes que ingresa desde los distintos sectores de extracción es igual a la corriente que se elimina como desecho del proceso más la correspondiente a la de PHA purificado.

$$f_{SD2,j}^{FL6} + f_{SD2,j}^{DC2} + f_{SD2,j}^{FL7} + f_{SD2,j}^{CN10} = f_{wst28,j}^{SD2} + f_{phas,j}^{SD2} \quad (B.194)$$

$$\forall j \in \{agu, des, h2o2, pha\}$$

La cantidad de agua que debe eliminarse en este proceso de secado s establece mediante la siguiente ecuación considerando la obtención de un producto completamente puro.

$$f_{wst28,j}^{SD2} = P_j^{SD2} \cdot (f_{SD2,j}^{FL6} + f_{SD2,j}^{DC2} + f_{SD2,j}^{FL7} + f_{SD2,j}^{CN10}) \quad (B.195)$$

$$\forall j \in \{agu, des, h2o2\}$$

La Tabla B.10 muestra los valores los parámetros que se utilizan en los balances de masa correspondientes al sector de purificación mediante la utilización de un secador tipo spray.

**Tabla B.10.** Parámetros utilizados en los balances de masa asociados al sector de purificación.

Parámetro	Valor	Unidades	Referencia
$P_{agu}^{SD2}$	1	-	N/A
$P_{des}^{SD2}$	1	-	N/A
$P_{acet}^{SD2}$	1	-	N/A

### B.2. Balances de energía

La energía térmica consumida por los potenciales equipos utilizados en la superestructura ( $ETC_{\theta}$ ), en kJ/h, se calcula mediante la siguiente ecuación.

$$ETC_{\theta} = \sum_{term} Q_{\theta} \quad (B.196)$$

$$\forall term \in \left\{ \begin{array}{l} HX8 - 13, ST1 - 3, FL1 - 3, FL5, CL, RC3, FL8, DG3 - 4, \\ TK5 - 6, DS1 - 2, SD2 \end{array} \right\}$$

A continuación, se detallan las ecuaciones utilizadas para el cálculo de la energía térmica requerida por los equipos que se mencionan debajo.

$$Q_{\theta} = cp_{\theta} \cdot \Delta T \cdot \sum_{j=1}^{39} f_{\theta,j}^k + \Delta H_{vap\theta} \cdot \sum_{j=1}^{39} f_{k,j}^{\theta} \quad (B.197)$$

$$\forall \theta \in \{FL1 - 3, FL5, CL, RC3, FL8, DG3 - 4, TK5 - 6\}$$

**Tabla B.11.** Parámetros de consumo energético.

Equipo	$cp$ (kJ/kg°C)	$\Delta T$ (°C)	$\Delta H_{vap}$ (kJ/kg)	Referencia
FL1	2,692	95	1391	Hysys (2013)
FL2	2,568	86	2568	Hysys (2013)
FL3	4,221	75	2268	Hysys (2013)
FL5	4,352	46,3	2270	Hysys (2013) Van der veen <i>et al.</i> (2006)
FL8	3,691	15	600,3	Hysys (2013)
CL	4,729	40	-	Hysys (2013)
RC3	4,221	65	2256	Hysys (2013)
DG3	3,033	15	-	Hysys (2013) Chen <i>et al.</i> (2001)
DG4	3,033	15	-	Hysys (2013) Chen <i>et al.</i> (2001)
TK5	3,033	67	1437	Hysys (2013) Posada <i>et al.</i> (2011)
TK6	3,204	20	-	Hysys (2013)

$$Q_{\theta} = ECR_{\theta} \cdot \sum_{j=1}^{39} f_{\theta,j}^k \quad (\text{B.198})$$

$$\forall \theta \in \{DS1 - 2, SD2\}$$

**Tabla B.12.** Parámetros de consumo energético de los equipos *DS1 - 2, SD2*

Equipo	Valor	Unidades	Referencia
$ECR_{DS1}$	600,6	<i>kJ/kg</i>	Posada <i>et al.</i> (2011)
$ECR_{DS2}$	504,51	<i>kJ/kg</i>	Posada <i>et al.</i> (2011)
$ECR_{SD2}$	1580	<i>kJ/kg</i>	Posada <i>et al.</i> (2011)

Por otro lado, la energía eléctrica ( $EEC_{\theta}$ ), en *kJ/h*, de los equipos con motores que requieren la utilización de energía eléctrica, se calcula a partir de la siguiente ecuación.

$$EEC_{\theta} = \sum_{elec} Q_{\theta} \quad (\text{B.199})$$

$$\forall elec \in \left\{ \begin{array}{l} RC1 - 4, CT, ML1 - 3, MO1 - 3, TA, TK2 - 7, HX2, RL, RS, \\ BR1 - 14, DR, FR, CL, RD, DG1 - 4, EX, CN1 - 10, HC1 - 2 \end{array} \right\}$$

A continuación, se detallan las ecuaciones utilizadas para el cálculo de la energía eléctrica requerida por los equipos que se mencionan debajo.

$$Q_{\theta} = Pot_{\theta} \cdot 3600 \quad (\text{B.200})$$

$$\forall \theta \in \left\{ \begin{array}{l} RC1 - 4, CT, ML1 - 3, MO1 - 3, TA, TK2 - 7, HX2, RL, RS, \\ BR1 - 14, DR, FR, CL, RD, DG1 - 4, EX \end{array} \right\}$$

$$Q_{\theta} = 400 \cdot \sum_{j=1}^{39} f_{\theta,j}^{k,jsolidos} \quad (\text{B.201})$$

$$\forall \theta \in \{CN1 - 10, HC1 - 2\}$$

La energía producida a partir del bagazo de caña puede ser eléctrica ( $EE_{prod}$ ) y térmica ( $ET_{prod}$ ) en *kJ/h*. Las mismas se calculan a partir de las siguientes ecuaciones con  $EEPR_{\theta}=11036,1$  *kJ/kg* bagazo y  $ETPR_{\theta}=19976,7$  *kJ/kg* bagazo (Moncada *et al.*, 2014).



$$EE_{prod} = EEPR_{\theta} \cdot \sum_{j=1}^{39} f_{\theta,j}^k \quad (B.202)$$

$$ET_{prod} = ETPR_{\theta} \cdot \sum_{j=1}^{39} f_{\theta,j}^k \quad (B.203)$$

### B.3. Correlaciones económicas

A continuación se presentan las ecuaciones empleadas para el cálculo de las variables involucradas en los aspectos económicos del modelo.

Los ingresos totales ( $IT$ ), en \$/año, representan las ganancias obtenidas por la venta de productos y subproductos y se calcula como:

$$IT = E_{prod} + 8760 \cdot \sum_p pr_p \cdot m_p \quad (B.204)$$

$$\forall p \in \{cach, germ, glic, glutf, glutm, met, pha\}$$

Donde

$$E_{prod} = \frac{8760}{3600} \cdot (EE_{prod} \cdot pr_{ee} + ET_{prod} \cdot pr_{et}) \quad (B.205)$$

$pr_p$  es el precio de venta en \$/kg (Tabla B.13) y  $m_p$  es la producción horaria de cada producto o subproducto en kg/h.

$pr_{ee}$  y  $pr_{et}$  son los precios de la energía eléctrica y térmica, respectivamente en \$/kWh.

**Tabla B.13.** Precio de venta de productos y subproductos.

Ítem	Valor	Unidades	Referencia
Cachaza	0,0055	\$/kg	Quintero <i>et al.</i> (2008)
Gérmén	0,296	\$/kg	Ramirez <i>et al.</i> (2008)
Glicerol	0,2574	\$/kg	García Prieto <i>et al.</i> (2017)
Gluten feed	0,08	\$/kg	Ramirez <i>et al.</i> (2008)
Gluten meal	0,4	\$/kg	Ramirez <i>et al.</i> (2008)

Metanol	0,49	\$/kg	Rizwan <i>et al.</i> (2015a)
PHA	3,12	\$/kg	Posada <i>et al.</i> (2011)
Energía eléctrica	0,0678	\$/kWh	eia.gov (2017)
Energía térmica	0,01279	\$/kWh	eia.gov (2017)

Los costos de manufactura ( $C_{manufactura}$ ), en \$/año, vienen dados por la suma de los costos directos ( $C_{directos}$ ) e indirectos ( $C_{indirectos}$ ) involucrados en el proyecto. El primero de ellos tiene en cuenta las materias primas ( $C_{matprimas}$ ), mano de obra ( $C_{mobra}$ ), supervisión ( $C_{superv}$ ), servicios ( $C_{serv}$ ), mantenimiento ( $C_{manten}$ ), suministros ( $C_{suminis}$ ) y gastos de laboratorio ( $C_{lab}$ ), mientras que los costos indirectos tienen en cuenta gastos de planta ( $C_{planta}$ ), impuestos locales ( $C_{implocal}$ ) y seguros ( $C_{seguro}$ ).

$$C_{manufactura} = C_{directos} + C_{indirectos} \quad (B.206)$$

$$C_{directos} = C_{matprimas} + C_{serv} + C_{mobra} + C_{superv} + C_{manten} + C_{suminis} + C_{lab} \quad (B.207)$$

$$C_{indirectos} = C_{planta} + C_{implocal} + C_{seguro} \quad (B.208)$$

Los costos de las materias primas ( $C_{matprimas}$ ), en \$/año, se calculan como:

$$C_{matprimas} = 8760 \cdot \sum_p ct_p \cdot m_p \quad (B.209)$$

$$\forall p \in \{act, agu, amls, amdc, amz, asulf, cal, chel, cñz, des, enz, \gamma mls, hcl, h2o2, mlz, mz, naocl, naoh, glics, sac, sds, srf\}$$

Donde  $ct_p$  es el costo en \$/kg (Tabla B.14) y  $m_p$  es el consumo horario de cada materia prima en kg/h.

**Tabla B.14.** Costo de las materias primas.

Ítem	Valor	Unidades	Referencia
Acetona	0,5	\$/kg	Made-in-china.com (2017)
Agua	0,00008	\$/kg	Rizwan <i>et al.</i> (2015a)
$\alpha$ -amilasa	11,55	\$/kg	Woiciechowski <i>et al.</i> (2002)
Almidón de mandioca	0,34	\$/kg	Thaitapiocastarch.org (2017)
Almidón de maíz	0,2	\$/kg	Alibaba.com (2017)
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,094	\$/kg	Moncada <i>et al.</i> (2014)
CaOH <sub>2</sub>	0,05	\$/kg	Moncada <i>et al.</i> (2013)
Quelato	0,3	\$/kg	Alibaba.com (2017)
Caña de azúcar	0,0245	\$/kg	gain.fas.usda.gov (2017)
DES	3,5	\$/kg	Gong & You (2015)
Enzimas	28	\$/kg	Kapritchkoff <i>et al.</i> (2006)
Glucoamilasa	10	\$/kg	Made-in-china.com (2017)
HCl	0,11	\$/kg	Made-in-china.com (2017)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,25	\$/kg	Alibaba.com (2017)
Melazas	0,12	\$/kg	Alibaba.com (2017)
Maíz	0,132	\$/kg	Ramirez <i>et al.</i> (2009)
NaOCl	0,8	\$/kg	Alibaba.com (2017)
NaOH	0,15	\$/kg	Alibaba.com (2017)
Glicerol crudo	0,044	\$/kg	Posada <i>et al.</i> (2011)
Sacarosa	0,4640	\$/kg	Sugaronline.com (2017)
SDS	1,23	\$/kg	Made-in-china.com (2017)
Surfactante	1	\$/kg	Alibaba.com (2017)

El costo de los servicios ( $C_{serv}$ ), en \$/año, se calcula mediante el producto de los requerimientos energéticos y el costo de los mismos dependiendo si son de naturaleza térmica o eléctrica. Se considera que el costo de la energía ( $pr_{ee}$  y  $pr_{et}$ ) es el mismo que el precio de venta de la energía generada reportada en Tabla B.1.

$$C_{serv} = \frac{8760}{3600} \cdot \left( pr_{ee} \cdot \sum_{\theta} EEC_{\theta} + pr_{et} \cdot \sum_{\theta} ETC_{\theta} \right) \quad (B.210)$$

Los costos de mano de obra ( $C_{mobra}$ ), en \$/año, se encuentran relacionados con la atención requerida por cada uno de los equipos de la planta ( $AT_{eq}$ ) por parte de los operarios. Considerando un turno de cinco personas y un salario anual estimado de 46312,24 \$/año (stats.bls.gov, 2017) el costo de mano de obra puede calcularse a partir de la siguiente ecuación.

$$C_{mobra} = 5 \cdot AT_{eq} \cdot 46312,24 \quad (B.211)$$

Donde:

$AT_{eq}=0,3$  para los flashes, reactores, homogeneizadores, secadores, molinos, biorreactores, recipientes, tanques de lavado, digestores y extractores.

$AT_{eq}=0,1$  para decantadores, esterilizadores, cinta transportadora, filtros y clarificadores.

$AT_{eq}=0,05$  para intercambiadores de calor, centrifugas e hidrociclones.

$$C_{superv} = X_{superv} \cdot C_{mobra} \quad (B.212)$$

$$C_{manten} = X_{manten} \cdot C_{fijo} \quad (B.213)$$

$$C_{suminis} = X_{suminis} \cdot C_{manten} \quad (B.214)$$

$$C_{lab} = X_{lab} \cdot C_{mobra} \quad (B.215)$$

$$C_{planta} = X_{planta} \cdot C_{mobra} \quad (B.216)$$

$$C_{implocal} = X_{implocal} \cdot C_{fijo} \quad (B.217)$$

$$C_{seguro} = X_{seguro} \cdot C_{fijo} \quad (B.218)$$

Los costos de supervisión ( $C_{superv}$ ), mantenimiento ( $C_{manten}$ ), suministros ( $C_{suminis}$ ), gastos de laboratorio ( $C_{lab}$ ), gastos generales ( $C_{generales}$ ), impuestos locales ( $C_{implocal}$ ) y seguros ( $C_{seguro}$ ), en \$/año, se calculan mediante las ecuaciones siguientes con  $X_{superv}=0,3$ ;  $X_{manten}=0,1$ ;  $X_{suminis}=0,2$ ;  $X_{lab}=0,2$ ;  $X_{planta}=0,5$ ;  $X_{implocal}=0,03$ ;  $X_{seguro}=0,02$ .

Por su parte, los gastos generales ( $C_{generales}$ ), en \$/año, se componen de los gastos administrativos ( $C_{admin}$ ), de distribución ( $C_{distr}$ ) e investigación y desarrollo ( $C_{inv}$ ). Los mismos se calculan mediante las siguientes ecuaciones con  $X_{admin}=0,25$ ;  $X_{distr}=0,1$ ;  $X_{inv}=0,05$ .

$$C_{generales} = C_{admin} + C_{distr} + C_{inv} \quad (B.219)$$

$$C_{admin} = X_{admin} \cdot C_{planta} \quad (B.220)$$

$$C_{distr} = X_{distr} \cdot C_{totales} \quad (B.221)$$

$$C_{inv} = X_{inv} \cdot C_{totales} \quad (B.222)$$

Los gastos totales ( $C_{totales}$ ), en \$/año, se calculan a partir de la siguiente ecuación

$$C_{totales} = C_{manufactura} + C_{generales} + DEP \quad (B.223)$$

Donde la depreciación de los equipos ( $DEP$ ) se considera un 10 % del capital fijo ( $C_{fijo}$ ).

El flujo de impuestos antes de impuestos ( $FEAI$ ), en \$/año, se calcula como los ingresos totales ( $IT$ ) menos los costos de manufactura ( $C_{manufactura}$ ) y los costos generales ( $C_{generales}$ ) como se muestra a continuación.

$$FEAI = IT - C_{manufactura} - C_{generales} \quad (B.224)$$

#### B.4. Dimensiones y costos del proceso óptimo

**Tabla B.15.** Dimensiones características y costos de los equipos involucrados en el sector óptimo de purificación de la materia prima.

Equipo	Diámetro (m)	Potencia (kW)	Costo (\$)
<i>TK3</i>	1,342	4,746	$1,85 \cdot 10^5$
<i>MO3</i>	-	39,551	$4,18 \cdot 10^4$
<i>DR</i>	0,538	1,74	$2,30 \cdot 10^5$
<i>FR</i>	-	68,887	$1,72 \cdot 10^6$
<i>TB</i>	-	-	$1,78 \cdot 10^6$
<i>CL</i>	2,372	26,206	$4,75 \cdot 10^5$
<i>RD</i>	-	36,639	$5,09 \cdot 10^4$

**Tabla B.16.** Dimensiones características y costos de los equipos involucrados en el sector óptimo de biosíntesis de PHA.

Equipo	Diámetro (m)	Área (m <sup>2</sup> )	Potencia (kW)	Costo (\$)
<i>ST3</i>	-	305,74	-	$1,52 \cdot 10^5$
<i>HX7</i>	-	252,64	-	$1,35 \cdot 10^5$
<i>BR13</i>	4,63	-	194,87	$1,58 \cdot 10^6$
<i>BR14</i>	4,83	-	221,45	$1,70 \cdot 10^6$
<i>CN2</i>	-	-	-	$6,32 \cdot 10^5$

**Tabla B.17.** Dimensiones características y costos de los equipos involucrados en el sector óptimo de extracción y purificación del biopolímero.

Equipo	Diámetro (m)	Área (m <sup>2</sup> )	Volumen (m <sup>3</sup> )	Potencia (kW)	Costo (\$)
<i>HX8</i>	-	8,52	-	-	2,20.10 <sup>4</sup>
<i>DG1</i>	0,84	-	-	1,16	9,39.10 <sup>4</sup>
<i>CN3</i>	-	-	-	-	3,64.10 <sup>5</sup>
<i>TK4</i>	0,81	-	-	1,04	8,97.10 <sup>4</sup>
<i>HX9</i>	-	138,22	-	-	9,30.10 <sup>4</sup>
<i>FL6</i>	0,95	-	-	-	1,30.10 <sup>5</sup>
<i>SD2</i>	-	-	70,18	-	7,47.10 <sup>5</sup>





## ANEXO C

En este Anexo se presentan de manera detallada los balances de masa planteados en el Capítulo 6 de esta tesis.

### C.1. Balances de masa

#### C.1.1. Producción de biodiesel

Los requerimientos para llevar a cabo el cultivo de microalgas se establecen mediante la corriente de gases de chimenea ( $fgss$ ), nutrientes ( $mnt$  y  $rnt$ ) y agua ( $mwr$  y  $rwr$ ). Las mencionadas corrientes se incorporan al proceso a través de un punto de mezcla y se dirigen a una unidad ficticia  $DU$  la cual podrá convertirse en  $OP$ , si el programa escoge efectuar el crecimiento algal en piletas abiertas, o  $TPBR$ , si se elige el desarrollo de la biomasa en los fotobiorreactores tubulares.

$$\sum_i f_{MIX1,j}^i = f_{DU,j}^{MIX1} \quad (C.1)$$

$$\forall j \in \{agu, cdo, nit, pot\} \quad i \in \{fgss, mnt, rnt, mwr, rwr\}$$

#### Pileta abierta ( $OP$ )

El balance de masa de las especies que ingresan a la pileta abierta ( $OP$ ) asegura que el caudal másico proveniente de la unidad de decisión ( $DU$ ) es igual a una corriente de evaporación ( $f_{evapwr,j}^{OP}$ ) más una corriente rica en microalgas ( $f_{UU,j}^{OP}$ ).

$$f_{OP,j}^{DU} = f_{evapwr,j}^{OP} + f_{UU,j}^{OP} \quad (C.2)$$

$$\forall j \in \{al, agu, cdo, nit, pot\}$$

El agua que se evapora en las piletas abiertas viene dada por un factor de evaporación ( $P_{agu}^{OP}$ ).

$$f_{evapwr,agu}^{OP} = P_{agu}^{OP} \cdot f_{OP,agu}^{DU} \quad (C.3)$$

Los nutrientes y el CO<sub>2</sub> consumidos, como así también la producción de algas se expresan mediante una función de conversión a partir de las siguientes ecuaciones.

$$f_{UU,j}^{OP} = C_j^{OP} \cdot f_{UU,al}^{OP} \quad (C.4)$$

$$\forall j \in \{cdo, nit, pot\}$$

$$f_{UU,al}^{OP} = PR_{al}^{OP} \cdot A_{OP} \quad (C.5)$$

donde  $C_j^{OP}$  es un parámetro de consumo de nutriente en g de nutriente/g de microalga,  $A_{OP}$  es el área en m<sup>2</sup> de la pileta abierta y  $PR_{al}^{OP}$  es la productividad del alga en kg/(m<sup>2</sup>.día).

#### Fotobiorreactor tubular (TPBR)

El crecimiento de las microalgas en el fotobiorreactor tubular junto con el consumo de nutrientes y dióxido de carbono se calculan como se muestra a continuación.

$$f_{UU,al}^{TPBR} = PR_{al}^{TPBR} \cdot V_{TPBR} \quad (C.5)$$

$$f_{UU,j}^{TPBR} = C_j^{TPBR} \cdot f_{UU,al}^{TPBR} \quad (C.6)$$

$$\forall j \in \{cdo, nit, pot\}$$

donde  $PR_{al}^{OP}$  es la productividad del alga en kg/(m<sup>3</sup>.día),  $V_{TPBR}$  es el volumen del fotobiorreactor tubular en m<sup>3</sup> y  $C_j^{TPBR}$  es un parámetro asociado al consumo de nutrientes en g nutrientes/g microalgas.

#### Decantador (DC1)

El balance de masa global en el decantador viene dado por la corriente proveniente del sector de crecimiento algal ( $f_{DC1,j}^{UU}$ ), la cual iguala a la corriente rica en alga ( $f_{TAC,j}^{DC1}$ ) y la de agua residual que abandona la etapa de secado ( $f_{MIX1,j}^{DC1}$ ).

$$f_{DC1,j}^{UU} = f_{TAC,j}^{DC1} + f_{MIX1,j}^{DC1} \quad (C.7)$$

$$\forall j \in \{al, agu\}$$

La corriente de especies que abandonan el decantador se determina como una función de un parámetro de separación ( $P_j^{DC1}$ ).

$$f_{MIX1,j}^{DC1} = P_j^{DC1} \cdot f_{DC1,j}^{UU} \quad (C.8)$$

$$\forall j \in \{al, agu\}$$

### Tanque acondicionador (TAC)

El balance de masa en el tanque acondicionador (TAC) confirma que la alimentación al tanque es igual a la corriente diluida de alga que se dirige al filtro de prensa (FP).

$$f_{TAC,j}^{DC1} + f_{TAC,j}^{chs} = f_{FP,j}^{TAC} \quad (C.9)$$

$$\forall j \in \{al, agu, ch\}$$

La cantidad de coagulante requerido viene dado como una función del caudal de microalga que ingresa al equipo ( $Q_{ch}^{TAC}$ ).

$$f_{TAC,ch}^{chs} = Q_{ch}^{TAC} \cdot f_{TAC,al}^{DC1} \quad (C.10)$$

La corriente de alga que abandona este sector queda establecida a partir de la siguiente ecuación.

$$f_{FP,al}^{TAC} = P_{al}^{TAC} \cdot f_{CT,al}^{DC1} \quad (C.11)$$

donde  $P_{al}^{TAC}$  es un parámetro que indica la cantidad de alga que se dirige desde el tanque acondicionador hacia el filtro de prensa.

Filtro de prensa (FP)

El flujo másico proveniente del tanque acondicionador ( $TAC$ ) es igual a la corriente que se dirige al secador más una corriente de agua residual como se presenta mediante la siguiente ecuación.

$$f_{FP,j}^{TAC} = f_{DRY,j}^{FP} + f_{rwr2,j}^{FP} \quad (C.12)$$

$$\forall j \in \{al, agu\}$$

El flujo correspondiente a la corriente algal que deja el filtro de prensa se determina como una función de un parámetro de separación ( $P_{al}^{FP}$ ).

$$f_{DRY,al}^{FP} = P_{al}^{FP} \cdot f_{FP,al}^{TAC} \quad (C.13)$$

Secador (DRY)

El balance de masa en el secador establece que la corriente proveniente del filtro prensa ( $FP$ ) más la corriente necesaria para el proceso de secado ( $stm1$ ) es igual a una corriente de vapor que abandona el equipo ( $wv1$ ) junto con la corriente de proceso rica en alga que se dirige al extractor de lípidos ( $LE$ ).

$$f_{DRY,j}^{FP} + f_{wv1,j}^{stm1} = f_{wv1,j}^{DRY} + f_{LE,j}^{DRY} \quad (C.14)$$

$$\forall j \in \{al, agu\}$$

El agua evaporada viene dada como función de un parámetro de evaporación ( $P_{agu}^{DRY}$ ) como se muestra a continuación.

$$f_{wv1,agu}^{DRY} = P_{agu}^{DRY} \cdot f_{DRY,agu}^{FP} \quad (C.15)$$

La corriente de vapor incorporada para la etapa de secado puede calcularse como función del agua ingresando con la corriente de proceso.

$$f_{DRY1,agu}^{stm1} = P_{agu}^{stm1} \cdot f_{DRY,agu}^{FP} \quad (C.16)$$

donde  $P_{agu}^{stm1}$  es un parámetro que relaciona el caudal de vapor necesario en la sección de secado con la humedad del agua.

### Extractor de lípidos (LE)

El balance sobre el extractor lipídico (LE) afirma que el caudal de alga que ingresa al equipo desde el secador (DRY) y el hexano proveniente del mezclador (MIX2) es igual a la corriente que se dirige a la unidad de recuperación de hexano (HR) y la enviada al proceso de digestión anaeróbica (MIX5).

$$f_{LE,j}^{DRY} + f_{LE,hex}^{MIX2} = f_{HR,j}^{LE} + f_{MIX5,j}^{LE} \quad (C.17)$$

$$\forall j \in \{al, agu, carb, hex, lpd, prt\}$$

El hexano (*hex*) empleado para el proceso de extracción lipídico se define mediante un parámetro que relaciona la cantidad necesaria del solvente con el alga proveniente del secador.

$$f_{LE,hex}^{MIX2} = P_{hex}^{MIX2} \cdot f_{LE,al}^{DRY} \quad (C.18)$$

Los lípidos, carbohidratos y proteínas extraídos de la biomasa algal se pueden expresar utilizando un parámetro de conversión como se muestra a continuación.

$$f_{HR,j}^{LE} = C_j^{LE} \cdot f_{LE,al}^{DRY} \quad (C.19)$$

$$\forall j \in \{carb, lpd, prt\}$$

La corriente que ingresa a la sección de digestión anaeróbica se puede expresar como una fracción de las biomoléculas obtenidas en el extractor de lípidos.

$$f_{MIX5,j}^{LE} = P_j^{LE} \cdot f_{LE,j}^{DRY} \quad (C.20)$$

$$\forall j \in \{agu, carb, lpd, prt\}$$

Unidad de recuperación de hexano (HR)

La transformación de aceite algal desde lípidos a triglicéridos y ácidos grasos libres se puede expresar como una función de un parámetro de conversión de lípidos como se muestra a continuación.

$$f_{MIX3,j}^{HR} = \frac{M_j}{M_{lpd}} \cdot C_{lpd}^{HR} \cdot f_{HR,lpd}^{LE} \quad (C.21)$$

$$\forall j \in \{ffa, tg\}$$

El balance de masa por especies sobre la unidad de recuperación de hexano (HR) confirma que la corriente que ingresa desde el extractor de lípidos es igual a la suma de una corriente rica en lípidos (MIX3) y una corriente que se recircula a un mezclador previo ingreso al proceso de extracción lipídica (MIX2).

$$f_{HR,j}^{LE} = f_{MIX3,j}^{HR} + f_{MIX2,j}^{HR} \quad (C.22)$$

$$\forall j \in \{agu, ffa, hex, lpd, tg\}$$

El caudal reciclado de hexano puede ser determinado empleando un parámetro de recuperación como se muestra a continuación.

$$f_{LE,hex}^{HR} = Q_{hex}^{HR} \cdot f_{HR,hex}^{LE}$$

Mezclador (MIX2)

El balance de masa sobre el mezclador afirma que la corriente proveniente de la unidad de recuperación de hexano (HR) más la corriente fresca de hexano (mh1) es igual a la corriente que ingresa a la unidad de extracción lipídica (HR).

$$f_{MIX2,j}^{HR} + f_{MIX2,j}^{mh} = f_{LE,j}^{MIX2} \quad (C.23)$$

$$\forall j \in \{agu, hex\}$$

Mezclador (MIX3)

El balance de masa sobre el mezclador (MIX3) confirma que las corrientes alimentadas al mismo son iguales a la que ingresa al reactor de transesterificación.

$$f_{MIX3,j}^{HR} + f_{MIX3,j}^{smos} + f_{MIX3,j}^{mets} + f_{MIX3,j}^{MIX6} = f_{TRANS,j}^{MIX3} \quad (C.24)$$

$$\forall j \in \{agu, ffa, met, moxs, tg\}$$

Las corrientes frescas de metanol (*mets*) y metóxido de sodio (*smos*) se pueden definir mediante la siguiente ecuación.

$$f_{MIX3,j}^i = Q_j^i \cdot f_{MIX3,tg}^{HR} \quad (C.25)$$

$$\forall i \in \{mets, smos\} \quad \forall j \in \{met, moxs\}$$

donde  $Q_j^i$  relaciona el caudal de la materia prima  $j$  que ingresa por la corriente  $i$  con los triglicéridos presentes en la corriente principal del proceso.

Reactor de transesterificación (TRANS)

Los caudales de glicerol y ésteres metílicos se calculan como una función de un parámetro de conversión de triglicéridos como se muestra a continuación.

$$f_{DC2,j}^{TRANS} = \frac{M_j}{M_{tg}} \cdot C_{tg,j}^{TRANS} \cdot f_{TRANS,tg}^{MIX3} \quad (C.26)$$

$$\forall j \in \{bd, glic\}$$

El caudal másico de jabones (*jab*) se calcula como una función de un parámetro de conversión de los ácidos grasos libres.

$$f_{DC2,jab}^{TRANS} = \frac{M_{jab}}{M_{ffa}} \cdot C_{ffa}^{TRANS} \cdot f_{TRANS,ffa}^{MIX3} \quad (C.27)$$

Los triglicéridos y ácidos grasos libres que abandonan el reactor de transesterificación se obtienen como una diferencia entre las corrientes alimentadas y el consumo de dichos componentes.

$$f_{DC2,j}^{TRANS} = f_{TRANS,j}^{MIX3} - \sum_{i \in \{glic, merc\}} \frac{M_i}{M_j} \cdot C_{j,i}^{TRANS} \cdot f_{TRANS,i}^{MIX3} \quad (C.28)$$

$$\forall j \in \{ffa, tg\}$$

El caudal de metanol que sale del reactor se calcula mediante la siguiente ecuación.

$$f_{DC2,met}^{TRANS} = f_{TRANS,met}^{MIX3} - \frac{M_{met}}{M_{tg}} \cdot C_{tg}^{TRANS} \cdot f_{TRANS,tg}^{MIX3} + \frac{M_{met}}{M_{ffa}} \cdot C_{ffa}^{TRANS} \cdot f_{TRANS,ffa}^{MIX3} \quad (C.29)$$

El caudal de metóxido de sodio sin reaccionar se obtiene considerando el catalizador alimentado y su consumo.

$$f_{DC2,moxs}^{TRANS} = f_{TRANS,moxs}^{MIX3} - \frac{M_{smo}}{M_{ffa}} \cdot C_{ffa}^{TRANS} \cdot f_{TRANS,ffa}^{MIX3} \quad (C.30)$$

### Decantador (DC2)

El balance de masa sobre el decantador (DC2) afirma que la corriente que ingresa al equipo proveniente desde el reactor de transesterificación (TRANS) es igual a las corrientes que se dirigen a la columna de lavado (WC) más la corriente que se envía a un mezclador aguas arriba del proceso de purificación de glicerol.

$$f_{DC2,j}^{TRANS} = f_{WC,j}^{DC2} + f_{MIX4,j}^{DC2} \quad (C.31)$$

$$\forall j \in \{agu, bd, glic, jab, met, moxs, tg\}$$

La corriente que se dirige a la etapa de purificación de glicerol se puede expresar como una función del caudal proveniente de la etapa de transesterificación empleando un parámetro de separación ( $P_j^{DC2}$ ).

$$f_{MIX4,j}^{DC2} = P_j^{DC2} \cdot f_{DC2,j}^{TRANS} \quad (C.32)$$

$$\forall j \in \{agu, bd, glic, jab, met, moxs, tg\}$$



Columna de lavado (WC)

El balance de masa por especies en la columna de lavado (WC) afirma que el agua alimentada a la columna ( $wr1$ ) más la corriente de proceso proveniente del decantador (DC2) son iguales a la corriente que se dirige al decantador aguas abajo (DC3) más la corriente enviada al mezclador (MIX4).

$$f_{WC,j}^{wr1} + f_{WC,j}^{DC2} = f_{DC3,j}^{WC} + f_{MIX4,j}^{WC} \quad (C.33)$$

$$\forall j \in \{agu, bd, glic, jab, met, moxs, tg\}$$

El agua requerida para el proceso de lavado viene dada por un parámetro que relaciona el agua alimentada con el éster metílico de la corriente de proceso.

$$f_{WC,agu}^{wr1} = Q_{wr1}^{wr1} \cdot f_{WC,bd}^{DC2} \quad (C.34)$$

El flujo másico que ingresa al decantador (DC3) se determina mediante el uso de un parámetro de separación como se muestra debajo.

$$f_{DC3,j}^{WC} = P_j^{WC} \cdot f_{WC,j}^{DC2} \quad (C.35)$$

$$\forall j \in \{agu, bd, glic, jab, met, moxs, tg\}$$

Decantador (DC3)

El balance de masa en el decantador (DC3) confirma que el caudal de ingreso al equipo es igual a la suma del caudal que se dirige al proceso de producción de glicerol luego del mezclador (MIX4) y la corriente rica en éster metílico.

$$f_{DC3,j}^{WC} = f_{MIX4,j}^{DC3} + f_{SPL,j}^{DC3} \quad (C.36)$$

$$\forall j \in \{agu, bd, glic, jab, met, moxs, tg\}$$

El caudal de las especies que ingresan al mezclador (MIX4) viene dado como función de un parámetro de separación.

$$f_{MIX4,j}^{DC3} = P_j^{DC3} \cdot f_{DC3,j}^{WC} \quad (C.37)$$

$$\forall j \in \{agu, bd, glic, jab, met, moxs, tg\}$$

#### Torre de separación (SPL)

El balance de masa por componentes sobre la torre de separación (SPL) indica que la corriente de entrada es igual a una corriente de vapor (*wv2*) más la corriente de biodiesel (*bds*).

$$f_{SPL,j}^{DC3} = f_{wv2,j}^{SPL} + f_{bds,j}^{SPL} \quad (C.38)$$

$$\forall j \in \{agu, bd\}$$

El caudal másico de vapor se calcula como función de un parámetro de separación como se muestra a continuación.

$$f_{wv2,j}^{SPL} = P_j^{SPL} \cdot f_{SPL,j}^{DC3} \quad (C.39)$$

$$\forall j \in \{agu, bd\}$$

#### Mezclador (MIX4)

El caudal alimentado al mezclador (MIX4) se establece a partir de la contribución de las corrientes provenientes de la etapa de obtención de biodiesel como se muestra debajo.

$$f_{STR,j}^{MIX4} = f_{MIX4,j}^{DC2} + f_{MIX4,j}^{WC} + f_{MIX4,j}^{DC3} \quad (C.40)$$

$$\forall j \in \{agu, glic, jab, met, moxs, tg\}$$

#### Torre de separación (STR)

El balance de masa de la columna de separación (STR) confirma que la suma del caudal másico de cada una de las especies provenientes del mezclador (MIX4) y el caudal de vapor alimentado (*stm2*) es igual a la suma de las especies en las corrientes ricas en metanol y glicerol que ingresan a la columna de destilación (DIS) y el reactor de neutralización (NEUTR), respectivamente.

$$f_{DIS,j}^{STR} + f_{NEUTR,j}^{STR} = f_{STR,j}^{stm2} + f_{STR,j}^{MIX4} \quad (C.41)$$

$$\forall j \in \{agu, glic, jab, met, moxs, tg\}$$

La corriente que ingresa a la columna de destilación (*DIS*) se determina como una función de un parámetro de separación.

$$f_{DIS,j}^{STR} = P_j^{STR} (f_{STR,j}^{stm1} + f_{STR,j}^{MIX4}) \quad (C.42)$$

$$\forall j \in \{agu, glic, jab, met, moxs, tg\}$$

### Columna de destilación (*DIS*)

El balance global de cada uno de los componentes sobre la columna de destilación (*DIS*) afirma que la corriente alimentada es igual a la suma de las corrientes rica en metanol y agua, (*rme*) y (*wst2*) respectivamente.

$$f_{rme,j}^{DIS} + f_{wst2,j}^{DIS} = f_{DIS,j}^{STR} \quad (C.43)$$

$$\forall j \in \{agu, glic, jab, met, moxs, tg\}$$

La corriente rica en metanol (*rme*) se puede reutilizar en el proceso de producción de biodiesel. Para su determinación se emplea la siguiente ecuación la cual incluye un parámetro de separación ( $P_j^{DIS}$ ).

$$f_{MIX3,j}^{DIS} = P_j^{DIS} \cdot f_{DIS,j}^{STR} \quad (C.44)$$

$$\forall j \in \{agu, glic, jab, met, moxs, tg\}$$

### Reactor de neutralización (*NEUTR*)

La solución de ácido clorhídrico alimentada al reactor (*hcls*) se expresa como una función del glicerol alimentado y la concentración de las especies involucradas en la corriente ácida.

$$f_{NEUTR,j}^{hcls} = Q_{glic}^{hcls} \cdot PARI_j \cdot f_{NEUTR,glic}^{STR} \quad (C.45)$$

$$\forall j \in \{agu, hcl\}$$

donde  $PARI_j$  indica la concentración de la corriente con la solución ácida.

Como el glicerol y los triglicéridos no se encuentran involucrados en la reacción de neutralización, el caudal a la salida del reactor de estos componentes es igual a los de entrada.

$$f_{DC4,j}^{NEUTR} = f_{NEUTR,j}^{STR} \quad (C.46)$$

$$\forall j \in \{agu, glic\}$$

El caudal de agua a la salida del reactor de neutralización ( $NEUTR$ ) se establece a partir de la suma del agua que ingresa con la corriente rica en glicerol más la incorporada al sistema mediante la solución ácida.

$$f_{DC4,agu}^{NEUTR} = f_{NEUTR,agu}^{STR} + f_{NEUTR,agu}^{hcls} \quad (C.47)$$

Los caudales máxicos de los componentes metanol y ácidos grasos libres a la salida del reactor de neutralización ( $NEUTR$ ) se expresan como una función de parámetros de conversión como se muestra debajo.

$$f_{DC4,j}^{NEUTR} = \sum_{i \in \{jab, moxs\}} \frac{M_j}{M_i} \cdot C_{i,j}^{NEUTR} f_{NEUTR,i}^{STR} \quad (C.48)$$

$$\forall j \in \{ffa, met\}$$

donde  $M_i$  and  $M_j$  son los pesos moleculares de las especies involucradas en la reacción.  $C_{i,j}^{NEUTR}$  es el parámetro de conversión que indica la tasa de conversión de la especie  $i$  a  $j$ .

El caudal de cloruro de sodio que abandona el reactor queda establecido como función de un parámetro de conversión de jabones y metóxido de sodio como se muestra a continuación.

$$f_{DC4,nacl}^{NEUTR} = \sum_{i \in \{jab, moxs\}} \frac{M_{nacl}}{M_i} \cdot C_i^{NEUTR} f_{NEUTR,i}^{STR} \quad (C.49)$$

La solución de ácido clorhídrico que abandona el reactor se determina mediante el conocimiento de la cantidad alimentada al reactor y su consumo.

$$f_{DC4,hcl}^{NEUTR} = f_{NEUTR,hcl}^{hcls} - \sum_{i \in \{jab, moxs\}} \frac{M_{hcl}}{M_i} \cdot C_i^{NEUTR} f_{NEUTR,i}^{STR} \quad (C.50)$$

### Decantador (DC4)

El balance de masa sobre el decantador (DC4) asegura que el caudal que ingresa desde el reactor de neutralización (NEUTR) es igual a una corriente purificada de glicerol más una residual como se muestra en la siguiente ecuación. Es importante resaltar que la corriente de glicerol a la salida del decantador (DC4) puede tener 3 potenciales destinos que son solución del problema de optimización: el proceso de digestión anaeróbica (*glip1*), el proceso de producción de PHA (*glip2*) o venta (*glip3*).

$$f_{glip1,j}^{DC4} + f_{glip2,j}^{DC4} + f_{glip3,j}^{DC4} + f_{wst3,j}^{DC4} = f_{DC4,j}^{NEUTR} \quad (C.51)$$

$$\forall j \in \{agu, ffa, glic, hcl, jab, met, moxs, nacl, tg\}$$

El caudal de cada uno de los componentes a la salida del decantador (DC4) se establece como función de un parámetro de separación ( $P_j^{DC4}$ ).

$$f_{glip1,j}^{DC4} + f_{glip2,j}^{DC4} + f_{glip3,j}^{DC4} = P_j^{DC4} \cdot f_{DC4,j}^{NEUTR} \quad (C.52)$$

$$\forall j \in \{agu, ffa, glic, hcl, jab, met, moxs, nacl, tg\}$$

En la Tabla C.1 se presentan los parámetros empleados en el planteo de los balances de masa de la sección de producción de biodiesel a partir de microalgas.

**Tabla C.1.** Parámetros de balance de masa del sector de producción de biodiesel.

Parámetros	Valor	Unidades	Referencia
$P_{agu}^{OP}$	110,27	-	Gebreslassie <i>et al.</i> , 2013
$C_{cdo}^{OP}$	2,5333	kg cdo/kg al	Gebreslassie <i>et al.</i> , 2013
$C_{nit}^{OP}$	0,0555	kg nit/kg al	Gebreslassie <i>et al.</i> , 2013

$C_{pot}^{OP}$	0,0125	<i>kg pot/kg al</i>	Gebreslassie <i>et al.</i> , 2013
$PR_{al}^{OP}$	0,125	<i>kg al/m<sup>3</sup>.día</i>	García Prieto <i>et al.</i> , 2017
$PR_{al}^{TPBR}$	0,41	<i>kg al/m<sup>3</sup>.día</i>	García Prieto <i>et al.</i> , 2017
$C_{cdo}^{TPBR}$	2,5333	<i>kg cdo/kg al</i>	García Prieto <i>et al.</i> , 2017
$C_{nit}^{TPBR}$	0,0555	<i>kg nit/kg al</i>	García Prieto <i>et al.</i> , 2017
$C_{pot}^{TPBR}$	0,0125	<i>kg pot/kg al</i>	García Prieto <i>et al.</i> , 2017
$P_{al}^{DC1}$	0,05	<i>kg al/kg al</i>	Gebreslassie <i>et al.</i> , 2013
$Q_{ch}^{CT}$	3	<i>kg ch/kg al</i>	García Prieto <i>et al.</i> , 2017
$P_{al}^{FP}$	0,9	-	Gebreslassie <i>et al.</i> , 2013
$P_{agu}^{DRY}$	0,994	-	Gebreslassie <i>et al.</i> , 2013
$P_{hex}^{MIX2}$	0,09	<i>kg hex/kg al</i>	Gebreslassie <i>et al.</i> , 2013
$C_{carb}^{LE}$	0	<i>kg carb/kg al</i>	García Prieto <i>et al.</i> , 2017
$C_{lpd}^{LE}$	0,179	<i>kg lpd/kg al</i>	García Prieto <i>et al.</i> , 2017
$C_{prot}^{LE}$	0	<i>kg prt/kg al</i>	García Prieto <i>et al.</i> , 2017
$P_{carb}^{LE}$	1	-	García Prieto <i>et al.</i> , 2017
$P_{lpd}^{LE}$	0,05	-	García Prieto <i>et al.</i> , 2017
$P_{prot}^{LE}$	1	-	García Prieto <i>et al.</i> , 2017

$P_{agu}^{LE}$	1	-	García Prieto <i>et al.</i> , 2017
$Q_{hex}^{HR}$	0,98	-	García Prieto <i>et al.</i> , 2017
$Q_{met}^{me}$	0,09	kg met/kg tg	García Prieto <i>et al.</i> , 2017
$Q_{moxs}^{smoxs}$	0,01	kg moxs/kg tg	García Prieto <i>et al.</i> , 2017
$P_{bd}^{DC2}$	1	-	García Prieto <i>et al.</i> , 2017
$P_{glic}^{DC2}$	1	-	García Prieto <i>et al.</i> , 2017
$P_{met}^{DC2}$	0,6	-	García Prieto <i>et al.</i> , 2017
$P_{moxs}^{DC2}$	1	-	García Prieto <i>et al.</i> , 2017
$P_{jab}^{DC2}$	0,1	-	García Prieto <i>et al.</i> , 2017
$Q_{agu}^{wr1}$	0,2	kg agu/kg bd	García Prieto <i>et al.</i> , 2017
$P_{bd}^{WC}$	1	-	García Prieto <i>et al.</i> , 2017
$P_{agu}^{DC3}$	0,995	-	García Prieto <i>et al.</i> , 2017
$P_{agu}^{SPL}$	1	-	García Prieto <i>et al.</i> , 2017
$P_{met}^{STR}$	1	-	García Prieto <i>et al.</i> , 2017
$P_{agu}^{STR}$	1	-	García Prieto <i>et al.</i> , 2017
$P_{met}^{DIS}$	1	-	García Prieto <i>et al.</i> , 2017
$Q_{glic}^{hcls}$	0,355	kg ácido/kg glic	Posada <i>et al.</i> , 2011
$PARI_{hcl}$	0,31	kg hcl/kg ácido	Posada <i>et al.</i> , 2011

$PARI_{agu}$	0,69	kg agu/kg ácido	Posada <i>et al.</i> , 2011
$P_{glic}^{DC4}$	1	-	Posada <i>et al.</i> , 2011
$P_{agu}^{DC4}$	0.1	kg agu/kg glic	Posada <i>et al.</i> , 2011

### C.1.2. Proceso de digestión anaeróbica

#### Mezclador (MIX5)

El flujo másico de las especies que ingresan al sector de digestión anaeróbica se expresa como la suma de la corriente de torta algal (*oc*) proveniente del extractor de lípidos (*LE*) más las potenciales corrientes que ingresan desde el proceso de purificación de glicerol (*glip1*), papel de desecho (*wps*), lodos de aguas residuales (*slds*) y biomasa residual (*crms*) extraído del proceso de producción de PHAs.

$$f_{MIX5,j}^{LE} + f_{MIX5,j}^{glip1} + f_{MIX5,j}^{wps} + f_{MIX5,j}^{slds} + f_{MIX5,j}^{crms} = f_{AD,j}^{MIX5} \quad (C.53)$$

$$\forall j \in \{agu, bmr, carb, glic, hex, lpd, prt, sld, wp\}$$

Es importante destacar que la incorporación de la corriente de lodos de aguas residuales y la de papel de desecho serán variables del proceso determinadas con el fin de alcanzar una relación C/N entre 20 y 25 la cual es la adecuada para este tipo de procesos (García Prieto *et al.*, 2017).

La composición de las corrientes de lodos de aguas residuales y papel de desecho, se encuentran dadas por las siguientes ecuaciones:

$$f_{MIX5,j}^{slds} = \sum_j x_j^{slds} \cdot f_{MIX5}^{slds} \quad \forall j \in \{agu, sld\} \quad (C.54)$$

$$f_{MIX5,j}^{wps} = \sum_j x_j^{wps} \cdot f_{MIX5}^{wps} \quad \forall j \in \{agu, wp\} \quad (C.55)$$

donde  $x_j^{slds}$  y  $x_j^{wps}$  corresponden a la fracción del componente *j* presente en las corrientes totales  $f_{MIX5}^{slds}$  y  $f_{MIX5}^{wps}$ , respectivamente.



Digestor anaeróbico (AD)

Los sólidos volátiles presentes en la alimentación al digestor anaeróbico (AD) se calculan a partir del uso del parámetro  $P_j^{VS}$  como se muestra a continuación:

$$f1_{AD,j}^{MX5} = P_j^{VS} \cdot f_{AD,j}^{MX5} \quad (C.56)$$

$$\forall j \in \{agu, carb, glic, hex, lpd, prt, sld, wp\}$$

Por lo tanto, la entrada al digestor anaeróbico se puede clasificar entre sólidos volátiles ( $f1_{AD,j}^{MX5}$ ) y sólidos no volátiles ( $f2_{AD,j}^{MX5}$ ).

$$f_{AD,j}^{MX5} = f1_{AD,j}^{MX5} + f2_{AD,j}^{MX5} \quad (C.57)$$

$$\forall j \in \{agu, carb, glic, hex, lpd, prt, sld, wp\}$$

La fracción de sólidos volátiles de cada componente presente en la torta algal ( $\eta_j^{oc}$ ) que ingresan al digestor anaeróbico (AD) se determina como la cantidad de cada componente en la torta algal sobre la corriente total.

$$\eta_j^{oc} = \frac{f1_{AD,j}^{MX5}}{(\sum_j f1_{AD,j}^{MX5})} \quad (C.58)$$

$$\forall j \in \{carb, hex, lpd, prt\}$$

La relación C/N presente en la torta algal ( $CN_{oc}$ ) se calcula como la cantidad total de carbono presente en dicha corriente sobre la cantidad de nitrógeno.

$$CN_{oc} = \frac{\sum_j \eta_j^{oc} \cdot C_j}{\eta_{prt}^{oc} \cdot N_{prt}} \quad (C.59)$$

$$\forall j \in \{carb, hex, lpd, prt\}$$

Donde  $C_j$  indica la cantidad de carbono presente en el componente  $j$  y  $N_{prt}$  el porcentaje de nitrógeno presente en las proteínas, ya que estas son las únicas que aportan dicho compuesto a la corriente total.

La fracción de torta algal ( $\eta_{oc}^{vs}$ ), glicerol ( $\eta_{glic}^{vs}$ ), lodos residuales ( $\eta_{sld}^{vs}$ ) y papel de desecho ( $\eta_{wp}^{vs}$ ), que ingresan en la corriente de sólidos volátiles al digestor anaeróbico, se calculan de la siguiente manera:

$$\eta_j^{vs} = \frac{f1_{AD,j}^{MX5}}{f1_{AD}^{MX5}} \quad (C.60)$$

$$\forall j \in \{glic, oc, sld, wp\}$$

La relación C/N con la que opera el digestor anaeróbico se calcula como la suma del aporte de dicha relación presente en cada uno de los componentes, donde  $CN_{glic}$ ,  $CN_{sld}$  y  $CN_{wp}$  corresponden a la relación carbono/nitrógeno del glicerol, lodo de aguas residuales y papel de desecho, respectivamente.

$$CN_{op} = \eta_{oc}^{vs} \cdot CN_{oc} + \eta_{glic}^{vs} \cdot CN_{glic} + \eta_{sld}^{vs} \cdot CN_{sld} + \eta_{wp}^{vs} \cdot CN_{wp} \quad (C.61)$$

$$\forall j \in \{carb, hex, lpd, prt\}$$

El biogás producido durante la digestión anaeróbica se calcula en función de los sólidos volátiles presentes, mediante el parámetro  $BGSV$ . El volumen de metano ( $V_{ch4}$ ) y dióxido de carbono ( $V_{cdo}$ ) generados, se define a partir de la composición propuesta para el biogás ( $v_{ch4}^{bg}$  y  $v_{cdo}^{bg}$ ).

$$V_{bg} = BGSV \cdot f1_{AD}^{MX9} \quad (C.62)$$

$$V_{ch4} = v_{ch4}^{bg} \cdot V_{bg} \quad (C.63)$$

$$V_{cdo} = v_{cdo}^{bg} \cdot V_{bg} \quad (C.64)$$

El biogás producido es enviado ciclo combinado de calor y potencia, donde es transformado a energía térmica y eléctrica. El caudal másico de biogás se obtiene de la sumatoria de los volúmenes de cada componente ( $V_j$ ) multiplicado por su densidad ( $\rho_j$ ).

$$f_{CHP,j}^{AD} = \rho_j \cdot V_j \quad (C.65)$$

$$f_{CHP,j}^{AD} = \rho_j \cdot V_j \quad \forall j \in \{cdo, ch4\} \quad (C.66)$$

El reciclo de nutrientes al cultivo algal se calcula de la siguiente manera:

$$f_{rnt,nit}^{AD} = \alpha_{nit} \cdot [f_{AD,j}^{MX5} \cdot PER_{nit}^{oc} + f_{AD,j}^{wps} \cdot PER_{nit}^{wp} + f_{AD,j}^{slds} \cdot PER_{nit}^{sld} + f_{AD,j}^{glip1} \cdot PER_{nit}^{glic} + f_{AD,j}^{MX5} \cdot PER_{nit}^{bmr}] \quad (C.67)$$

$$\forall j \in \{carb, glic, hex, lpd, prt, sld, wp\}$$

$$f_{rnt,pot}^{AD} = \alpha_{pot} \cdot [f_{AD,j}^{MX5} \cdot PER_{pot}^{oc} + f_{AD,j}^{wps} \cdot PER_{pot}^{wp} + f_{AD,j}^{slds} \cdot PER_{pot}^{sld} + f_{AD,j}^{glip1} \cdot PER_{pot}^{glic} + f_{AD,j}^{MX5} \cdot PER_{pot}^{crms}] \quad (C.68)$$

$$\forall j \in \{carb, glic, hex, lpd, prt, sld, wp\}$$

Donde  $f_{rnt,nit}^{AD}$  y  $f_{rnt,pot}^{AD}$  corresponden a la cantidad de nitrógeno y fósforo, respectivamente, que se recirculan al cultivo algal.  $\alpha_{nit}$  y  $\alpha_{pot}$  son los porcentajes de mineralización para el nitrógeno y fósforo, respectivamente, en el digestor anaeróbico. El nitrógeno y fósforo en la torta algal ( $PER_{nit}^{oc}$  y  $PER_{pot}^{oc}$ , respectivamente), se calculan de la siguiente manera:

$$PER_{nit}^{oc} \cdot PER_{sv}^{oc}/100 = PER_{nit}^{prot} \cdot \eta_{prt}^{oc} \quad (C.69)$$

$$PER_{pot}^{oc} \cdot PER_{sv}^{oc}/100 \cdot PER_{nit}^{prt} \cdot PRO/100 = PER_{pot}^{al} \cdot PER_{nit}^{oc} \quad (C.70)$$

Donde,  $PER_{sv}^{oc}$  representa el porcentaje de sólidos volátiles en la torta algal que se asume igual al 90% independientemente de su composición,  $PER_{nit}^{prt}$  la cantidad de nitrógeno por unidad másica de proteínas,  $PRO$  el porcentaje de proteínas presente en las algas y  $PER_{pot}^{al}$  la cantidad de fósforo presente por unidad másica de alga.

El residuo sólido producido en la digestión anaeróbica ( $f_{fert}^{AD}$ ), es vendido como fertilizante y se obtiene a partir de la corriente total de sólidos no volátiles.

$$f_{fert}^{AD} = f_{AD}^{MX5} \quad (C.71)$$

### Ciclo combinado de calor y potencia (CHP)

El dióxido de carbono recirculado se obtiene a partir del dióxido de carbono presente en los gases de combustión generados al quemar el metano en el ciclo combinado de calor y potencia ( $f_{rcdo,cdo}^{CHP}$ ). La cantidad de dióxido de carbono producido en el ciclo combinado de calor y potencia es una función del metano transformado ( $f_{CHP,ch4}^{AD}$ ), mediante el parámetro *CMR*.

$$f_{rcdo,cdo}^{CHP} = CMR \cdot f_{CHP,ch4}^{AD} \quad (C.72)$$

En la Tabla C.2 se presentan los parámetros empleados en el planteo de los balances de masa de la sección de digestión anaeróbica.

**Tabla C.2.** Parámetros de balance de masa del sector de digestion anaeróbica.

Parámetros	Valor	Unidades	Referencia
$x_{agu}^{slds}$	0,99	-	Strømme, 2010
$x_{sld}^{slds}$	0,01	-	Strømme, 2010
$x_{agu}^{wps}$	0,514	-	Strømme, 2010
$x_{wp}^{wps}$	0,486	-	Strømme, 2010
$P_{hex}^{VS}$	1	-	-
$P_{lpd}^{VS}$	0,9	-	Strømme, 2010
$P_{carb}^{VS}$	0,9	-	Strømme, 2010
$P_{prt}^{VS}$	0,9	-	Strømme, 2010
$P_{sld}^{VS}$	0,72	-	Strømme, 2010
$P_{wp}^{VS}$	0,92	-	Strømme, 2010
$P_{glic}^{VS}$	1	-	Strømme, 2010
$C_{carb}$	0,5316	-	Strømme, 2010

$C_{lip}$	0,7571	-	Strømme, 2010
$C_{prt}$	0,1624	-	Strømme, 2010
$C_{hex}$	0,8372	-	-
$N_{prt}$	0,1624	-	Strømme, 2010
$CN_{glic}$	50	-	Strømme, 2010
$CN_{sld}$	7,2	-	Strømme, 2010
$CN_{wp}$	200	-	cwsec-sc.org
$BGSV$	0,537	$m^3$ biogás/kg sv	Strømme, 2010
$v_{ch4}^{bg}$	0,6	-	Strømme, 2010
$v_{cdo}^{bg}$	0,4	-	Strømme, 2010
$\rho_{ch4}$	0,68	$kg/m^3$	Strømme, 2010
$\rho_{cdo}$	1,87	$kg/m^3$	Strømme, 2010
$PER_{nit}^{wp}$	0,0039	-	Strømme, 2010
$PER_{nit}^{sld}$	0,071	-	Strømme, 2010
$PER_{nit}^{glic}$	0	-	Strømme, 2010
$PER_{pot}^{wp}$	0	-	Strømme, 2010
$PER_{pot}^{sld}$	0,0278	-	Strømme, 2010
$PER_{pot}^{glic}$	0	-	Strømme, 2010
$\alpha_{nit}$	0,6	-	Strømme, 2010
$\alpha_{pot}$	0,2	-	Strømme, 2010
$PER_{sv}^{oc}$	90	%	-
$PER_{nit}^{prt}$	0,1624	-	Strømme, 2010
$PER_{pot}^{al}$	0,01	-	Strømme, 2010
$CMR$	2,569	$kg$ cdo/ $kg$ ch4	Strømme, 2010

### C.1.3. Proceso de biosíntesis de PHA

#### Mezclador (MIX6)

El flujo másico alimentado a la etapa de biosíntesis ( $f_{BR1,j}^{MIX6}$ ) está dado por la contribución de las corrientes de glicerol, una proveniente de la etapa de purificación ( $f_{MIX6,j}^{glip2}$ ) y otra potencialmente suministrada por industrias de biodiesel ( $f_{MIX6,j}^{glip4}$ ), y por una corriente auxiliar de agua ( $f_{MIX6,j}^{wr2}$ ), con el fin de diluir el glicerol hasta la concentración deseada.

$$f_{MIX6,j}^{glip2} + f_{MIX6,j}^{glip4} + f_{MIX6,j}^{wr2} = f_{BR1,j}^{MIX6} \quad (C.73)$$

$$\forall j \in \{agu, glic\}$$

El flujo másico de agua necesario para la dilución de glicerol ( $f_{MIX6,agu}^{wr2}$ ) se calcula en función de la corriente total de glicerol que ingresa desde el sector de purificación mediante el parámetro  $Q_{agu}^{wr2}$  en kg agua/kg glicerol para obtener una concentración de glicerol de 249 g/L (Harding *et al.*, 2007).

$$f_{MIX6,agu}^{wr2} = Q_{agu}^{wr2} (f_{MIX6,glic}^{glip2} + f_{MIX6,glic}^{glip4}) \quad (C.74)$$

#### Biorreactor 1 (BR1)

Durante la primera etapa de biosíntesis el agua no es consumida ni generada, por lo tanto, el balance de agua en el BR1 puede expresarse como sigue:

$$f_{BR2,agu}^{BR1} = f_{BR1,agu}^{MIX6} \quad (C.75)$$

El flujo de glicerol a la salida del BR1 ( $f_{BR2,glic}^{BR1}$ ) se expresa como la diferencia entre el flujo alimentado de dicho componente ( $f_{BR1,glic}^{MIX6}$ ) y el glicerol consumido por los microorganismos.

$$f_{BR2,glic}^{BR1} = f_{BR1,glic}^{MIX6} \cdot (1 - C_{glic}^{BR1}) \quad (C.76)$$

Donde  $C_{glic}^{BR1}$  es un parámetro de consumo de glicerol, el cual depende de la cepa considerada para la biosíntesis de PHA en el BR1.

El PHA generado durante la primera etapa de biosíntesis se calcula en función de un parámetro de conversión  $C_{pha}^{BR1}$  como se muestra a continuación:

$$f_{BR2,pha}^{BR1} = f_{BR1,glic}^{MIX6} \cdot C_{pha}^{BR1} \cdot \frac{M_{pha}}{M_{glic}} \quad (C.77)$$

Donde  $M_{pha}$  y  $M_{glic}$  corresponden a los pesos moleculares de PHA y glicerol, respectivamente.

La corriente de biomasa producida en el primer biorreactor ( $f_{BR2,micr}^{BR1}$ ) es expresada en función del glicerol que ingresa a esta etapa ( $f_{BR1,glic}^{MIX6}$ ) mediante el parámetro de conversión  $Q_{micr}^{BR1}$ .

$$f_{BR2,micr}^{BR1} = Q_{micr}^{BR1} \cdot f_{BR1,glic}^{MIX6} \quad (C.78)$$

### Biorreactor 2 (BR2)

En esta etapa de la biosíntesis de PHA, así como en el primer biorreactor, el agua no es consumida ni producida. Por lo tanto, su balance de masa en el segundo biorreactor (BR2) se expresa de la siguiente manera:

$$f_{DU,agu}^{BR2} = f_{BR2,agu}^{BR1} \quad (C.79)$$

Donde  $f_{DU,agu}^{BR2}$  es el flujo másico de agua desde BR2 a la unidad DU y  $f_{BR2,agu}^{BR1}$  el correspondiente desde BR1 a BR2, DU es una unidad potencial la cual puede representar a la unidad RC1 u HOM en función de la selección del proceso de extracción de PHA.

El caudal másico de glicerol a la salida del segundo biorreactor ( $f_{DU,glic}^{BR2}$ ) se calcula en función de la corriente de entrada al mismo ( $f_{BR2,glic}^{BR1}$ ) y considerando una conversión completa de la fuente de carbono ( $C_{glic}^{BR2} = 1$ ).

$$f_{DU,glic}^{BR2} = f_{BR2,glic}^{BR1} \cdot (1 - C_{glic}^{BR2}) \quad (C.80)$$

El flujo másico de microorganismos a la salida del segundo biorreactor ( $f_{DU,micr}^{BR2}$ ) se expresa en función de la biomasa de microorganismos presentes en el primer biorreactor ( $f_{BR2,micr}^{BR1}$ ), teniendo en cuenta un parámetro de muerte celular ( $C_{micr}^{BR2}$ ) en el segundo biorreactor.

$$f_{DU,micr}^{BR2} = f_{BR2,micr}^{BR1} (1 - C_{micr}^{BR2}) \quad (C.81)$$

El PHA resultante durante la segunda etapa de biosíntesis se calcula como la suma de lo producido en la primera etapa ( $f_{BR2,pha}^{BR1}$ ) y lo generado en la segunda ( $f_{DU,pha}^{BR2}$ ). Siendo lo producido en esta segunda etapa una relación en función del parámetro  $C_{pha}^{BR2}$ .

$$f_{DU,pha}^{BR2} = f_{BR2,glic}^{BR1} \cdot C_{pha}^{BR2} \cdot \frac{M_{pha}}{M_{glic}} + f_{BR2,pha}^{BR1} \quad (C.82)$$

#### C.1.4. Proceso de extracción de PHA

La superestructura propuesta incorpora dos opciones para la extracción de PHA de los microorganismos: a) uso de surfactante-quelato y b) uso de solvente. Ambos procesos se describen a continuación.

##### C.1.4.1. Surfactante - quelato

###### Reactor (RC1)

El balance de masa para cada especie en el reactor  $RC1$ , donde se extrae el biopolímero de los microorganismos mediante el uso de betaína como surfactante y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como agente quelante, se muestra a continuación:

$$f_{CN1,j}^{RC1} = f_{RC1,j}^{BR2} + f_{RC1,j}^{schs} \quad (C.83)$$

$$\forall j \in \{agu, chel, micr, pha, srf\}$$

Donde  $f_{RC1,j}^{BR2}$  representa el flujo másico de la especie  $j$  a la salida del segundo biorreactor  $BR2$ ;  $f_{RC1,j}^{schs}$  el flujo másico de surfactante y quelato que ingresa al reactor  $RC1$  y  $f_{CN1,j}^{RC1}$  el flujo másico de cada componente  $j$  a la salida del reactor  $RC1$ .

El caudal másico de surfactante y quelato necesarios para la extracción de PHA ( $f_{RC1,j}^{schs}$ ) se calcula como función del flujo de microorganismos presentes en el reactor ( $f_{RC1,micr}^{BR2}$ ), provenientes de la etapa de biosíntesis, mediante los parámetros  $Q_{srf}^{schs}$  y  $Q_{chel}^{schs}$  respectivamente.



$$f_{RC1,j}^{schs} = (Q_{srf}^{schs} + Q_{chel}^{schs}) \cdot f_{RC1,micr}^{BR2} \quad (C.84)$$

### Centrífuga (CN1)

El balance de masa para cada componente en la centrífuga CN1 se expresa a continuación:

$$f_{CN1,j}^{RC1} = f_{DC5,j}^{CN1} + f_{wst4,j}^{CN1} \quad (C.85)$$

$$\forall j \in \{agu, chel, micr, pha, srf\}$$

El flujo másico de cada componente hacia la corriente principal de proceso ( $f_{DC5,j}^{CN1}$ ) es función de un parámetro de distribución  $P_j^{CN1}$ , el cual se asume 0 para el quelato (*chel*), los microorganismos (*micr*) y el surfactante (*srf*) y 1 para el PHA (*pha*).

$$f_{DC5,j}^{CN1} = P_j^{CN1} \cdot f_{CN1,j}^{RC1} \quad (C.86)$$

$$\forall j \in \{agu, chel, micr, pha, srf\}$$

### Decantador (DC5)

La corriente principal de proceso, rica en biopolímero ( $f_{SD,j}^{DC5}$ ) es separada de una corriente de desecho ( $f_{wst5,j}^{DC5}$ ). El balance de masa de cada especie *j* en el DC5 se muestra a continuación:

$$f_{DC5,j}^{CN1} = f_{SD,j}^{DC5} + f_{wst5,j}^{DC5} \quad (C.87)$$

$$\forall j \in \{agu, chel, micr, pha, srf\}$$

Parámetros de distribución individual ( $P_j^{DC5}$ ) se utilizan para calcular el flujo másico de cada componente a la salida del decantador DC5 ( $f_{SD,j}^{DC5}$ ) en función de lo ingresado ( $f_{DC5,j}^{CN1}$ ).

$$f_{SD,j}^{DC5} = P_j^{DC5} \cdot f_{DC5,j}^{CN1} \quad \forall j \in \{agu, pha\} \quad (C.88)$$

### C.1.4.2. Solvente

#### Homogeneizador (HOM)

El balance de masa en el homogeneizador indica que el flujo másico de las especies a la entrada del mismo ( $f_{HOM,j}^{BR2}$ ) es igual al flujo de dicho componente a la salida ( $f_{CN2,j}^{HOM}$ ). En dicho equipamiento no sucede reacción química, sino que es implementado con el objetivo de fomentar la ruptura de la pared celular de los microorganismos que contienen el PHA por medio de altas presiones (70 MPa) y temperatura (110 °C) en función de lo detallado por Parkin & Owen (1986).

$$f_{CN2,j}^{HOM} = f_{HOM,j}^{BR2} \quad (C.89)$$

$$\forall j \in \{agu, micr, pha\}$$

#### Centrífuga (CN2)

El balance de masa alrededor de la centrífuga CN2 determina que la corriente de entrada ( $f_{CN2,j}^{HOM}$ ) es separada en una corriente rica en PHA ( $f_{RC2,j}^{CN2}$ ) y una de desecho ( $f_{wst6,j}^{CN2}$ ).

$$f_{CN2,j}^{HOM} = f_{RC2,j}^{CN2} + f_{wst6,j}^{CN2} \quad (C.90)$$

$$\forall j \in \{agu, micr, pha\}$$

Se asume que el 80 % del agua que ingresa a la centrífuga es removida, y abandone el equipo en la corriente de desecho.

#### Reactor (RC2)

El balance de masa en el reactor RC2 determina que el flujo másico a la salida del mismo ( $f_{CN3,j}^{RC2}$ ) es igual a la suma de la corriente rica en PHA que ingresa al mismo ( $f_{RC2,j}^{CN2}$ ) y el solvente necesario para la extracción del biopolímero ( $f_{RC2,j}^{dsst}$ ).

$$f_{CN3,j}^{RC2} = f_{RC2,j}^{CN2} + f_{RC2,j}^{dsst} \quad (C.91)$$

$$\forall j \in \{agu, des, micr, pha\}$$

La alimentación de solvente necesario para realizar la extracción química del PHA ( $f_{RC2,des}^{dsst}$ ) está dada como una función del biopolímero acumulado ( $f_{RC2,pha}^{CN2}$ ) mediante el parámetro  $Q_{des}^{dsst}$ .

$$f_{RC2,des}^{dsst} = Q_{des}^{dsst} \cdot f_{RC2,pha}^{CN2} \quad (C.92)$$

### Centrífuga (CN3)

El balance de masa para las especies individuales en la centrífuga CN3 se formula a continuación:

$$f_{CN3,j}^{RC2} = f_{DC6,j}^{CN3} + f_{wst7,j}^{CN3} \quad (C.93)$$

$$\forall j \in \{agu, des, micr, pha\}$$

donde  $f_{CN3,j}^{RC2}$ ,  $f_{DC6,j}^{CN3}$  and  $f_{wst7,j}^{CN3}$  corresponde al flujo másico a la entrada de la centrífuga CN3, la corriente de proceso rica en PHA a la salida de la centrífuga CN3 y la corriente de desecho de dicho proceso, respectivamente.

Se asume que la totalidad de los residuos provenientes de los microorganismos, luego de extraído el PHA son recuperados e incorporados al digestor anaeróbico con el fin de incrementar la producción de biogás y tratar las corrientes residuales del proceso propuesto en el modelo correspondiente a este capítulo.

### Decantador (DC6)

El balance de masa en el decantador DC6 esta dado por siguiente ecuación, En esta instancia se considera la recuperación del 95 % del solvente por la corriente  $f_{dsst,des}^{DC6}$ .

$$f_{DC6,j}^{CN3} = f_{SD2,j}^{DC6} + f_{dsst,j}^{DC6} \quad (C.94)$$

$$\forall j \in \{agu, des, pha\}$$

Secador por aspersión (SD)

El balance de masa en el secador por aspersión (SD) determina que el flujo de entrada por las unidades DC5 o DC6.  $UU$  es igual a la suma del flujo másico correspondiente al producto final ( $pb$ ) y una corriente de desecho ( $wst8$ ).

$$f_{SD,j}^{DC5} + f_{SD,j}^{DC6} = f_{wst8,j}^{SD} + f_{pbs,j}^{SD} \quad \forall j \in \{agu, pha\} \quad (C.95)$$

El agua removida gracias a la implementación de esta unidad de proceso se obtiene a partir de la siguiente ecuación:

$$f_{wst8,agu}^{SD} = P_{agu}^{SD} \cdot f_{SD,agu}^{UU} \quad (C.96)$$

$UU$  representa a los decantadores DC4 or DC5, dependiendo del método de extracción seleccionado.

En la Tabla C.3 se muestran los valores de los parámetros empleados para la formulación de los balances de masa correspondientes al sector de producción de PHA planteados anteriormente.

**Tabla C.3.** Parámetros de balance de masa del sector de producción de PHA.

Parámetros	Valor	Unidades	Referencia
$Q_{agu}^{wr4}$	3,197	kg agu/kg glic	Mothes et al. (2007)
$C_{glic}^{BR1}$	0,6294	-	Cavalheiro et al. (2009)
$C_{pha}^{BR1}$	0,026958	mol pha/mol glic	Cavalheiro et al. (2009)
$Q_{micr}^{BR1}$	0,282787	kg micr/kg glic	Cavalheiro et al. (2009)
$C_{micr}^{BR2}$	0,089	kg micr/kg micr	Cavalheiro et al. (2009)
$C_{pha}^{BR2}$	0,439829	mol pha/mol glic	Cavalheiro et al. (2009)
$Q_{srf}^{schs}$	0,12	kg srf/kg micr	Chen et al. (2001)

$Q_{chel}^{schs}$	0,08	<i>kg chel/kg micr</i>	Chen <i>et al.</i> (2001)
$P_{agu}^{CN1}$	0,048	-	Posada <i>et al.</i> (2011)
$P_{agu}^{DC5}$	0,92	-	Posada <i>et al.</i> (2011)
$Q_{des}^{dssr}$	20	<i>kg des/kg pha</i>	Posada <i>et al.</i> (2011)
$P_{agu}^{SD}$	0,999	-	Harding <i>et al.</i> (2007)

---



## PUBLICACIONES Y CONGRESOS

A continuación se mencionan los trabajos presentados con la presente tesis:

Ramos, F. D.; Delpino, C. A.; Villar, M. A.; Diaz, M. S. Design and optimization of PHAs production plants using alternative substrates. *Bioresource Technology*. EN REVISIÓN.

Porras, M. A.; Ramos, F. D.; Diaz, M. S.; Cubitto, M. A.; Villar, M. A. Modeling the bioconversion of starch to P(HB-co-HV) optimized by experimental design using *Bacillus megaterium* BBST4 strain. *Environmental Technology*. 2019, 40 (9), 1185-1202. doi: 10.1080/09593330.2017.1418436

García Prieto, C. V.; Ramos, F. D.; Estrada V.; Diaz, M. S. Nutraceuticals production under a water-food-energy-waste integration concept. *Computer Aided Chemical Engineering*. 2018, 44, 1933-1938.

García Prieto, C. V.; Ramos, F. D.; Estrada, V.; Villar, M. A.; Diaz, M. S. Optimization of an integrated algae-based biorefinery for the production of biodiesel, astaxanthin and PHB. *Energy*. 2017, 139, 1159-1172, doi: 10.1016/j.energy.2017.08.036

Ramos, F. D.; Villar, M. A.; Diaz, M. S. Optimal design of poly(3-hydroxybutyrate) Production using alternative carbon sources. *Computer Aided Chemical Engineering*. 2017, 40, 877-882, doi: 10.1016/B978-0-444-63965-3.50148-3

Ramos, F. D.; Diaz, M. S.; Villar, M. A. Biocombustibles. *Ciencia Hoy* (ISSN 1666-5171). 2016, 25 (147), 69-73.

García Prieto, C. V.; Ramos, F. D.; Estrada, V.; Diaz, M. S. Optimal design of an integrated microalgae biorefinery for the production of biodiesel and PHBs. *Chemical Engineering Transactions*. 2014, 37, 319-324, doi: 10.3303/CET1437054

Ramos, F. D.; Estrada, V.; Diaz, M. S.; Villar, M. A. Optimización de la producción de poli( $\beta$ -hidroxibutirato) a partir de glicerol. *Iberoamerican Journal of Industrial Engineering* (ISSN 2175-8018). 2014, 6 (11), 261-270.

Ramos, F. D.; Estrada, V.; Villar, M. A.; Diaz, M. S. Producción de poli( $\beta$ -hidroxibutirato) utilizando glicerol como fuente de carbono. *Revista Científica* (ISSN 2070-8246). 2014, 24, 71-79.

Trapé, D. V.; Ramos, F. D.; Castillo, L. A.; López, O. V.; Diaz, M. S.; Villar, M. A. Utilización de vinaza como fuente de carbono para la producción de polihidroxicanoatos. III Workshop de Polímeros Biodegradables y Biocompatibles, Bahía Blanca, Argentina, 23-25 de abril de 2018.

Ramos, F. D.; Susca Tromba, J.; Castillo, L. A.; López, O. V.; Diaz, M. S.; Villar, M. A. Desarrollo de películas de polihidroxicanoato producido por fermentación microbiana de *Bacillus megaterium*. XII Simposio Argentino de Polímeros, Córdoba, Argentina, 18-20 de octubre de 2017.

Estrada, V.; Delpino, C. A.; Lasry Testa, R.; García Prieto, C. V.; Ramos, F. D.; Di Maggio, J. A.; Diaz, M. S. Estrategias de modelado matemático para el diseño y optimización de sistemas biotecnológicos. XI Simposio Nacional de Biotecnología REDBIO Argentina 2017, Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina, 11-13 de Septiembre de 2017.

Ramos, F. D.; Delpino, C. A.; Moitinho Alves, T. L.; Villar, M. A.; Diaz, M. S. Modelado matemático de la cinética de crecimiento de *Bacillus megaterium* BBST4 para la producción de poli( $\beta$ -hidroxibutirato). XI Simposio Nacional de Biotecnología REDBIO Argentina 2017, Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina, 11-13 de Septiembre de 2017.

Ramos, F. D.; Villar, M. A.; Diaz, M. S. Diseño óptimo de la producción de poli(hidroxicanoatos) empleando fuentes de carbono alternativas. XI Simposio Nacional de Biotecnología REDBIO Argentina 2017, Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina, 11-13 de Septiembre de 2017.

Ramos, F. D.; Delpino, C. A.; Moitinho Alves, T. L.; Villar, M. A.; Diaz, M. S. Modeling the fermentation kinetics for poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) production by *Bacillus megaterium* BBST4. IX Congreso Argentino de Ingeniería Química 2017, Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina, 6-9 de Octubre de 2017. ISSN: 1850-3500/1850-3519 Editor: AAIQ - Asociación Argentina de Ingenieros Químicos.



García Prieto, C. V.; Ramos, F. D.; Estrada, V.; Villar, M. A.; Diaz, M. S. Biorrefinería integrada basada en microalgas para la producción de astaxantina. IX Congreso Argentino de Ingeniería Química 2017, Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina, 6-9 de Octubre de 2017. ISSN: 1850-3500/1850-3519 Editor: AAIQ - Asociación Argentina de Ingenieros Químicos.

Ramos, F. D.; Susca Tromba, J.; López, O. V.; Castillo, L. A.; Diaz, M. S.; Villar, M. A. Poly(hydroxyalkanoate)s production by *Bacillus megaterium* BBST4 using an agroindustrial by-product as carbon source. XV Simposio Latinoamericano de Polímeros, Cancún, México, 23-27 de Octubre de 2016.

García Prieto, C. V.; Ramos, F. D.; Estrada, V.; Villar, M. A.; Diaz, M. S. Integrated microalgae-based biorefinery for astaxanthin production. 2<sup>nd</sup> RCN Conference on Pan American Biofuels & Bioenergy Sustainability, Buenos Aires, Argentina, 13-16 de Septiembre de 2016.

Porras, M. A.; Ramos, F. D.; Diaz, M. S.; Cubitto, M. A.; Villar, M. A. Modelado de la producción de poli(hidroxialcanoato)s a partir de almidón como fuente de carbono. XI Simposio Argentino de Polímeros 2015, Santa Fe, Argentina, 20-23 de Octubre de 2015.

Estrada, V.; Delpino, C. A.; Ramos, F. D.; García Prieto, C. G.; Di Maggio, J. A.; Ochoa, M. P.; Diaz, M. S. Diseño óptimo de biorrefinerías. X Simposio Nacional de Biotecnología REDBIO Argentina 2015, San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina, 2-4 de Septiembre de 2015.

García Prieto, C. V.; Delpino, C.; Ramos, F. D.; Andersen, F.; Estrada, V.; Diaz, M. S. Diseño óptimo de biorrefinerías. VIII Congreso Argentino de Ingeniería Química 2015, Buenos Aires, Argentina, 2-5 de Agosto de 2015.

Ramos, F. D.; Villar, M. A. Biorrefinerías, productos químicos básicos y energía a partir de recursos renovables. IV Congreso Latinoamericano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas a la Industria, San Rafael, Mendoza, 15-17 de Abril de 2015.

Ramos, F. D.; García Prieto, C. V.; Villar, M. A.; Estrada, V.; Diaz, M. S. Optimal design of an integrated algae-Based biorefinery for biodiesel,

astaxanthin and PHB production. AIChE Annual Meeting, Atlanta, USA, November 16-21, 2014. ISBN: 978-0-8169-1086-1

Ramos, F. D.; Cavallo, J. A.; Diaz, M. S.; Struima, M. C.; Gómez, C. G.; Villar, M. A. An attempt to obtain a model that describes the structural organization of the surface of modified polypropylene films. IV Latin American Symposium on Polymers and XII Ibero American Congress on Polymers, Porto de Galinhas, Brazil, 12-16 October, 2014. ISBN: 978-85-63273-26-0

Ramos, F. D.; García Prieto, C. V.; Estrada, V.; Villar, M. A.; Diaz, M. S. Design of an algae-based biorefinery for the integrated production of biodiesel and bioplastics. III Reunión Interdisciplinaria de Tecnología y Procesos Químicos 2014, Los Cocos, Córdoba, Argentina, 13-16 de Abril de 2014. ISBN: 978-950-33-1112-7

Ramos, F. D.; Estrada, V.; Diaz, M. S.; Villar, M. A. Modelado de un biorreactor en el proceso de producción de poli( $\beta$ -hidroxi-butirato) a partir de glicerol. VII Congreso Argentino de Ingeniería Química 2013, Rosario, Santa Fe, Argentina, 20-23 de Octubre de 2013. ISSN: 1850-3500/1850-3519 Editor: AAIQ-Asociación Argentina de Ingenieros Químicos.

Ramos, F. D.; Estrada, V.; Diaz, M. S.; Villar, M. A. Optimización de la producción de poli( $\beta$ -hidroxibutirato) a partir de glicerol. 2º Simposio de Informática Industrial 2013 (SII 2013) en las 42 Jornadas Argentinas de Informática, Ciudad de Córdoba, Argentina, 16-20 de Septiembre de 2013. ISSN 1850-2776 Editores: Carlos Areces, Laura Alonso Alemany, SII 2013 – ISSN 2313-9102.

Ramos, F. D.; Estrada, V.; Diaz, M. S.; Villar, M. A. Producción de poli( $\beta$  -hidroxibutirato) a partir de glicerol. Simulación y Dimensionamiento de Equipos. X Simposio Argentino de Polímeros 2013, Buenos Aires, Argentina, 28-30 de Agosto de 2013.

Ramos, F. D.; Estrada, V.; Diaz, M. S.; Villar, M. A. Poly( $\beta$  -hydroxybutyrate) production using glycerol as a carbon source. Workshop Pan-American Advanced Studies Institute NSF-PASI, "Polímeros y materiales compuestos a

partir de recursos renovables y biorrefinería: desde la química a las aplicaciones”, San José, Costa Rica, 4-17 de Agosto de 2013.

Ramos, F. D.; Villar, M. A.; Diaz, M. S. Diseño de biorrefinerías para la producción de poli(hidroxicarboxilatos) y otros metabolitos de alto valor agregado. Uso eficiente de residuos de la industria del biodiesel. XIV Jornadas de Exposición de Temas de Investigación de Becarios y Tesistas del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Sur (UNS) y la Planta Piloto de Ingeniería Química (PLAPIQUI), Bahía Blanca, Argentina, entre 25 de Febrero y 5 de Marzo de 2013.