



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA, BIOTECNOLOGÍA
Y MATERIALES**

DISEÑO CONCEPTUAL DE UNA PLANTA PRODUCTORA DE *YARROWIA LIPOLYTICA* PARA SU USO COMO PROTEÍNA UNICELULAR

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERA CIVIL QUÍMICA E INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

CONSTANZA JAVIERA CORREA ESTRADA

PROFESORA GUÍA:
MARÍA ELENA LIENQUEO CONTRERAS

MIEMBROS DE COMISIÓN:
IRENE MARTÍNEZ BASTERRECHEA
STEPHANIE BRAIN ISASI

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por:

Fondo Nacional de Desarrollo Científico
y Tecnológico, Fondecyt 1180794

SANTIAGO DE CHILE

2021

**RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR AL
TÍTULO DE:** Ingeniera Civil Química e Ingeniera Civil
en Biotecnología
POR: Constanza Javiera Correa Estrada
FECHA: Enero 2021
PROFESORA GUÍA: María Elena Lienqueo Contreras

DISEÑO CONCEPTUAL DE UNA PLANTA PRODUCTORA DE *YARROWIA LIPOLYTICA* PARA SU USO COMO PROTEÍNA UNICELULAR

En el contexto industrial actual, se hace cada vez más relevante el uso responsable de recursos para un desarrollo sostenible. En busca de esto, un concepto importante es el de biorrefinería, que hace referencia al aprovechamiento de todas las fracciones de una biomasa generando distintos tipos de biocompuestos y a la vez “cero desechos”. Tomando en cuenta dicho concepto, la estable industria algal en el país y la creciente necesidad de obtener nuevas fuentes de proteínas de alto valor biológico para alimentación, es que se propone la utilización del organismo *Yarrowia lipolytica*, un microorganismo **GRAS** (*del inglés Generally Recognized As Safe*) que tendría el potencial de crecer en gran variedad de sustratos produciendo proteínas. Surge entonces el objetivo general del presente estudio que consiste en realizar el diseño conceptual a escala industrial del cultivo de la levadura *Yarrowia lipolytica* ocupando como sustrato alga fresca *Macrocystis pyrifera*, con el fin de ser utilizado como proteína unicelular para alimentación animal.

Los objetivos específicos del proyecto consisten en: plantear un caso base y realizar el diseño conceptual de las etapas del proceso, entregar los balances de masa y dimensionamientos de los equipos, establecer los requerimientos energéticos de la planta, desarrollar diagramas que ilustren el flujo de material y la organización espacial de las instalaciones y establecer el nivel de influencia de los parámetros de crecimiento de la levadura en el diseño del proceso.

Se definió como caso base el procesamiento de 800 [t] anuales de alga fresca. Las principales operaciones del proceso se dividen en tres líneas: pretratamiento del sustrato algal, cultivo del microorganismo en los azúcares liberados y obtención de la proteína unicelular producida, destacando las operaciones de sacarificación, fermentación y secado. Utilizando una metodología predefinida de pretratamiento y datos de crecimiento del hongo en variados sustratos, se estimó una producción de 206,7 [Kg biomasa seca/lote] con un rendimiento de 217,6 [g] de biomasa seca por [kg] de alga seca, asumiendo un contenido de 39% de proteínas. El procesamiento de cada lote toma un tiempo de 3 días, lo que representa una productividad de 27 [g proteína/día], en donde destaca la utilización de un reactor batch de sacarificación de 15,8 [m^3], un fermentador batch de 38,7 [m^3] y un secador spray de 1,05 [m] de diámetro. El estudio de los requerimientos energéticos indica que se requieren 5 corrientes de enfriamiento de agua de un total de ~59.832 [m^3 / lote] para mantener las condiciones de operación de cada uno de los equipos del proceso. Mientras que el análisis de sensibilidad muestra que el parámetro que más afecta la producción de la planta es el rendimiento de biomasa en el sustrato y el diseño de la planta es la tasa de crecimiento del hongo.

Dada la falta de información del crecimiento del hongo en el sustrato en estudio, el diseño tiene un alto grado de incertidumbre y responde a una aproximación de la producción industrial. Sin embargo, se proyecta que una vez conocidos los parámetros cinéticos del microorganismo en futuros estudios en laboratorio sea posible validar los supuestos tomados y pensar en el presente diseño como una posibilidad de desarrollo industrial de proteína para alimentación animal.

A Pamela y Marcelo.

Agradecimientos

Sin dudar, tengo que empezar agradeciendo a los mejores, mis padres. Infinitas gracias por la contención, la paciencia y la confianza ciega que siempre han depositado en mí, a pesar de todo el drama innecesario que le pongo a la vida, sé que siempre me van a apoyar. Cuando sea grande quiero ser como ustedes.

En segundo lugar, al Guido. Las madrugadas de estudio no hubiesen sido lo mismo sin su compañía y efecto terapéutico. También a mi familia, tías, primas y perris que siempre están presentes y preocupadas.

Tengo que agradecer a toda la gente que conocí en la universidad y me apoyaron con sus conocimientos o su amistad. A mis amigos de plan común por las pedidas de sala. A mi grupo de amigos más cercanos de la U (Maryis, Danaia, Flavis, Deivi, Benja, Álvaro, Maquis, Simón y Vale) por los almuerzos en el pasto, las anvorguesas del vicio capital y el apoyo moral. A los grupos de trabajo que formé dentro del DIQBM (mención especial al grupo acero y la Vanesita y a los almendritos: Talo, Sami y Lukas) por enseñarme muchísimo sobre la importancia del trabajo en equipo y la empatía (fuera de ayudarme a recordar todos los ramos borrados de mi memoria).

Agradezco a mi profesora guía, María Elena, por la disponibilidad y la preocupación que me permitieron sobrellevar la ansiedad de la tesis en tiempos pandémicos.

De la misma forma, agradecer el apoyo del Centro de Biotecnología y Bioingeniería (CeBiB) y al proyecto Fondecyt 1180794.

Finalmente, a mi nona hermosa por cruzarse en cada uno de mis pensamientos.

Tabla de contenido

1.	Introducción.....	1
1.1	Antecedentes generales.....	1
1.1.1	Biorrefinerías.....	1
1.1.2	Producción de proteína unicelular (SCP) a partir de hongos.....	1
1.1.3	Industria algal en Chile.....	3
1.2	Motivación.....	4
1.3	Objetivos.....	4
1.3.1	Objetivo general.....	4
1.3.2	Objetivos específicos.....	4
2.	Marco teórico.....	5
2.1	Yarrowia lipolytica.....	5
2.1.1	Taxonomía, presencia y seguridad de Y. lipolytica.....	5
2.1.2	Usos industriales de Y. lipolytica.....	6
2.1.3	Composición del hongo Y. lipolytica.....	7
2.1.4	Yarrowia lipolytica como proteína unicelular (SCP).....	9
2.1.5	Parámetros cinéticos de Y. lipolytica.....	12
2.2	Macrocystis pyrifera como fuente de carbono.....	14
2.2.1	Caracterización M. pyrifera (Huiro).....	14
2.2.2	Producción de M. pyrifera.....	15
2.2.3	Alginato en M. pyrifera.....	15
2.2.4	Sacarificación del alginato presente en M. pyrifera a escala piloto.....	15
2.2.5	Caracterización de contaminantes y organismos presentes en las frondas de M. pyrifera.....	16
3.	Metodología.....	18
3.1	Metodología general.....	18
3.2	Materiales.....	19
4.	Resultados.....	20
4.1	Proceso productivo.....	20
4.1.1	Límite de batería.....	20
4.1.2	Descripción del proceso.....	20
4.1.3	Caso base.....	22
4.2	Balances de masa.....	22
4.2.1	Lavado.....	22

4.2.2	Molienda.....	23
4.2.3	Lixiviación ácida	24
4.2.4	Separación por membrana	25
4.2.5	Depolimerización.....	27
4.2.6	Sacarificación	28
4.2.7	Cultivo de adaptación	29
4.2.8	Precultivo en medio YPD	31
4.2.9	Cultivo en medio algal.....	32
4.2.10	Centrifugación	34
4.2.11	Secado.....	34
4.2.12	Balance de masa global	35
4.2.13	Rendimientos	36
4.3	Dimensionamientos	37
4.3.1	Selección de equipos	37
4.3.2	Dimensiones	38
4.4	Balances de energía	39
4.5	Diagrama de flujos.....	43
4.6	Análisis de sensibilidad	45
4.7	Disposición de la planta (layout)	46
5.	Discusiones.....	48
6.	Alcances.....	52
7.	Conclusiones.....	53
8.	Recomendaciones	54
9.	Bibliografía.....	55
10.	Anexos	61
10.1	Anexo 1: Estadísticas sernapesca año 2017	61
10.2	Anexo 2: Caracterización de organismos en frondas de <i>M. pyrifera</i>	63
10.3	Anexo3: Tiempos de procesamiento y caso base.....	66
10.4	Anexo 4: Balances de masa.....	67
10.4.1	Lavado	67
10.4.2	Molienda.....	68
10.4.3	Lixiviación ácida	69
10.4.4	Separación por membrana	70
10.4.5	Depolimerización.....	71

10.4.6	Sacarificación	74
10.4.7	Cultivo de adaptación	75
10.4.8	Precultivo en medio YPD	77
10.4.9	Fermentación en DEHU	80
10.4.10	Centrífuga	82
10.4.11	Secador.....	83
10.5	Anexo 5: Cálculo de consumo en fermentaciones	84
10.6	Anexo 6: Dimensionamientos	87
10.6.1	Tanque, reactores y fermentadores	87
10.6.2	Membranas	92
10.6.3	Centrífuga	95
10.6.4	Secador	97
10.7	Anexo 7: Balances de energía	107
10.7.1	Calentamientos	107
10.7.2	Enfriamientos	108
10.7.3	Mantenciones.....	110

Índice de tablas

<i>Tabla 1: Contenido proteico de SCP producida por diferentes hongos a partir de diferentes sustratos. Fuente: adaptado desde Ritala et al. (2017)</i>	3
<i>Tabla 2: Contenido nutricional de Yarrowia lipolytica comparada con S. cerevisiae, harina de soya y harina de canola (Fuente: Czech et al. 2016^[29], Patsios et al. 2020^[32])</i>	7
<i>Tabla 3: composición mineral promedio en base seca de Y. lipolytica A-101 en glicerol comparada con S. cerevisiae</i>	7
<i>Tabla 4: Composición aminoacídica de Yarrowia lipolytica comparada con Candida utilis y recomendaciones de la FAO. **indica aminoácidos esenciales (Fuente: Czech et al. 2016, Juszczyk et al. 2013, Jach et al. 2017)</i>	8
<i>Tabla 5: Composición lipídica de Yarrowia lipolytica W29 en medio YPD. (Fuente: Athenstaedt et al. 2006)</i>	9
<i>Tabla 6: Sustratos, condiciones de crecimiento (en rojo las condiciones óptimas definidas en cada estudio correspondiente) y contenido de proteína reportado para la producción de SCP</i>	10
<i>Tabla 7: Parámetros cinéticos de la levadura Y. lipolytica (en diferentes sustratos) y otros hongos en medio con alginato</i>	13
<i>Tabla 8: Cantidad de organismos encontrados en N trozos de 10 [g] c/u de M. pyrifera, según el mes del año y sección de la fronda desde el que se recolectó^[57]</i>	17
<i>Tabla 9: Flujos máxicos por corriente en etapa de lavado</i>	23
<i>Tabla 10: Flujos máxicos por corriente en etapa de molienda</i>	24
<i>Tabla 11: Flujos máxicos por corriente en etapa de lixiviación ácida</i>	25
<i>Tabla 12: Flujos máxicos por corriente en etapa de separación por membrana</i>	26
<i>Tabla 13: Flujos máxicos por corriente en etapa de depolimerización</i>	28
<i>Tabla 14: Flujos máxicos por corriente en etapa de sacarificación</i>	29
<i>Tabla 15: Flujos máxicos por corriente en etapa del cultivo de adaptación</i>	30
<i>Tabla 16: Flujos máxicos por corriente en etapa del precultivo en medio YPD</i>	32
<i>Tabla 17: Flujos máxicos por corriente en etapa de la fermentación en medio algal</i>	33
<i>Tabla 18: Flujos máxicos por corriente en etapa de centrifugación</i>	34
<i>Tabla 19: Flujos máxicos por corriente en etapa de secado</i>	35

<i>Tabla 20: Corrientes de entrada y salida del proceso productivo global.</i>	36
<i>Tabla 21: Rendimientos de biomasa seca y proteína en alga fresca y alga seca</i>	36
<i>Tabla 22: Dimensiones de tanque, reactores y fermentadores.</i>	38
<i>Tabla 23: Dimensiones características equipos continuos.</i>	39
<i>Tabla 24: Calor requerido para las operaciones de calentamiento (entregado por resistencias eléctricas)</i>	40
<i>Tabla 25: Calor removido por las operaciones de enfriamiento (Q total), flujos de servicio, área de intercambiadores (A) y tiempo de enfriamiento (t).</i>	41
<i>Tabla 26: Calor de mantención (Q_m) a remover según los valores de calor cedido al ambiente por convección (Q_p), potencia de agitación (ws) y entalpía de reacción (ΔH_{rxn}).</i>	42
<i>Tabla 27: Flujo de servicio requerido para la mantención del fermentador 3.</i>	42
<i>Tabla 28: Flujos de servicio totales y energía requerida para producirlos.</i>	42
<i>Tabla 29: Variación de la producción al modificar el rendimiento</i>	45
<i>Tabla 30: Variación de tiempos de procesamiento y tamaño de reactores al modificar la tasa de crecimiento</i>	45
<i>Tabla A 1: Desembarque total de algas año 2017 por especie y región (Fuente: sernapesca (2017))</i>	61
<i>Tabla A 2: Desembarque total de algas año 2017 por especie y mes (Fuente: sernapesca, 2017)</i>	62
<i>Tabla A 3: Cantidad de individuos encontrados en N segmentos de 10 gramos, según ubicación geográfica, mes del año y zona de la fronda desde donde se extrajo.</i>	63
<i>Tabla A 4: Peso de organismos presentes en algas de la XII región.</i>	64
<i>Tabla A 5: Cálculo de la cantidad de gramos de organismos cada 10 gramos de alga</i>	65
<i>Tabla A 6: Datos utilizados para obtener los balances de masa en la depolimerización</i>	71
<i>Tabla A 7: Datos utilizados en el balance de masa del precultivo en medio YPD.</i>	77
<i>Tabla A 8: Datos para calcular el consumo de las fermentaciones</i>	84
<i>Tabla A 9: Volúmenes de trabajo por equipo</i>	87
<i>Tabla A 10: Dimensiones características de tanque, reactores y fermentadores</i>	88

<i>Tabla A 11:Revoluciones por segundo (N) necesarias para mantener el nivel de agitación.</i>	89
<i>Tabla A 12: Número de Reynolds para cada reactor y fermentador</i>	90
<i>Tabla A 13: Cálculo de la potencia para cada reactor y fermentador</i>	91
<i>Tabla A 14: Resultados de la potencia consumida por la agitación con gas en los fermentadores</i>	92
<i>Tabla A 15: Tabla de cross flows típicos de membranas espiral [membrana]</i>	93
<i>Tabla A 16: Catálogo de tipo y código de membrana.</i>	94
<i>Tabla A 17:Dimensiones de la membrana según el diámetro externo de la espiral.</i>	94
<i>Tabla A 18: Dimensiones características de las cuatro membranas seleccionadas para las condiciones de operación</i>	94
<i>Tabla A 19: Datos para el dimensionamiento de la centrífuga</i>	95
<i>Tabla A 20: Datos para el dimensionamiento del secador.</i>	97
<i>Tabla A 21:Calores específicos de sustancias presentes en los medios.</i>	107
<i>Tabla A 22: Valores de Cp asumidos y calculados para los medios trabajados.</i>	108
<i>Tabla A 23: Cálculo del calor necesario para subir la T° de los medios</i>	108
<i>Tabla A 24: Flujos de calor a remover, kilogramos de flujo de servicio, tiempo de enfriamiento y cálculos de área de los intercambiadores.</i>	110
<i>Tabla A 25: Cálculo del calor cedido por convección al ambiente.</i>	111
<i>Tabla A 26: Resultados del calor de mantención de cada etapa estudiada.</i>	113
<i>Tabla A 27: Cálculo del área del intercambiador interno del fermentador 3.</i>	113

Índice de figuras

<i>Figura 1: Figura 1: Aumento de la producción de carne y lácteos durante los años 1961 a 2019 en Sudamérica. Fuente: datos de FAOStat [5]</i>	2
<i>Figura 2: Morfología de Yarrowia Lipolytica, creciendo como levadura (izquierda) y como micelio (derecha) [30]</i>	5
<i>Figura 3: Producción de carotenoides en Yarrowia Lipolytica. Fuente: Groenewald, 2013[28] cortesía de DSM</i>	6
<i>Figura 4: Efecto de las diferentes fuentes de nitrógeno en el crecimiento celular (blanco), la producción de SCP (negro) y el total de proteína (gris). La concentración de las diferentes fuentes de nitrógeno fue de 0,5% (p/v). (Fuente: Cui et al. 2011)</i>	11
<i>Figura 5: concentración de ácidos nucleicos durante las fases de crecimiento de Y. lipolytica A-101 en medio SK (mix de aceites vegetales, desgomado y fracciones de glicerol). Se observa una reducción bajo el 1% al final de la fase estacionaria (hora 10) ^[34]</i>	12
<i>Figura 6: Frondas de una población de Macrocyctis pyrifera (Fuente: subpesca [52])</i>	14
<i>Figura 7: a) Análisis proximal de la macroalga M. pyrifera y b) Caracterización de carbohidratos del alga ^[54]</i>	15
<i>Figura 8: Porcentaje de isópodos, ostrácodos y copépodos encontrados en el total de organismos presentes en el mes de otoño, en secciones de M. pyrifera de la isla Carlos III ^[57]</i>	17
<i>Figura 9: Resumen etapas metodológicas generales</i>	18
<i>Figura 10: Etapas a estudiar para la confección del diseño del proceso</i>	18
<i>Figura 11: Diagrama de bloques del proceso de producción de SCP de Y. lipolytica (en azul la línea de pretratamiento, en rojo la línea de cultivo y en verde la línea de obtención de SCP)</i>	22
<i>Figura 12: Diagrama de flujos de la etapa de lavado</i>	23
<i>Figura 13: Diagrama de flujos de la etapa de molienda</i>	23
<i>Figura 14: Diagrama de flujos de la etapa de lixiviación ácida</i>	25
<i>Figura 15: Diagrama de flujos de la etapa de separación por membrana.</i>	25
<i>Figura 16: Diagrama de flujos de la etapa de depolimerización</i>	27
<i>Figura 17: Diagrama de flujos de la etapa de sacarificación.</i>	28
<i>Figura 18: perfil de crecimiento y consumo de sustrato en de la levadura Y. lipolytica en medio compuesto de glucosa y manitol ^[47].</i>	29

<i>Figura 19: Diagrama de flujos de la etapa de cultivo de adaptación.</i>	30
<i>Figura 20: Diagrama de flujos de la etapa de cultivo en medio YPD.</i>	31
<i>Figura 21: Diagrama de flujos de la etapa de cultivo en medio algal.</i>	32
<i>Figura 22: Diagrama de flujos de la etapa de centrifugación.</i>	34
<i>Figura 23: Diagrama de flujos de la etapa de cultivo de secado.</i>	35
<i>Figura 24: Diagrama de flujo de la planta de producción de proteína celular de <i>Y. lipolytica</i> a partir de <i>M. pyrifera</i></i>	44
<i>Figura 25: Diseño preliminar de la planta productiva de proteína unicelular desde <i>Y. lipolytica</i>.</i>	47
<i>Figura A 1: Abundancia porcentual de organismos en el total de organismos encontrados en el mes de otoño, por ubicación geográfica.</i>	64
<i>Figura A 2: Distribución de los tiempos de trabajo de cada equipo para conocer el tiempo de procesamiento por lote.</i>	66
<i>Figura A 3: Correlación entre el número de Reynolds y el número de potencia para tres tipos de agitadores</i>	90
<i>Figura A 4: Formato de designación de las membranas</i>	93
<i>Figura A 5: Dimensiones características de las membranas espiral</i>	94

1. Introducción

1.1 Antecedentes generales

1.1.1 *Biorrefinerías*

En la actualidad, es importante preocuparse en fortalecer bioeconomías sustentables en donde no se generen flujos de desechos. Así, la integración de distintos procesos de conversión de biomasa para producir energía, alimentos o productos con valor agregado en una sola instalación, con la mínima cantidad de desechos, es conocido como una biorrefinería ^[1].

Dicho concepto ofrece una forma de desarrollar la economía industrial sostenible y reducir el impacto sobre el cambio climático si se utilizaran todos los recursos biológicos de una cadena de manera eficiente, pudiendo crear industrias con cero desechos ^[1].

Últimamente, el concepto de biorrefinería incluye mayormente el uso de plantas y bosques, avanzando hacia el desarrollo del uso de algas. Esto debido principalmente a que el uso de biomasa de primera y segunda generación (biomasa generalmente comestible y materia lignocelulósica o desechos sólidos respectivamente) ^[2] destinada para la producción de biocombustibles líquidos, está afectando significativamente a la economía debido a la competencia por su uso como alimento y energía ^[1].

El uso de macroalgas como biomasa de tercera generación tiene un gran potencial en reemplazar la biomasa terrestre, como una biomasa que no es utilizada como alimento ni compite en el uso de recursos para su crecimiento. Por estas razones, el desarrollo de biorrefinerías de algas está atrayendo mucha atención, dadas las valiosas sustancias que presenta para desarrollar prometedoras economías bajas en emisiones de carbono ^[1].

1.1.2 *Producción de proteína unicelular (SCP) a partir de hongos*

Humanos y animales consumen proteína como fuente de nitrógeno y de aminoácidos esenciales, desde donde se construyen proteínas estructurales y funcionales que permiten a los individuos sobrevivir. Cabe recordar que el valor nutricional de la proteína está determinado por su composición aminoacídica; veinte aminoácidos son comúnmente encontrados en las proteínas, de los cuales nueve (fenilalanina, valina, treonina, triptófano, metionina, leucina, isoleucina, lisina e histidina) no son sintetizados por el ser humano o animales (por lo cual son llamados aminoácidos esenciales) y deben ser suministrados a través de la dieta ^[3].

Se ha explorado cómo una creciente demanda de proteína de carne y lácteos podría requerir un aumento en la producción animal, o al mismo tiempo, abrir espacios para nuevas fuentes de proteínas para el consumo humano y animal directo. Dicha demanda ha aumentado constantemente en las últimas décadas y podría continuar haciéndolo para satisfacer la demanda esperada en el 2050 que superaría los 435 millones de toneladas para la carne y los 843 millones de toneladas en productos lácteos a nivel mundial ^[4]. En la Figura 1 se ilustra el aumento en la producción de toneladas de carne y lácteos en Sudamérica desde el año 1961 al 2019, según datos de FAOStat. ^[5]

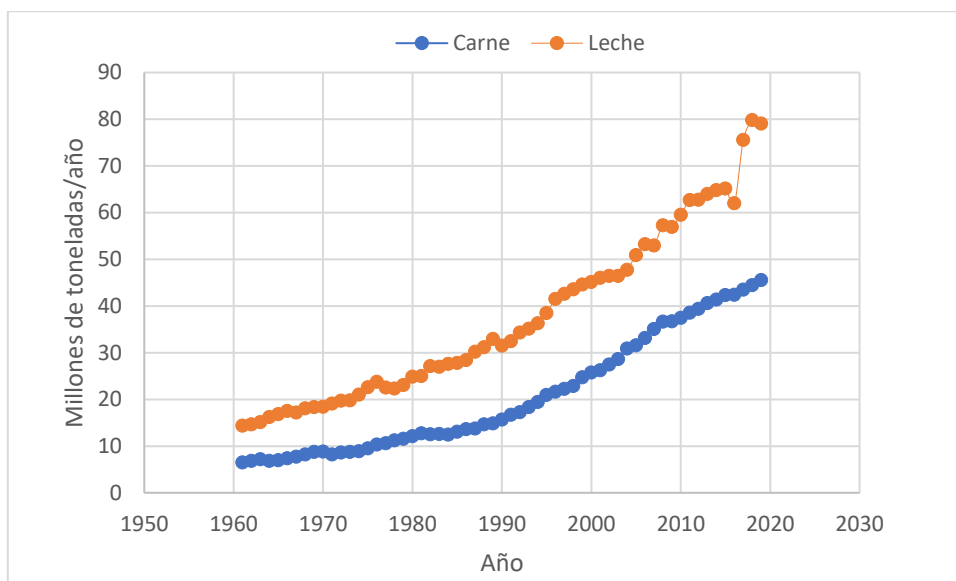


Figura 1: Aumento de la producción de carne y lácteos durante los años 1961 a 2019 en Sudamérica. Fuente: datos de FAOStat [5]

El mundo occidental está interesado en desarrollar comida saludable, con una composición óptima de aminoácidos y baja cantidad de grasa de buena calidad, combinado con una producción éticamente sustentable [6]. En esta línea, las proteínas basadas en fuentes vegetales, como legumbres, son nutricionalmente fuentes valiosas de proteína, pero requieren terrenos cultivables y agua, que podrían convertirse en limitantes si se planea alcanzar la demanda global de proteína [7].

Sin embargo, las proteínas pueden provenir desde el cultivo de variados microorganismos y algas, principalmente de los que contienen más de 30% de dicho macronutriente en su biomasa y que puedan proveer un balance saludable de aminoácidos esenciales. La proteína microbiana es generalmente conocida como proteína unicelular (*del inglés Single Cell Protein SCP*), aun cuando algunos de los microorganismos como los hongos filamentosos puedan ser pluricelulares. Además, las SCP pueden utilizarse directamente o pueden utilizarse microorganismos que contribuyan a la demanda de proteína, fibra o vitaminas cuando se usan para mejorar la calidad nutricional de alimentos fermentados [8].

Las proteínas unicelulares (SCP) son actualmente producidas por un número limitado de microorganismos, especialmente en el caso del consumo humano. Sin embargo, el rango de fuentes de SCP aprobados para ser utilizados en consumo animal es mayor y va en expansión. Es aquí donde se hace importante el concepto de microorganismos GRAS (*del inglés Generally Recognized As Safe*) [3].

En cuanto a la producción de SCP, los productos derivados de algas, hongos y bacterias están siendo utilizados o se están desarrollando mediante los siguientes pasos que incluyen:

- a) preparación del medio nutritivo, posiblemente desde desechos
- b) cultivo y fermentación
- c) separación y concentración de SCP
- d) procesamiento del SCP en ingredientes y productos.

A continuación, en la Tabla 1, se listan algunos hongos y levaduras que han sido investigados para la producción de SCP, con la concentración de proteína alcanzada y el medio o sustrato que se utilizó para su crecimiento [3]. Cabe destacar que dentro del laboratorio del CeBiB, se han realizado investigaciones para la producción de SCP con variados hongos y algas como medio de crecimiento; como es el caso del uso de *Ulva spp* para el crecimiento de *Trichoderma reesei* o del hongo *Paradendryphiella salina* utilizando *Macrocystis pyrifera* como sustrato. De este último, fue posible la obtención de micoproteína (micelio de *P. salina* más alga hidrolizada) con un contenido de proteína total aumentado en un 141% y contenido de aminoácidos aumentado en un 73,5% respecto a la biomasa presente previo a la fermentación [9].

Tabla 1: Contenido proteico de SCP producida por diferentes hongos a partir de diferentes sustratos. Fuente: adaptado desde Ritala et al. (2017)

Organismo	Sustrato	Contenido proteico (%)	Referencia
<i>Aspergillus niger</i>	Residuos procesados de almidón de papa	38	[10], [11]
<i>Candida crusei</i>	Suero de queso	48	[12]
<i>Candida utilis</i>	Residuos industriales de almidón de papa	46	[10]
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Granos agotados de la cervecera hidrolizados hemicelulósicos	32	[13]
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Frutos de palma fuera de fecha	49	[14]
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Suero de queso	43	[12], [15]
Levadura marina no especificada	Desechos de cáscara de camarón	61-70	[16]
<i>Penicillium citrinum</i>	Salvado de arroz	10	[17]
<i>Pleurotus florida</i>	Paja de trigo	63	[18]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Pulpa de naranja, melaza, grano cervecero agotado	24	[19]
<i>Trichoderma harzianum</i>	Suero de queso filtrado	34	[20]
<i>Trichoderma virideae</i>	Pulpa de cítricos	32	[21]
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Inulina, petróleo crudo, desechos de glicerol de hidrocarburos	48-54	[22]

1.1.3 Industria algal en Chile

Chile posee más de 80.000 km de costa, haciéndolo uno de los más importantes productores de algas a nivel mundial, con un valor total anual de exportaciones de alrededor de US\$300 millones al año 2015. La industria chilena produjo aproximadamente 66.500 [t] de alga seca (alga roja y parda) y aproximadamente 8.500 [t] de extractos de alga procesados (agar, carragenanos y alginatos) durante el mismo año [23].

La población natural de algas comenzó a ser comercializada alrededor del año 1950 por pescadores tradicionales. Sin embargo, aún la mayoría de la producción de alga chilena es explotada desde poblaciones naturales de algas (no cultivadas). La alta demanda del mercado asiático ha llevado a casi duplicar el precio internacional del alga en los últimos 10 años [23].

Durante el año 2017, el volumen de alga cosechada alcanzó las 409.000 [t] en peso húmedo. De este total un 70% corresponde a variadas especies de Phaeophyta (algas pardas), con el Huiro negro como el principal producto cosechado, mientras que el 30% restante corresponde mayormente a variedades de Rhodophyta (algas rojas). Además, las regiones con mayor cosecha son la de Atacama y la de Los Lagos, siendo los meses de enero y febrero los más productivos (para mayor detalle ver Anexo 1) [24].

En los últimos años, la extracción desde las áreas usuales se ha estabilizado, principalmente por la sobre cosecha y por la incorporación de nuevas áreas de poblaciones naturales que compensan la reducción de áreas sobreexplotadas [23].

1.2 Motivación

Dados los antecedentes mencionados, tomando en cuenta el concepto de biorrefinería, la estable industria algal en el país y la creciente necesidad de obtener nuevas fuentes de proteínas de alto valor biológico para alimentación, la motivación de este proyecto se centra en el diseño de una planta productiva a escala industrial que busque el aprovechamiento de todas las fracciones de biomasa algal rica en alginato, mediante la producción de proteína unicelular (SCP) a partir de la fermentación con biomasa fúngica.

En consecuencia, se propone la utilización del organismo *Yarrowia lipolytica*, una levadura no convencional que se ha reportado capaz de crecer en variedad de sustratos (convencionales como el almidón, melazas, fruta y desechos vegetales; y no convencionales como fracciones de petróleo, gas natural, etanol, metanol, residuos de grasa animal, entre otros [25]) que además es microorganismo **GRAS** (*del inglés Generally Recognized As Safe*) y tendría potencial de crecer en sustrato algal rico en alginato produciendo proteínas y ácidos grasos que podrían ser utilizados para nutrición animal.

1.3 Objetivos

1.3.1 *Objetivo general*

El objetivo general del presente trabajo de título es realizar el diseño conceptual a escala industrial del cultivo de la levadura *Yarrowia lipolytica* en alga fresca *Macrocystis pyrifera*, con el fin de ser utilizado como proteína unicelular para alimento animal.

1.3.2 *Objetivos específicos*

Los objetivos específicos del presente trabajo son:

- ✓ Definir las operaciones unitarias del procesamiento de alga fresca, cultivo y obtención de proteína unicelular de *Y. lipolytica*.
- ✓ Determinar la cantidad de insumos, productos y nivel de producción de proteína unicelular a partir del consumo de alga parda *M. pyrifera*.
- ✓ Determinar la dimensión de los equipos que compongan la planta productora de proteína unicelular.
- ✓ Determinar el consumo energético de una planta productora de proteína unicelular a partir de alga fresca.
- ✓ Determinar el tamaño y disposición (layout) de una planta productora de proteína unicelular a partir de alga fresca.

2. Marco teórico

A continuación, se expondrán antecedentes relevantes a considerar para el diseño del proceso productivo.

2.1 *Yarrowia lipolytica*

2.1.1 *Taxonomía, presencia y seguridad de Y. lipolytica*

Yarrowia lipolytica es una levadura oleaginoso dimórfica (*i.e.* con transición reversible entre el hábito de crecimiento de una levadura y uno micelial ^[26]) perteneciente al filo Ascomycota, que exhibe remarcables actividades lipolíticas y proteolíticas pudiendo acumular más del 40% de su peso seco en lípidos intracelulares, además de su alto contenido de proteína y concentraciones de aminoácidos esenciales como la lisina. Su presencia natural es bastante variada, encontrándose en suelos, aguas marinas, micorrizas (simbiosis entre un hongo y las raíces de una planta) y una variedad de alimentos como leche, diferentes tipos de queso y carnes, salame, jamón, embutidos, entre otros ^{[27] [28] [29]}.

Es la única especie teleomorfa en su género (*i.e.* sexual), desarrollando cuerpos de fructificación. Sus ascosporas (meiosporas) maduras son generalmente semi elipsoidales abarquilladas cuando se miran desde el costado, como se muestra en la Figura 2 ^[28].

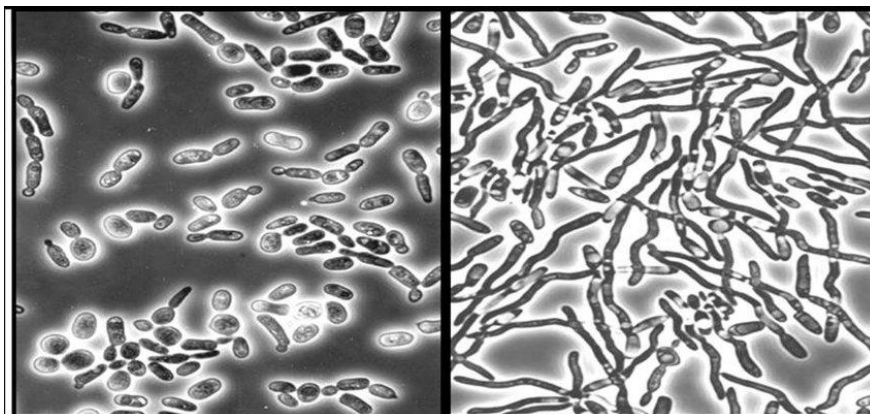


Figura 2: Morfología de *Yarrowia Lipolytica*, creciendo como levadura (izquierda) y como micelio (derecha) [30]

Y. lipolytica es generalmente considerada como un microorganismo de clase 1 en bioseguridad, esta clase abarca microorganismos que son conocidos por no causar enfermedades en la salud de humanos adultos. Existen estudios que la respaldan para ser usada como alimento animal o humano, o para ser desplegada como un huésped para gran variedad de aplicaciones biotecnológicas ^[28].

En estudios de eficacia y seguridad realizados en granjas y laboratorios animales, los productos obtenidos no resultaron tener efectos secundarios notables, no solo cuando están altamente purificados, sino también cuando significativas porciones de biomasa de *Y. lipolytica* permanecían en el producto final (como la producción de aceite rico en EPA) o cuando *Y. lipolytica* por si misma era el producto final (producto de SCP). Además, la presencia natural de la levadura en alimentos, principalmente en queso, otros lácteos y carnes, es un argumento adicional a favor de su seguridad; razones por las cuales la FDA de Estados Unidos ha concedido a varios procesos de producción que utilizan *Y. lipolytica* el estatus GRAS. ^[28].

2.1.2 Usos industriales de *Y. lipolytica*

La levadura *Y. lipolytica* es conocida por su habilidad para producir ácidos orgánicos, polioles y biomasa desde fuentes de carbono atípicas tales como glicerol crudo, n-alcenos o residuos agroindustriales. Esta característica permite la biosíntesis de productos con valor agregado desde sustratos de bajo costo, haciendo a *Yarrowia* un atractivo huésped para aplicaciones industriales [31].

A continuación, se listarán algunos usos desarrollados desde 1950 con *Y. lipolytica* [28]:

- a) Los pioneros fueron British Petroleum (BP) quienes exploraron diferentes huéspedes para la producción a gran escala de proteína de alta calidad (SCP), para asegurar la nutrición de la creciente población mundial. Los sustratos de bajo costo utilizados fueron metanol, etanol y diferentes fracciones de petróleo, así como corrientes residuales de diferentes industrias. Sin embargo, autoridades rechazaron los permisos para el producto a pesar de la amplia evidencia, escogiendo venderlo como producto para nutrición de ganado.
- b) Producción de ácido cítrico (con estatus GRAS otorgado por la FDA). Su gran potencial para la producción de ácidos orgánicos ha sido confirmado en la literatura científica no solo para el ácido cítrico, sino también para ácido isocítrico, α -cetoglutámico, pirúvico, succínico y acético.
- c) Producción de manitol y eritritol por Baolingbao Biology Co. Ltd. China. Utilizados para su adición a comidas como endulzante, potenciador del sabor, humectante, estabilizador, espesante y texturizador.
- d) Gracias a que puede acumular grandes cantidades de lípidos intracelulares, se ha utilizado para la producción de ácido linoleico desde la cepa salvaje, pero se ha modificado genéticamente creando cepas recombinantes para la sobreproducción de ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido linoleico conjugado o ácido γ -linolénico.
- e) Ha sido utilizado para la producción de carotenoides, un agente colorante y estabilizante natural para los alimentos, por la empresa Microbia (actual DSM) (ver Figura 3).
- f) Ha sido explorada como huésped de producción de proteínas y enzimas terapéuticas e industriales por grandes industrias como Pfizer o Novozymes.

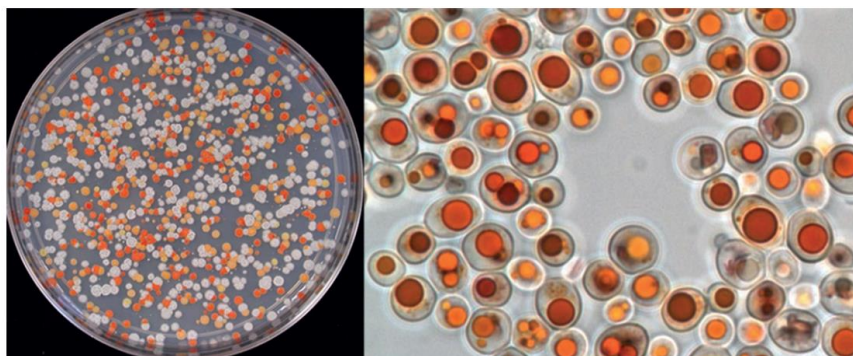


Figura 3: Producción de carotenoides en *Yarrowia Lipolytica*. Fuente: Groenewald, 2013[28] cortesía de DSM

2.1.3 Composición del hongo *Y. lipolytica*

La levadura *Y. lipolytica* puede ser un constituyente valioso de compuestos alimenticios dado su alto contenido de proteínas, aminoácidos esenciales, lípidos y minerales. El contenido nutricional de las levaduras está influenciado por factores como la tecnología de producción, el tipo de cepa utilizada y la calidad del medio que hará de sustrato. Por esta razón, la composición química de diferentes cepas de levadura puede variar ^[29].

A continuación, en la Tabla 2 se presenta el contenido de la levadura *Y. lipolytica* obtenido a partir de estudios realizados sobre su efecto en el crecimiento de lechones comparado con el uso de *Saccharomyces cerevisiae*, por Anna Czech *et al.* (2016) ^[29]. La levadura utilizada fue la cepa comercial *Y. Lipolytica* A-101 cultivada en residuos de glicerol de la producción de biocombustible de canola. En la misma tabla se efectúa la comparación nutricional con la harina de soya y de canola.

Tabla 2: Contenido nutricional de *Yarrowia lipolytica* comparada con *S. cerevisiae*, harina de soya y harina de canola (Fuente: Czech *et al.* 2016 ^[29], Patsios *et al.* 2020^[32])

Parámetro	Contenido nutricional porcentual en base a biomasa seca											
	<i>Yarrowia lipolytica</i> A-101 en glicerol ^[29]			<i>S. cerevisiae</i> en glicerol ^[29]			Harina de soya ^[32]			Harina de canola ^[32]		
	Min.	Máx.	Prom.	Min.	Máx.	Prom.	Min.	Máx.	Prom.	Min.	Máx.	Prom.
Proteína cruda	39,0	48,0	43,5	31,1	49,0	40,1	45,2	56,1	51,8	34,8	41,9	38,3
Materia seca	95,0	98,0	96,5	89,8	96,2	93,0	85,0	92,1	87,9	85,3	92,3	88,8
Ceniza cruda	7,8	8,3	8,0	7,4	8,6	8,0	6,1	9,4	7,1	6,6	9,1	7,8
Grasa cruda	0,5	2,5	1,5	0,4	0,6	0,5	0,6	4,4	2,0	0,6	5,4	2,7

A partir del mismo estudio de Czech *et al.* (2016) ^[29] mencionado, se obtiene la composición mineral promedio en base seca de *Y. lipolytica* comparada con los valores presentes en *S. cerevisiae*, los que se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: composición mineral promedio en base seca de *Y. lipolytica* A-101 en glicerol comparada con *S. cerevisiae*

Mineral	<i>Y. lipolytica</i> [czech]	<i>S. cerevisiae</i> [CZECH]
Sodio [g/kg]	16,11	8,40
Potasio [g/kg]	22,12	17,34
Azufre [g/kg]	4,87	3,70
Calcio [g/kg]	4,26	2,24
Fósforo [g/kg]	4,34	10,02
Magnesio [g/kg]	1,93	1,48
Manganeso [mg/kg]	15,12	3,84
Zinc [mg/kg]	70,47	60,93
Hierro [mg/kg]	109,94	101,07

En la Tabla 4, se presenta la composición aminoacídica en [mg/g] de proteína de tres artículos diferentes. El primero corresponde al estudio ya mencionado de Czech *et al.* (2016) ^[29] utilizando glicerol, un subproducto de la producción de biocombustible de canola, como sustrato. El segundo corresponde al estudio realizado por Juszczuk *et al.* (2013) ^[33] sobre crecimiento de biomasa de *Y. lipolytica* utilizando glicerol puro como sustrato y el tercero corresponde al estudio de Jach *et al.* (2017) ^[34] sobre la producción de SCP utilizando residuos de biocombustible como sustrato. Además, se comparan dichos valores con el perfil aminoacídico del hongo *Candida utilis* y las recomendaciones nutricionales de la FAO ^[35] (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) para alimentación humana. Dicha comparación tiene como objetivo poseer un marco de referencia nutricional y demostrar que *Y. lipolytica* sobrepasa inclusive el valor recomendado para humanos en algunos aminoácidos como la lisina y la fenilalanina, aun cuando el foco del presente informe es el uso de proteína en alimentación animal.

Tabla 4: Composición aminoacídica de *Yarrowia lipolytica* comparada con *Candida utilis* y recomendaciones de la FAO. **indica aminoácidos esenciales (Fuente: Czech *et al.* 2016, Juszczuk *et al.* 2013, Jach *et al.* 2017)

Aminoácido	<i>Y. lipolytica</i> A-101 en glicerol ^[29] [mg/g proteína]	<i>Y. lipolytica</i> S6 en glicerol crudo ^[33] [mg/g proteína]	<i>Y. lipolytica</i> A-101 en residuos de biocombustible ^[34] [mg/g proteína]	<i>Candida utilis</i> ^[35] [mg/g proteína]	FAO ^[35] [mg/g proteína]
Asp	82,3	-	88	66,5	-
Ser	41,8	-	44	36	-
Glu	139,5	-	120	90,5	-
Gly	45,1	-	46	28	-
His**	22,0	-	26	16	-
Arg	41,6	-	48	38	-
Thr**	46,2	39,3	48	34	40
Ala	83,5	-	80	46	-
Pro	39,4	-	42	-	-
Cys	10,1	17,3	11	24	20
Tyr	34,4	78,2	110	26	-
Val**	54,9	38,8	53	40,5	42
Met**	16,6	17,3	12	15,5	22
Lys**	75,5	56,1	70	76	42
Ile**	45,7	29,2	44	32	42
Leu**	71,3	50,3	68	44	48
Phe**	35,5	78,2	40	30	28
Trp**	15,0	5,8	47	-	-

Finalmente, a partir de un estudio realizado por Karin Athenstaedt *et al.* ^[36], se obtuvo la composición lipídica de la cepa salvaje de *Y. lipolytica* W29 creciendo en medio YPD (del inglés *yeast peptone dextrose*, conteniendo 2% de glucosa, 1% de extracto de levadura, 2% peptona y 100 mM de buffer fosfato) y en medio mínimo de ácido oleico (conteniendo 0,67% de base nitrogenada de levadura (sin aminoácidos), 0,5% NH₄Cl, 0,1% de extracto de levadura, 0,5% de ácido oleico y 50 mM de buffer fosfato). Los resultados se muestran en la Tabla 5:

Tabla 5: Composición lipídica de *Yarrowia lipolytica* W29 en medio YPD. (Fuente: Athenstaedt et al. 2006)

Ácido graso	Condición de crecimiento	
	YPD	ácido oleico
	% del total de ácidos grasos	
C 16:0 (ácido palmítico)	22,1	4,1
C 16:1 (ácido palmitoleico)	7,6	8,2
C18:0 (ácido esteárico)	4,7	0,9
C 18:1 (ácido oleico)	52,5	77
C 18:2 (ácido linoleico)	11,5	6,6
Otros	1,7	3,2

En síntesis, los estudios comparativos realizados por Czech *et al.*^[29] revelaron que la composición química y nutricional de *Saccharomyces cerevisiae* (levadura forrajera más común) no es superior comparado con *Yarrowia lipolytica*. Se mostró que el contenido de grasa cruda en *Y. lipolytica* es tres veces el contenido en *S. cerevisiae*, mientras que *Y. lipolytica* posee un 30% más de lisina y triptófano, junto con un 50% más de alanina que *S. cerevisiae*. Además, *Y. lipolytica* posee mayor contenido de calcio, manganeso, vitamina B2 y B12 y un menor contenido de fósforo, vitamina E y B1 comparada con *S. cerevisiae*^[32].

2.1.4 *Yarrowia lipolytica* como proteína unicelular (SCP)

Tomando en cuenta la variedad de nutrientes presentes en la levadura *Y. lipolytica* mencionados en la sección anterior, la presencia de aminoácidos esenciales como la lisina y la metionina que se encuentran solo en cantidades limitadas en la mayoría de las plantas y alimentos de origen animal y la definición de la levadura como segura y no patógena para los seres humanos, es que se considera su uso como fuente nutricional de proteína (*Single Cell Protein*) una vez que se procesa a las células por medio de una fase de secado^[25].

2.1.4.1 Condiciones óptimas de crecimiento y sustratos

Y. lipolytica es conocida por su habilidad de crecer en variedad de sustratos, los que pueden ser convencionales (como el almidón, melazas, fruta y desechos vegetales) o no convencionales (como fracciones de petróleo, gas natural, etanol, metanol, residuos de grasa animal, entre otros^[25]). Debido a esto existen variedad de artículos en los que se ha estudiado la capacidad de generar proteína unicelular a partir de *Y. lipolytica* en diferentes sustratos. A continuación, en la Tabla 6 se expone una compilación de artículos con el respectivo sustrato utilizado para la producción de SCP, las condiciones de operación definidas en el artículo (se marcan en rojo las condiciones de operación que fueron catalogadas como óptimas) y el contenido de proteína en biomasa seca reportado.

Tabla 6: Sustratos, condiciones de crecimiento (en rojo las condiciones óptimas definidas en cada estudio correspondiente) y contenido de proteína reportado para la producción de SCP

Cepa <i>Yarrowia</i>	Sustrato	Componentes del sustrato	pH utilizado	T° utilizada	Contenido de proteína en biomasa seca [%]	Referencia
<i>Yarrowia lipolytica</i> ACA-DC 50109	Sebo	Estearina	6,0	28	-	[37]
<i>Yarrowia lipolytica</i> A-101	Residuos de biocombustibles	Mix de aceites vegetales, desgomado y fracciones de glicerol	5,0	30	41,9-49,3	[25],[34]
<i>Yarrowia lipolytica</i> NRRL YB-423	Glicerol crudo, extracto de levadura, peptona, hidrógeno fosfato de diamonio	Glicerol crudo, extracto de levadura, peptona, hidrógeno fosfato de diamonio	4,5	30	20,1	[38]
<i>Yarrowia lipolytica</i> S6	Glicerol crudo	78% glicerol e impurezas	3,5	30	43	[33]
<i>Yarrowia lipolytica</i> Y-1711	Basado en melaza de caña	Basado en melaza de caña	5,2-5,5	33	-	[39]
[recombinante] <i>Y. lipolytica</i> YLY5 SUC2 gene	Melaza de caña de azúcar	48,9% contenido de azúcar	6	28	45-54	[40]
[recombinante] <i>Y. lipolytica</i> SWJ-1b INU1 gene (inulasa)	Tubérculo de alcachofa (más harina de soja como fuente de N)	Inulina	6	28	53,7	[22]
[recombinante] <i>Y. lipolytica</i> SWJ-1b uracil mutant (22a-2)	Medio YPD	Glucosa, extracto de levadura, polipeptona y agua de mar	-	28	48,9	[41]
[recombinante] <i>Y. lipolytica</i> SWJ-1b uracil mutant (22a-2)	Hidrolizado de harina de soja	45,6% proteína, pectinas y azúcares libres	-	28	46,1	[41]

A pesar de la variedad de sustratos reportados para la producción de SCP a partir de *Y. lipolytica*, no se ha reportado su crecimiento en sustratos ricos en alginato. Sin embargo, se conocen algunos genes de asimilación de la vía metabólica del DEH (ácido 4-deoxi-1-eritro-5-hexoseulosa urónico, monómero del alginato) como son DehR (DEH reductasa), KdgK (KDG quinasa) y KdgpA^[42], los que fueron rastreados para el presente proyecto en la ruta metabólica de la levadura, sin encontrar coincidencias. A pesar de esto, no se descarta la capacidad de metabolización de monómeros de alginato por medio de alguna vía menos conocida o a través de la ruta de otro sustrato que permita aprovechar las virtudes presentes en la levadura *Y. lipolytica* para la producción de proteína desde

sustrato algal y permita abrir la búsqueda en microorganismos que aprovechen dicho sustrato (como los ya mencionados *T. reesei* y *P. salina*).

2.1.4.2 Vía competitiva lipogénesis/síntesis de proteínas y fuente de nitrógeno.

Y. lipolytica posee la habilidad de acumular lípidos de almacenamiento que permitan el crecimiento de la levadura incluso en ausencia de una fuente de carbono extracelular. Por tanto, las células pueden utilizar los lípidos de almacenamiento para diversas actividades metabólicas, incluida la producción de energía de mantención. Cabe destacar que la biosíntesis de proteínas o polisacáridos celulares en *Y. lipolytica* compite con la acumulación de lípidos, en esta línea, se observó una degradación de lípidos significativa que coincidió con la producción de biomasa libre de grasa y un aumento del contenido de proteínas. Además, la capacidad lipogénica de la levadura depende también de la disponibilidad de nitrógeno en el medio de cultivo. Así, la falta de nitrógeno conduce a una rápida reducción del AMP intracelular que causa la inhibición del isocitrato deshidrogenasa activado. Dicha inhibición es decisiva en la señalización del primer paso de la lipogénesis [25].

Por otro lado, se ha reportado que, para producir grandes niveles de proteína, la célula debe crecer en un medio rico en fuentes de nitrógeno [41]. Por esta razón, se realiza un estudio del efecto de las diferentes fuentes de nitrógeno en el crecimiento, la acumulación de proteínas y la producción de SCP por *Y. lipolytica*, como se muestra en la Figura 4 con representaciones en blanco, gris y negro respectivamente [22].

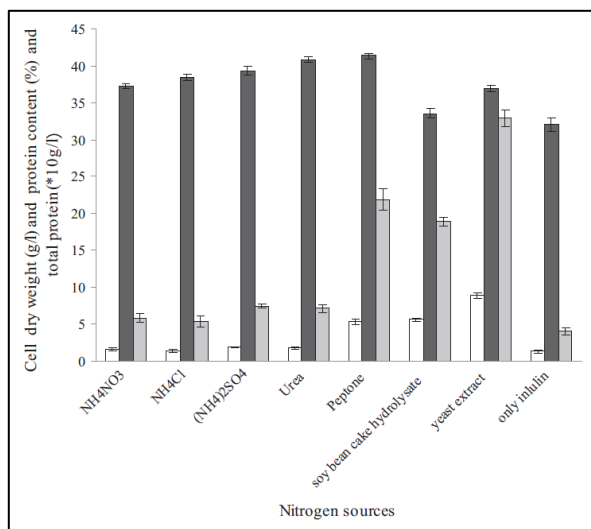


Figura 4: Efecto de las diferentes fuentes de nitrógeno en el crecimiento celular (blanco), la producción de SCP (negro) y el total de proteína (gris). La concentración de las diferentes fuentes de nitrógeno fue de 0,5% (p/v). (Fuente: Cui et al. 2011)

A partir del estudio se obtiene que tanto fuentes orgánicas como inorgánicas de nitrógeno pueden utilizarse para el cultivo de levadura con influencia variada en la acumulación de proteínas. Dentro de las fuentes inorgánicas destaca el sulfato de amonio, mientras que en las fuentes orgánicas destaca la peptona como el sustrato más adecuado. Además, se destaca la harina de soja como fuente de nitrógeno a bajo costo y fácil de obtener, rica en aminoácidos y otros nutrientes [22].

2.1.4.3 Ventajas adicionales de la proteína unicelular de *Y. lipolytica*

El alto contenido de ácidos nucleicos (ADN y ARN) presentes en SCP debe ser removido o reducido desde un 7% a un 1% que sería considerado aceptable. Esto debido a que el consumo de

biomasa proteica con alta concentración de ácidos nucleicos (entre un 6% y un 10%) eleva los niveles de ácido úrico en la sangre, induciendo trastornos de salud como gota y cálculos renales. Sin embargo, se ha reportado a escala de laboratorio y escala piloto que la alta concentración de ácidos nucleicos presentes en *Y. lipolytica* en las primeras fases de crecimiento (6,4%) se ve reducida drásticamente (bajo el 1%) al final de la fase estacionaria (que corresponde a la fase en donde se iguala la tasa de crecimiento y la tasa de muerte debido al agotamiento de nutrientes y se observa una cantidad de biomasa constante) debido a la activación de nucleasas endógenas, como se observa en la Figura 5 ^[34].

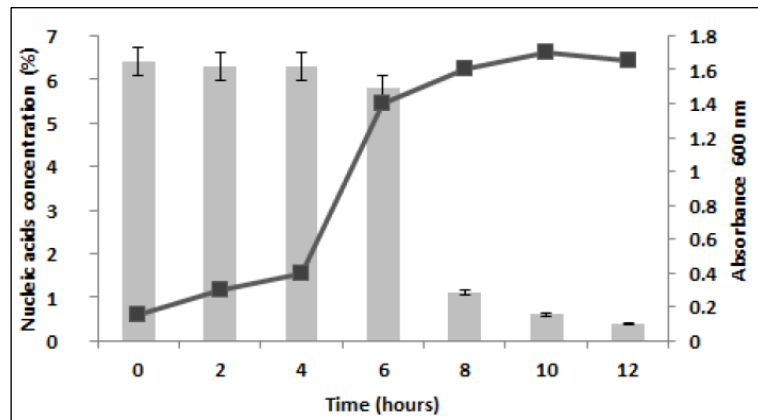


Figura 5: concentración de ácidos nucleicos durante las fases de crecimiento de *Y. lipolytica* A-101 en medio SK (mix de aceites vegetales, desgomado y fracciones de glicerol). Se observa una reducción bajo el 1% al final de la fase estacionaria (hora 10) ^[34]

2.1.5 Parámetros cinéticos de *Y. lipolytica*

Para diseñar un fermentador es necesario conocer los parámetros cinéticos de la levadura en el medio en el que se cultivará. Por esto, se realiza una búsqueda bibliográfica sobre los parámetros de *Y. lipolytica* en glucosa y de otros hongos en sustrato algal. Estos valores se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7: Parámetros cinéticos de la levadura *Y. lipolytica* (en diferentes sustratos) y otros hongos en medio con alginato

Cepa <i>Yarrowia</i>	Sustrato	Fuente de carbono	Escala	Rendimiento ($Y_{X/S0}$)	Tasa de crecimiento específico (μ_{max}) [h^{-1}]	Referencia
<i>Y. lipolytica</i> NBRC 1658	Glucosa, NH_4Cl , KH_2PO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, extracto de levadura, $CaCO_2$	Glucosa	Matraz 100 [mL]	0,23 [g/g]	0,035	[43]
<i>Yarrowia lipolytica</i> IBT446	Glucosa	Glucosa	Biorreactor batch 1[L]	0,69 [cmol/cmol]	0,24	[44]
<i>Yarrowia lipolytica</i> IBT446	Glicerol	Glicerol	Biorreactor batch 1[L]	0,61 [cmol/cmol]	0,3	[44]
<i>Yarrowia lipolytica</i> IBT446	Mixto	Glucosa y glicerol	Biorreactor batch 1[L]	0,76 [cmol/cmol]	0,38	[44]
<i>Yarrowia lipolytica</i> W29	Glucosa	Glucosa	Reactor fedbatch	0,6 [g/g]	0,26 (exp) 0,415 (modelo)	[45]
[recombinante] cepa celulolítica de <i>Y. lipolytica</i> JMY1212 con actividad β -d-xilosidasa (TrXYNI, TrLPMOA y TrSWO)	Celulosa amorfa	Celulosa amorfa	Matraz	0,4 [g/g]	-	[46]
[recombinante] cepa celulolítica de <i>Y. lipolytica</i> JMY1212 con actividad β -d-xilosidasa	paja de trigo	Celulosa amorfa y cristalina	Matraz	0,1 [g/g]	-	[46]
<i>Yarrowia lipolytica</i> S6	Glicerol puro	Glicerol puro	Reactor batch	0,47 [g/g]	-	[33]
<i>Yarrowia lipolytica</i> S6	Glicerol crudo	78% glicerol e impurezas	Reactor batch	0,52 [g/g]	-	[33]
[recombinante] <i>Yarrowia lipolytica</i> URA-strain con actividad alginato liasa	Alga parda <i>laminaria japonica</i> hidrolizada con Celluclast	Glucosa y manitol	Eppendorf	0,65 [g/g]	-	[47]
Otros hongos						
<i>Candida utilis</i>	<i>M. pyrifer</i>	Alginato y manitol	Matraz	0,430 [g/g]	-	[48]
<i>Paradendriphiella salina</i>	<i>M. pyrifer</i>	Alginato y manitol	Matraz	0,635 [g/g]	-	[49]

2.2 Macrocystis pyrifera como fuente de carbono

Las macroalgas marinas son un conjunto diverso de plantas acuáticas fotosintéticas que representan un recurso renovable relativamente poco utilizado ^[50].

Las macroalgas son valiosas nutricionalmente ya sea en su forma fresca o seca, como vegetales, ensaladas o ingredientes en una amplia variedad de comidas preparadas. Ciertas algas comestibles contienen cantidades significativas de proteínas, lípidos, minerales y vitaminas. El contenido nutricional de las algas varía con la especie, estado de crecimiento, la ubicación geográfica, la temporada, la humedad y la temperatura ^[51].

Las algas marinas son una fuente importante de carbono orgánico disuelto en las aguas costeras. Carbohidratos, polisacáridos, materia nitrogenada y polifenólica representan el carbono orgánico ^[51].

A continuación, se caracterizará a la macroalga parda *Macrocystis pyrifera*, que será utilizada como fuente de carbono para el crecimiento de *Y. lipolytica* en el presente trabajo.

2.2.1 *Caracterización M. pyrifera (Huiro)*

El huiro flotador, canutillo o huiro es una macroalga perteneciente al grupo de las algas pardas (laminariales) del género *Macrocystis*. Tiene una amplia distribución mundial, creciendo cercana a las costas de Chile y Norte América; en Chile, las praderas tienen una distribución en parches desde Arica hasta el Cabo de Hornos. Sin embargo, la mayor biomasa se ubica desde Puerto Montt al sur. Es el alga más grande en la tierra pudiendo alcanzar longitudes de hasta 60 [m] y es uno de los organismos de más rápido crecimiento. Bajo el agua, crece verticalmente con frondas, adhiriéndose al sustrato por medio de un disco basal adhesivo y formando canopias en la superficie del mar ^{[52] [53][48]}. En la Figura 6 se muestran las frondas de una población de *M. pyrifera*.



Figura 6: Frondas de una población de *Macrocystis pyrifera* (Fuente: subpesca ^[52])

En cuanto a su composición, los carbohidratos principales encontrados en algas pardas son el alginato, la celulosa, laminarina, fucoidano y manitol ^[48]. En particular, la caracterización de sacáridos de *M. pyrifera* indica que su componente principal es el alginato, seguido por el manitol

y la fucosa con concentraciones de 62,54%, 8,05% y 6,34 % respectivamente [54]. En la Figura 7b se ilustra la composición de carbohidratos completa del alga.

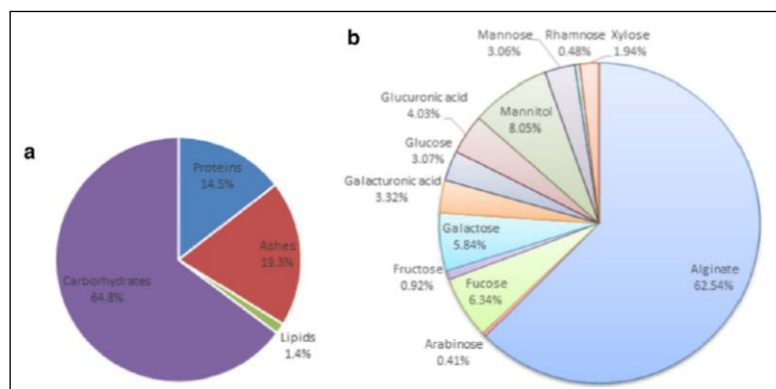


Figura 7: a) Análisis proximal de la macroalga *M. pyrifera* y b) Caracterización de carbohidratos del alga [54]

Por otro lado, según un análisis proximal se obtiene las concentraciones de carbohidratos, proteínas, cenizas y lípidos del alga correspondientes a 64,8%, 14,5%, 19,3% y 1,4% respectivamente (en base a la biomasa seca) como muestra la Figura 7a. Además, se ha calculado un contenido de agua promedio de un 85% [55].

2.2.2 Producción de *M. pyrifera*

En el caso de las macroalgas pardas, como *M. pyrifera*, las primeras tecnologías de cultivo ya han sido desarrolladas. Esta especie muestra ventaja sobre otras algas en términos de productividad, rendimiento, distribución geográfica y fácil reproducción y cultivo. Por medio de dos ciclos de producción anuales y posicionando líneas de cultivo de algas a 4 [m] de distancia, el cultivo es factible y se pueden obtener producciones cercanas a los 41,3 [kg] de alga húmeda por metro lineal por año. Sin embargo, es posible duplicar la densidad de cultivo por línea obteniendo una producción que puede alcanzar potencialmente las 200 toneladas de alga fresca por hectárea al año [56].

2.2.3 Alginato en *M. pyrifera*

El alginato o ácido alginico es un copolímero lineal de α -L-guluronato y su epímero β -D-manuronato, que se pueden presentar en arreglos de bloques de la forma GG, MM o MG. Es preferible el uso de enzimas para la sacarificación de estos polisacáridos, debido a que la hidrólisis enzimática puede realizarse bajo condiciones suaves, evitando la producción de subproductos indeseados y reduciendo la posible contaminación ambiental [53].

La biodegradación del alginato considera el uso de alginato liasas que producen oligómeros de ácido urónico. Dichos oligómeros son posteriormente escindidos por oligoalginato liasas para la producción de monosacáridos fermentables (uronato insaturado). Dichas enzimas han sido aisladas a partir de variadas fuentes, incluyendo algas marinas, moluscos marinos, bacterias, bacteriófagos, hongos marinos y virus [53].

2.2.4 Sacarificación del alginato presente en *M. pyrifera* a escala piloto

Existen variedad de artículos que han desarrollado metodologías de liberación de azúcares fermentables desde algas pardas. Dicha información es necesaria para diseñar un proceso que permita utilizar el recurso algal en diferentes áreas asociados a la fermentación de los azúcares. El

presente trabajo se basará en la información de la sacarificación de azúcares de *M. pyrifera* desarrollada en el artículo de Camus *et al.* (2016) ^[56].

En el artículo “*Scaling up bioethanol production from the farmed brown macroalga *Macrocystis pyrifera* in Chile*” desarrollan una tecnología de transformación rentable para procesar grandes cantidades de macroalga fresca a escala piloto de 75 [L].

Previo a la fermentación, se deben desarrollar tres pretratamientos: lixiviación ácida para remover grandes cantidades de cloruro de potasio y liberar manitol, depolimerización para digerir enzimáticamente el alginato y sacarificación para degradar oligoalginatos en DEHU, que es el monómero del alginato. El proceso comienza con 100 [kg] de *M. pyrifera* recolectada en Calbuco, y transportada inmediatamente para evitar su descomposición. Posteriormente es lavada con agua potable y se remueven organismos de manera manual para proceder a moler el tejido a fracciones de menos de media pulgada (en un molidor de martillo hecho a medida). Una vez obtenido comienza la lixiviación ácida.

Para la lixiviación se mezclan 100 [kg] de alga molida con 200 [L] de HCl al 0,3%, los que se mezclan en un reactor agitado a 25°C, a 200 rpm por una hora. Completado el tiempo el líquido es drenado y se repite el procedimiento dos veces más. El volumen de líquido pasa a una separación por membrana para recuperar el manitol, el que se purifica mediante micro, nano y ultrafiltración y se concentra mediante osmosis inversa. Se reporta que las membranas utilizadas corresponden a GR95PP-101204, UFXpht-522577, NF-517820 y RO98pht-100457 para la microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración y osmosis inversa respectivamente. La solución final es almacenada hasta la fermentación.

Se procede con la depolimerización, donde el alga lixiviada se mezcla con 200 [L] de agua de la llave en un reactor agitado a pH 5,5 ajustado con KOH. Se agregan 160 [mL] de Htec2 y 16 [mL] de Ctec2 de Novozymes y se agita a 200 rpm y 50°C por 20 horas. Luego de ese periodo la mezcla se enfría a 25°C y el pH se ajusta a 5,5 para agregar 800 [mL] de M9 buffer 10x que contiene 7,5 mg/mL de alginato liasas, se agita nuevamente a 200 rpm por 20 horas. Finalmente, el alga depolimerizada fue centrifugada por 10 min. para eliminar el líquido a 5500 rpm y 4°C.

Por último, se toman 34 [L] del líquido depolimerizado obtenido y se transfieren a un fermentador previamente esterilizado de 75 [L]. Se configura la temperatura a 25°C y la agitación a 500 rpm para proceder a agregar 510 [mL] de crudo de oligo alginato liasa y operar por 20 horas.

Los resultados reportados en el artículo indican que, en la etapa de lixiviación, se produjeron 380 [L] de lixiviado y 48 [kg] de alga lixiviada (rendimiento de un 48% peso en relación con el alga fresca utilizada). Se obtuvo líquido con un 0,63% de manitol, el que fue concentrado a 1,67% en la separación por membrana. Por otro lado, en la etapa de depolimerización, luego de la centrifugación se obtienen 210 [L] de solución con 2,6 [g/L] de glucosa (tanto el manitol como el DEHU no fueron detectados). Además, se obtuvieron 2,5 [kg] de alga depolimerizada que contienen 35,77% de proteína, 27,55% de carbohidrato, 9,85% de fibra cruda, un 6,51% de humedad y 13,55% de cenizas, junto con 3,17 [kcal/g]. Finalmente, se reporta que se produjeron 34,5 [L] de líquido sacarificado conteniendo 1,54 [g/L] de glucosa y 22,3 [g/L] de DEHU.

2.2.5 Caracterización de contaminantes y organismos presentes en las frondas de *M. pyrifera*

Existen estudios, como el del Dr. Andrés Mansilla titulado “*Bases biológicas para el manejo de macroalgas pardas en la XII región*”, en donde realizan análisis para determinar la fenología morfológica y reproductiva de *M. pyrifera* en praderas ubicadas en el sector norte, centro y sur de

la XII región. Para lograrlo, realizan una evaluación de los organismos presentes en frondas y discos de dicha macroalga ^[57].

La metodología descrita en el estudio indica que se recolectan individuos de macroalga durante las 4 estaciones del año en distintos sectores de la región. A cada individuo se le realiza un muestreo dividiendo cada fronda en tres segmentos: basal, medio y apical. Además, indican que cada trozo estudiado tiene una masa de 10 [g]. Con estos datos en consideración, presentan tablas como la que se muestra en la Tabla 8, en donde informan el mínimo, promedio y máximo de organismos encontrados en N trozos de alga, según la sección de la fronda y estación del año desde la que se recolectó ^[57].

Tabla 8: Cantidad de organismos encontrados en N trozos de 10 [g] c/u de *M. pyrifera*, según el mes del año y sección de la fronda desde el que se recolectó ^[57]

CARLOS III					
		INVIERNO	PRIMAVERA	VERANO	OTOÑO
	N		10	10	10
	APICAL		2 (16) 52	8 (20) 28	9 (105) 274
FRONDAS	MEDIO		6 (51) 143	7 (31) 60	17 (243) 704
	BASAL		29 (84) 367	6 (53) 197	16 (91) 270

Por ejemplo, en otoño se encontró un promedio de 243 organismos en la zona media de las frondas por cada 10 trozos de 10 [g] cada uno. Además, entregan información sobre el porcentaje de cada tipo de organismo presente en el total organismos encontrados (ver Figura 8).

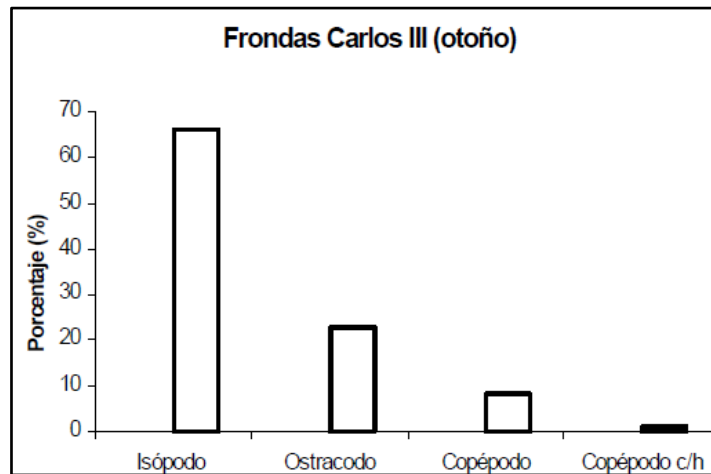


Figura 8: Porcentaje de isópodos, ostrácodos y copépodos encontrados en el total de organismos presentes en el mes de otoño, en secciones de *M. pyrifera* de la isla Carlos III ^[57]

Con esta información, se realiza una caracterización de la cantidad de masa de organismos en las frondas de *M. pyrifera*, asumiendo los datos promedio de organismos del mes de otoño y de la zona media de las frondas para cuatro praderas de la XII región [ver Anexo 2 sobre la caracterización de los organismos en *M. pyrifera*].

3. Metodología

3.1 Metodología general

Para el diseño conceptual de una planta de producción de proteína unicelular, es necesario realizar el estudio técnico de prefactibilidad de la planta que permita obtener las operaciones unitarias del proceso, los flujos a trabajar, el tamaño de los equipos, la potencia requerida para realizar el trabajo y las corrientes de servicio que permitan el correcto funcionamiento de la planta. Es por esto que se definen las siguientes etapas metodológicas (ilustradas en la Figura 9) para obtener su diseño conceptual:

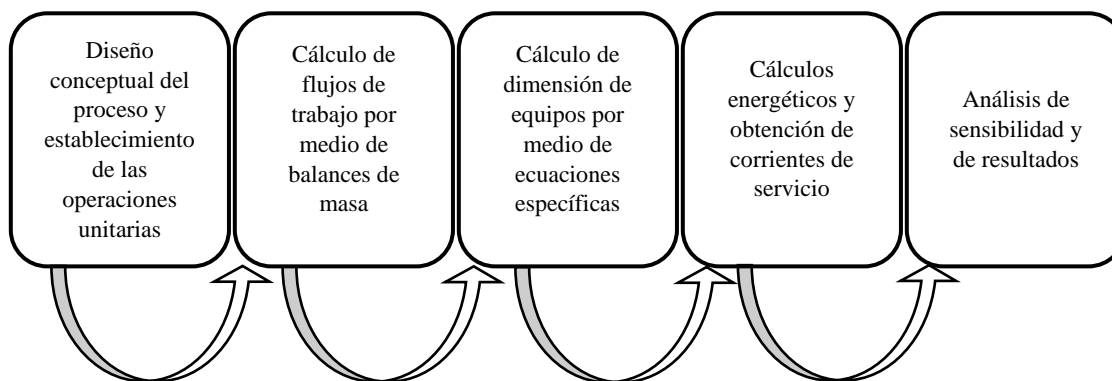


Figura 9: Resumen etapas metodológicas generales

a) Diseño del proceso

La producción de proteína unicelular a partir de *Yarrowia lipolytica* depende directamente de que la levadura sea capaz de asimilar los azúcares complejos provenientes del alga parda *Macrocystis pyrifera* cuya fuente de carbono es el alginato y el manitol. Para lograrlo, es necesario realizar una búsqueda bibliográfica que permita definir las operaciones unitarias con sus respectivas condiciones de operación. Dicha búsqueda, se realiza dividiendo el proceso en las etapas que se ilustran en la Figura 10.

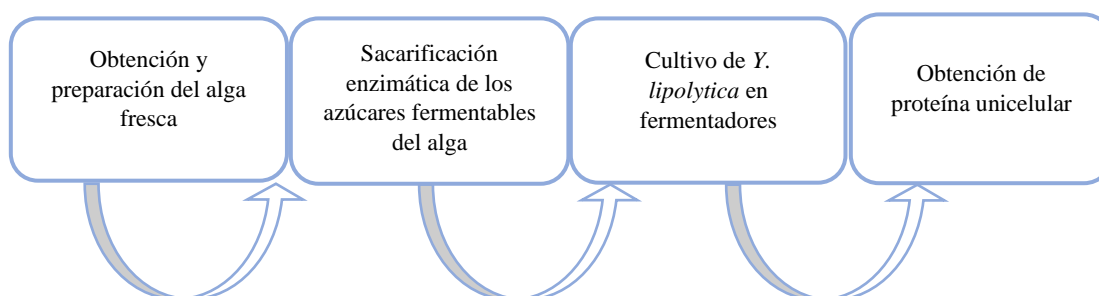


Figura 10: Etapas a estudiar para la confección del diseño del proceso

Una vez definido el proceso, se procede a la realización del diagrama de bloques utilizando la herramienta de diagramación *Lucidchart*.

b) Cálculo de flujos de trabajo

En esta etapa se define el caso base de producción y el límite de batería del proceso para proceder al cálculo de los flujos de trabajo de cada operación unitaria definida en la etapa anterior. Dicha información se sustenta en una búsqueda bibliográfica que permita definir proporcionalidades y

concentraciones de reactivos en cada operación. Se obtiene así el balance de masa global del proceso utilizando el software *Excel*.

c) Cálculo de dimensión de equipos

Aquí se definen los equipos que llevarán a cabo cada una de las operaciones unitarias y se obtienen sus dimensiones mediante ecuaciones específicas para cada equipo. Se logra obtener el flowsheet de la planta que ilustra los flujos y equipos seleccionados utilizando el software *Lucidchart*. Además, se obtiene la diagramación tentativa de la planta con el tamaño de los equipos seleccionados mediante la confección del *Layout* con el software *AutoCAD*.

d) Cálculos energéticos, equipos auxiliares y corrientes de servicio

En esta sección, se define la energía requerida para mantener las condiciones de operación deseadas en cada equipo mediante el cálculo de los balances de energía en cada uno de ellos. Una vez obtenidos los valores, se calculan los flujos y equipos auxiliares necesarios para mantener la estabilidad del proceso.

e) Análisis de sensibilidad y análisis de resultados

Finalmente, se realiza el análisis de los resultados obtenidos considerando los supuestos aplicados en su desarrollo y se efectúa el análisis de sensibilidad sobre los parámetros seleccionados para la fermentación. Dicho análisis de sensibilidad, realizado mediante el software *Excel*, permitirá conocer cuanto varía la productividad de proteína unicelular al variar parámetros de la fermentación que fueron estimados dada la falta de información bibliográfica.

3.2 Materiales

Los materiales utilizados para la realización de las etapas metodológicas definidas son los siguientes:

- Licencia universitaria Microsoft Office 365 ProPlus (incluye software *Excel* y *Word*).
- Licencia individual software de diagramación *Lucidchart*.
- Licencia universitaria Software *AutoCAD* 2018.

4. Resultados

4.1 Proceso productivo

4.1.1 *Límite de batería*

Se definen los alcances del presente estudio, dada la complejidad del análisis completo de un proceso de producción. Por tanto, se considera que la planta productiva abarca desde la recepción del alga fresca recién cosechada desde granjas productivas ubicadas en Puerto Montt, pasando por un posterior pretratamiento y uso como sustrato, hasta la obtención de células secas de *Y. lipolytica* para su uso como proteína unicelular. No se considerará en el análisis el tratamiento de RILes y RISEs que serán enviados a plantas externas ni el almacenamiento y posible destinación de los subproductos obtenidos en el proceso.

4.1.2 *Descripción del proceso*

El diseño del proceso de producción se realiza considerando tres líneas. La primera consiste en la preparación y sacarificación del alga para obtener azúcares fermentables asimilables por la levadura. La segunda consiste en el cultivo de la levadura en el sustrato obtenido para la producción de grandes volúmenes de biomasa rica en proteínas. Finalmente, la tercera línea consiste en el tratamiento de la biomasa obtenida para su posterior uso como proteína unicelular segura para consumo animal.

A continuación, se describe cada una de las etapas definidas para cada línea de producción:

4.1.2.1 *Línea de pretratamiento*

Las operaciones unitarias y condiciones de operación definidas en esta línea de producción siguen los lineamientos de pretratamiento de *M. pyrifera* para su uso en la producción de bioetanol, presentados en el artículo de Camus *et al.* (2016) ^[56]:

Se comienza con el **lavado** del alga, cuyo objetivo es remover con agua potable el exceso de agua de mar, piedras, conchas y organismos adheridos a sus frondas. A continuación, se realiza una **molienda** con el fin de disminuir el tamaño del alga a fracciones de dimensión inferior a media pulgada, para favorecer la manipulación y el área de trabajo. Luego, se realiza una **lixiviación ácida** con el uso de HCl para remover grandes cantidades de KCl y liberar uno de los azúcares de fermentación: el manitol. Dicha etapa tiene una duración de una hora y se repite 3 veces a 25°C en un reactor agitado. Posteriormente, se realiza una **separación por membrana** con el líquido obtenido desde la lixiviación, considerando micro, nano y ultrafiltración para eliminar contaminantes y una osmosis inversa para concentrar el manitol en el líquido. Por otro lado, el alga lixiviada obtenida en la lixiviación ingresa a una etapa de **depolimerización** por 20 horas a 25°C y luego 20 horas a 50°C, ambas a pH 5,5 que permitirá digerir enzimáticamente el alginato con el uso de alginato liasas (AL) y celulasas comerciales (CTec2, HTec2) para obtener oligoalginatos. Desde dicho proceso se obtiene como subproducto el alga depolimerizada con la composición mencionada en el apartado 2.2.4 y se recupera el líquido depolimerizado para proceder a la **sacarificación**. Esta última etapa tiene una duración de 20 horas, a 25°C y pH 7,5 y su objetivo es degradar oligo alginatos a su monómero con ayuda de oligo alginato liasas (OAL), para obtener líquido sacarificado rico en DEHU que será utilizado como el principal medio de cultivo del alga.

4.1.2.2 Línea de cultivo

Las operaciones consideradas para esta línea de producción siguen los lineamientos de Zhao *et al.* (2013)^[41], Cui *et al.* (2011)^[22], Jach *et al.* (2019)^[34], Juszczak *et al.* (2013)^[33] y Yan *et al.* (2018)^[40] sobre producción de SCP con *Y. lipolytica*, el artículo de Li *et al.* (2019)^[47] sobre el crecimiento de *Y. lipolytica* en manitol y glucosa de alga parda y el artículo de Takagi *et al.* (2017)^[42] sobre cultivo de adaptación de *S. cerevisiae* modificada en alginato.

En primer lugar, se considera integrar un **cultivo de adaptación** en DEHU que permita al microorganismo adaptarse al nuevo sustrato en baja presencia de glucosa y mejorar su asimilación^[42], utilizando una fracción del líquido sacarificado obtenido en la línea anterior. Se define un tiempo de 5 horas que permita la adaptación al sustrato, pero no el crecimiento del microorganismo. Posteriormente, se **cultiva el inóculo** de *Y. lipolytica* en medio YPD hasta obtener un DO 600 igual a 5 (como el utilizado en el inóculo del artículo de Li (2019)^[47]) a pH 5,0 y 30°C^[34]. Finalmente, se utiliza todo el concentrado de manitol y el líquido sacarificado restante, junto con un 5 [%p/v] de sulfato de amonio como fuente de nitrógeno^[22] y una oxigenación de 1[vvm]^[33] para realizar la **fermentación** definitiva a un pH 5,0 y 30°C (considerado óptimo para la producción de SCP [ver Tabla 6]). El tiempo máximo al que se puede operar esta fermentación se calcula en el apartado del 4.2 sobre balances de masa, mediante ecuaciones de diseño de fermentadores.

4.1.2.3 Línea de obtención proteína unicelular (SCP)

Las operaciones consideradas en esta línea siguen los lineamientos del artículo de Jach *et al.* (2017)^[34] para la obtención de SCP segura para alimentación a partir de *Y. lipolytica*.

En primer lugar, es necesario **centrifugar** el contenido obtenido en la fermentación a 8000xG para recolectar las células de levadura producidas^[34]. Posteriormente, la biomasa obtenida se transfiere a una operación de **secado** a una temperatura de entre 165 °C a 175 °C^[34] para reducir la humedad de las células desde un 80%^[58] a valores entre un 2% y un 8%, relevante en la textura y estabilización del alimento. El proceso de secado a altas temperaturas destruye la pared celular, obteniendo como resultado una mejora en la digestibilidad^[34]. Sin embargo, el tratamiento de calor también podría degradar componentes celulares valiosos para posteriores purificaciones (que no son efectuadas en el proceso planteado)^[59]. El secado es una de métodos más comúnmente utilizados en la conservación de alimentos, ya que permite obtener productos alimenticios con una mayor vida útil^[34].

Dada la capacidad de *Y. lipolytica* para producir sus propias nucleasas endógenas al final de la fase estacionaria de crecimiento y reducir los niveles de ácidos nucleicos a concentraciones bajo el 1% (según los datos obtenidos en todos los lotes de biomasa seca del estudio de Jach *et al.* (2017)^[34]), es que no se considera una etapa de remoción de ácidos nucleicos en el diseño del proceso. El consumo de biomasa proteica con altas concentraciones de ácidos nucleicos es indeseable tomando en cuenta que eleva los niveles de ácido úrico en sangre e induce desórdenes como cálculos renales o gota. Sin embargo, valores inferiores al 1% son aceptables incluso para el consumo humano^[34].

Finalmente, el valor de cenizas promedio de *Y. lipolytica* (8%) es comparable con el valor de otras fuentes de proteína como la harina de soya (7,1%) y la harina de canola (7,8%)^[32]. Además, considerando que el producto final no es calcinado si es un hidrolizado, no existiría riesgo de formación de sales riesgosas para la salud en las cenizas que se deban eliminar. Por dichas razones es que tampoco se considera una operación de remoción de cenizas en el proceso.

A modo de resumen, en la Figura 11 se presenta el diagrama de bloques con cada una de las operaciones unitarias mencionadas y sus respectivas entradas y salidas.

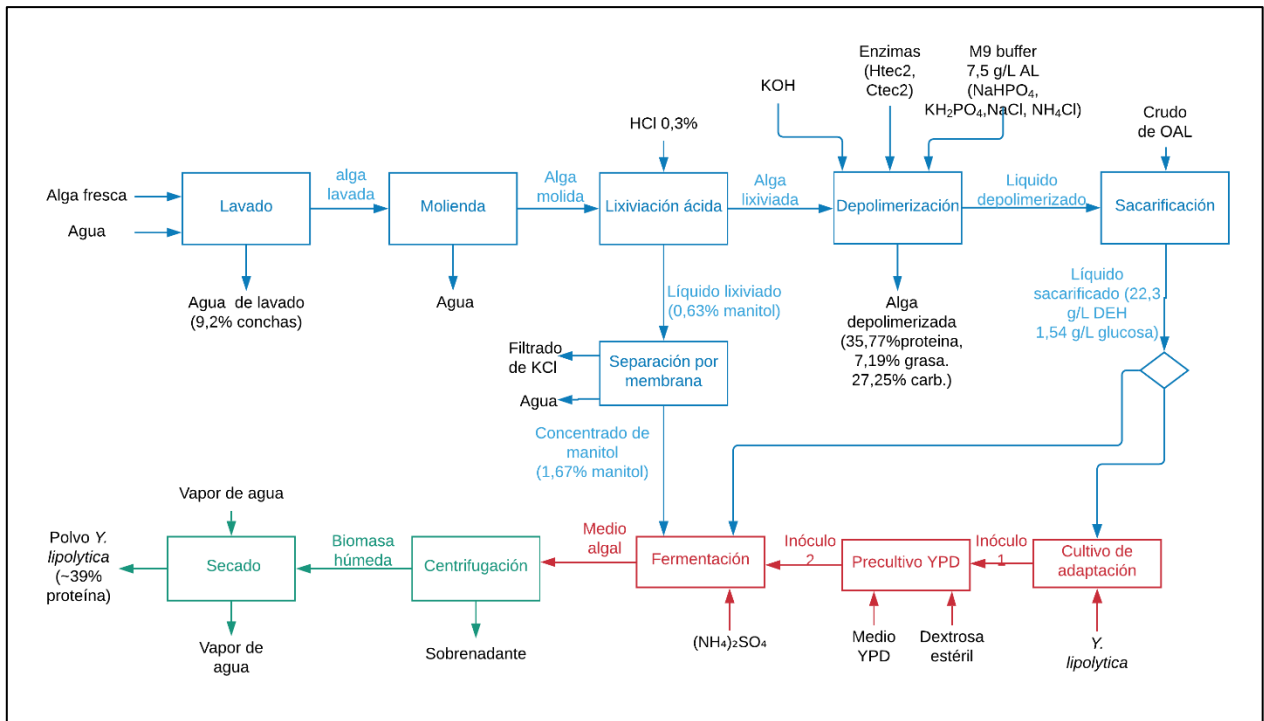


Figura 11: Diagrama de bloques del proceso de producción de SCP de *Y. lipolytica* (en azul la línea de pretratamiento, en rojo la línea de cultivo y en verde la línea de obtención de SCP)

4.1.3 Caso base

Se considera procesar toda el alga fresca producida en una granja piloto de 4 hectáreas ubicada en Puerto Montt con una producción anual de 200 [ton/ha]. Se definen jornadas de trabajo de 24 horas al día, siete días a la semana, con un mes de paro anual por mantenimiento. Además, se estima un plazo de procesamiento de lote con los tiempos de operación de cada etapa del proceso (incluyendo tiempos de limpieza). Así, con un tiempo de lote de tres días resulta posible procesar 111 lotes de ~7200 [kg] c/u [ver Anexo 3 sobre caso base y tiempos de procesamiento].

4.2 Balances de masa

A continuación, se presentan los balances de masa de cada operación con sus respectivos supuestos, resultados e información de cada corriente [para mayor detalle revisar Anexo 4]. Los cálculos expuestos están expresados por lote de producción.

4.2.1 Lavado

En esta etapa ingresa el alga fresca recién cosechada junto con el agua fresca a gran velocidad con el fin de remover la sal y los organismos adheridos a las frondas, obteniendo agua residual y alga lavada. Se estima una duración de 1 [h] para esta operación. En la Figura 12 se presenta el diagrama de flujos:

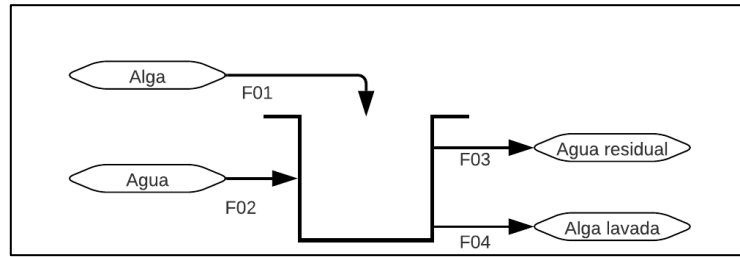


Figura 12: Diagrama de flujos de la etapa de lavado

Los supuestos considerados en el lavado son los siguientes:

- Se asume una razón de alga/agua de 1:1 v/v
- Se considera una densidad experimental del alga fresca de 1,15 [g/ml]
- Se asume el retiro de un 75% de los sólidos adheridos
- Se define un porcentaje de sólidos en el alga del 12,1%, según la caracterización de organismos realizada (Ver Anexo 2)

Una vez aplicados los supuestos se obtienen los flujos presentados en la Tabla 9 (ver cálculo en Anexo 4.1):

Tabla 9: Flujos másicos por corriente en etapa de lavado

Etapa: Lavado				
	Flujo	Nombre	Composición	Cantidad [kg]
Entradas	F1	Alga cosechada	Alga Sólidos en alga	6334,7 872,5
	F2	Agua	Agua	6267,1
Salidas	F3	Agua residual	Agua Sólidos	6267,1 654,4
	F4	Alga lavada	Alga	6552,8

4.2.2 Molienda

Una vez obtenida el alga lavada, esta ingresa a una etapa de molienda con la finalidad de reducir el tamaño del alga a fracciones inferiores a media pulgada ^[56] para favorecer la manipulación y el pretratamiento, obteniéndose alga molida y agua residual. En la Figura 13 se presenta el diagrama de flujos:

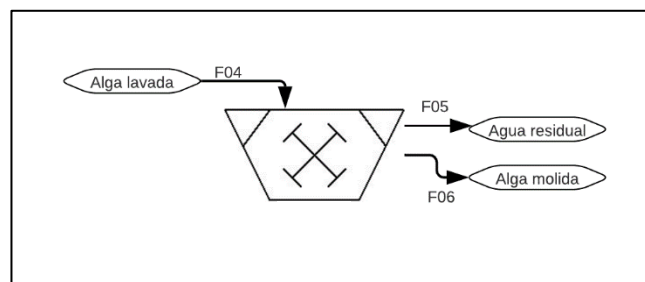


Figura 13: Diagrama de flujos de la etapa de molienda

Cabe destacar que comúnmente, para producir un sustrato homogéneo que pueda ser utilizado en ensayos enzimáticos, la biomasa algal es secada y posteriormente molida. Sin embargo, con el objetivo de mantener los rendimientos obtenidos en el artículo de Camus ^[56], se opta por mantener el diseño del proceso y trabajar con alga húmeda. En relación con esto, se conoce que la T° de secado puede afectar la accesibilidad enzimática del sustrato. Por esta razón se ha estudiado la disponibilidad de azúcares fermentables de alga parda obtenidos a diferentes rangos de temperatura de secado comparados con el secado en frío y el alga húmeda. La teoría indica que la cantidad de puentes de hidrógeno aumenta con el aumento de T° en los procesos de secado, haciendo a la biomasa seca a altas temperaturas menos accesible para la degradación enzimática. Los resultados muestran que la mayor concentración de azúcares liberados se alcanza cuando se trata enzimáticamente alga secada a 30°C, mientras que con el alga húmeda se obtienen concentraciones alrededor de un 15% más bajas (al igual que el secado en frío), lo que se atribuiría al largo de las partículas en la biomasa húmeda ^[60].

Los datos y supuestos considerados en la molienda son los siguientes:

- Contenido promedio de agua en alga es del 85% ^[54]
- Se asume una pérdida de un 1% del agua contenida en el alga

Una vez aplicados los datos y supuestos se obtienen los flujos presentados en la Tabla 10 (ver cálculo en Anexo 4.2):

Tabla 10: Flujos máscicos por corriente en etapa de molienda

Etapa: Molienda				
	Flujo	Nombre	Composición	Cantidad [kg]
Entradas	F4	Alga lavada	Agua	5569,9
			Alga	982,9
Salidas	F5	Agua residual	Agua residual	55,7
	F6	Alga molida	Alga	6497,1

4.2.3 Lixiviación ácida

El alga molida obtenida en la etapa anterior pasa a una etapa de lixiviación ácida con el objetivo de liberar parte del manitol contenido en el alga y eliminar grandes cantidades de cloruro de potasio (KCl). Para esto recibe un tratamiento con HCl al 0,3% y agitación a 55 [rpm]¹ durante una hora, se drena el líquido y se repite esta etapa dos veces más. En la Figura 14 se presenta el diagrama de flujos:

¹ Las velocidades de agitación presentadas en adelante en el documento corresponden al escalamiento de modelos a escala piloto de los reactores usados en Camus ^[56] y el fermentador de 5 [L] presentado en el artículo de Juszczyk (2013) ^[33]. Se utiliza el criterio de mantención de la velocidad tangencial (exceptuando el fermentador 3, cuya velocidad se estimó a partir de su potencia). El cálculo se presenta en el Anexo 6, apartado 10.6.1.2.

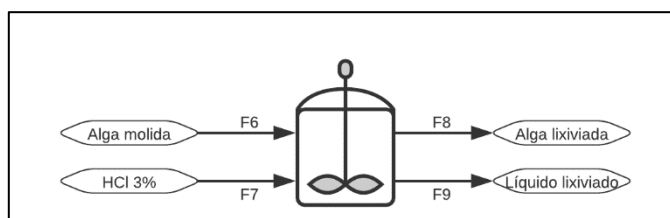


Figura 14: Diagrama de flujos de la etapa de lixiviación ácida

Los datos considerados en la lixiviación ácida son los siguientes:

- Cada 200 [kg] de alga se utilizan 100 [L] de HCl al 0,3% por etapa ^[56]
- El rendimiento en peso del alga lixiviada es de $480 \left[\frac{g \text{ alga lixiviada}}{kg \text{ alga molida}} \right]$ ^[56]

Una vez aplicados los datos se obtienen los flujos presentados en la Tabla 11 (ver cálculo en Anexo 4.3):

Tabla 11: Flujos máscicos por corriente en etapa de lixiviación ácida

Etapa: lixiviación ácida				
	Flujo	Nombre	Composición	Cantidad [kg]
Entradas	F6	Alga molida	Alga	6497,1
	F7	HCl 0,3%	HCl Agua destilada	116,9 38865,6
Salidas	F8	Alga lixiviada	Residuos de alga	3118,6
	F9	Líquido lixiviado	Solvente Manitol	42094,2 266,9

4.2.4 Separación por membrana

El líquido lixiviado obtenido entra a esta etapa con el objetivo de concentrar el manitol liberado y eliminar contaminantes presentes, entre ellos el KCl. Para esto se utiliza un sistema de cuatro separaciones por membrana (microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración y osmosis inversa), las que disminuyen el tamaño de poro a medida que se avanza en la separación. La operación es continua y tiene una duración de 2 horas por cada una de las etapas de drenado de la lixiviación ácida. En la Figura 15 se presenta el diagrama de flujos:

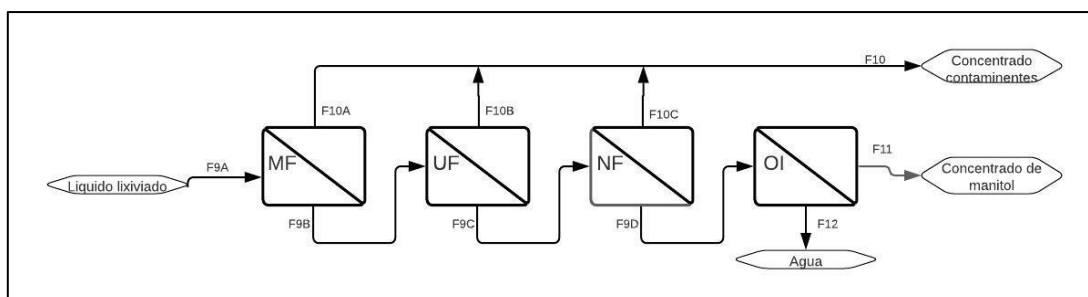


Figura 15: Diagrama de flujos de la etapa de separación por membrana.

Los supuestos considerados en la separación por membrana son los siguientes:

- Dado que se desconoce la composición exacta del líquido lixiviado, se asume que en cada etapa se obtiene un concentrado correspondiente al 10% del flujo de entrada de cada etapa
- La operación permite concentrar el manitol desde un 0,63% a un 1,67% en masa ^[56]
- La presión a la que opera la microfiltración y ultrafiltración será entre 1 y 10 [bar] ^[61], mientras que la operación de nanofiltración operará a 9 [bar] y la osmosis inversa a 16 [bar], según los flujos cruzados típicos entregados por catálogo ^[62].

Una vez aplicados los supuestos se obtienen los flujos presentados en la Tabla 12 (ver cálculo en Anexo 4.4):

Tabla 12: Flujos máxicos por corriente en etapa de separación por membrana

Etapa: separación por membrana				
Microfiltración				
	Flujo	Nombre	Composición	Cantidad [kg]
Entrada	F9A	Líquido lixiviado	Solvente Manitol	42094,2 266,9
Salidas	F10A	Concentrado 1	Contaminantes	4236,1
	F9B	Permeado 1	Solvente Manitol	37858,1 266,9
Ultrafiltración				
	Flujo	Nombre	Composición	Cantidad [kg]
Entrada	F9B	Permeado 1	Solvente Manitol	37858,1 266,9
Salidas	F10B	Concentrado 2	Contaminantes	3812,5
	F9C	Permeado 2	Solvente Manitol	34045,6 266,9
Nanofiltración				
	Flujo	Nombre	Composición	Cantidad [kg]
Entrada	F9C	Permeado 2	Solvente Manitol	34045,6 266,9
Salidas	F10C	Concentrado 3	Contaminantes	3431,2
	F9D	Permeado 3	Solvente Manitol	30614,3 266,9
Osmosis Inversa				
Entrada	F9D	Permeado 3	Solvente Manitol	30614,3 266,9
Salidas	F11	Concentrado de manitol	Solvente Manitol	15713,7 266,9
	F12	Agua	Agua	14900,7

4.2.5 Depolimerización

En esta operación ingresa el alga lixiviada obtenida desde la lixiviación ácida para ser tratada con enzimas comerciales (Ctec2 y Htec2, Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca) y alginato liasas (AL) (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) con el fin de degradar el alginato a oligo alginato. Para esto se divide la operación en dos fases: primero ingresa el alga, el agua y el KOH para mantener el pH a 5,5 durante todo el procedimiento, luego se agregan las enzimas comerciales y se opera con agitación de 55 [rpm] a 50°C por 20 horas. Posteriormente, en la segunda fase, la mezcla se enfría a 25°C y se ajusta el pH a 7,5 con KOH, se agrega el M9 buffer 10x ($Na_2HPO_4 - 2H_2O, KH_2PO_4, NaCl, NH_4Cl$) que contiene las oligo alginato liasas (OAL) y se opera con agitación de 55[rpm] por 20 horas más ^[56]. Finalmente, se extrae el líquido depolimerizado obtenido. En la Figura 16 se presenta el diagrama de flujos:

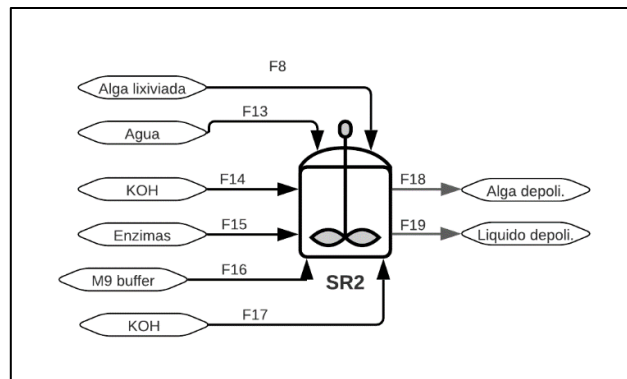


Figura 16: Diagrama de flujos de la etapa de depolimerización

Los datos considerados en la depolimerización son los siguientes:

- Se utiliza la proporción de agua, enzima y M9 buffer indicadas en el artículo de Camus (2016) ^[56], que corresponden a 200[L] de agua, 160 [ml] de Htec2, 16 [ml] de Ctec2 y 800 [mL] de M9 buffer por cada 48 [kg] de alga lixiviada.
- Se utiliza una densidad de 1,22 [g/ml] para la enzima Ctec2 y de 1,20 [g/ml] para la enzima Htec2 ^[63]
- Razón líquido depolimerizado/agua utilizada es 1,05 [L/L]
- Se asume que se logra extraer un 95% del líquido depolimerizado presente en la sedimentación

Una vez aplicados los datos y supuestos se obtienen los flujos presentados en la Tabla 13 (ver cálculo en Anexo 4.5):

Tabla 13: Flujos másicos por corriente en etapa de depolimerización

Etapa: depolimerización				
	Flujo	Nombre	Composición	Cantidad [kg]
Entradas	8	Alga lixiviada	Residuos de alga	3118,6
	13	Agua	Agua	12994,2
	14	KOH	KOH	1,9
	15	Enzimas	HTec2	12,6
			CTec2	1,3
	16	M9 buffer con AL	Agua	45,6
			Na ₂ HPO ₄	3,9
KH ₂ PO ₄			1,6	
NH ₄ Cl			0,3	
NaCl			0,3	
17	KOH	AL	0,4	
		KOH	0,1	
Salidas	18	Alga depolimerizada	Alga depolimerizada	3218,9
		Líquido depolimerizado	Líquido depolimerizado	

4.2.6 Sacarificación

Consiste en la última etapa de la línea de pretratamiento y tiene como objetivo obtener monómeros de alginato (DEHU) como azúcar fermentable para utilizar como sustrato en la fermentación. Para esto, ingresa el líquido depolimerizado, se ajusta el pH a 7,5 y la temperatura a 25° y se agita. Finalmente, se agrega el crudo de oligoalginato liasa y se mantienen las condiciones por 20 horas. En la Figura 17 se presenta el diagrama de flujos:

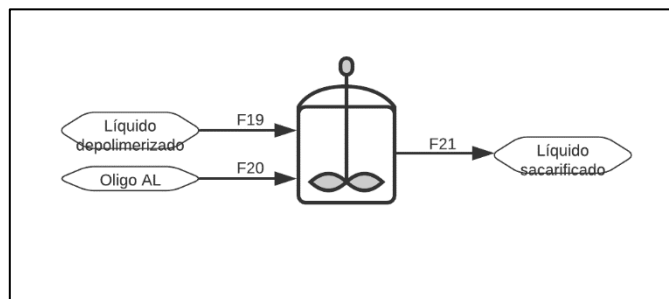


Figura 17: Diagrama de flujos de la etapa de sacarificación.

Los datos considerados en la sacarificación son los siguientes:

- Se utiliza la proporción de lisado crudo de oligoalginato liasa presentado en Camus (2016), que corresponde a 510 [ml] de crudo de OAL por cada 34 [L] líquido depolimerizado ^[56]
- Se asume que la densidad del crudo de OAL es similar a la del agua, considerando que corresponde a un lisado crudo de enzimas y no a un extracto purificado de estas.
- La concentración de glucosa en el líquido sacarificado es de 1,54 [g/L] ^[56]

- La concentración de DEHU en el líquido sacarificado es de 22,3 [g/L] ^[56]

Una vez aplicados los datos se obtienen los flujos presentados en la Tabla 14 (ver cálculo en Anexo 4.6):

Tabla 14: Flujos másicos por corriente en etapa de sacarificación

Etapa: sacarificación				
	Flujo	Nombre	Composición	Cantidad [kg]
Entradas	19	Líquido depolimerizado	Líquido depolimerizado	12961,7
	20	Oligo AL cruda	Oligo AL cruda	194,4
Salidas	21	Líquido sacarificado	Solvente	12842,5
			Glucosa	20,3
			DEHU	293,4

4.2.7 Cultivo de adaptación

Una fracción del líquido sacarificado es introducida al fermentador para generar un cultivo de adaptación de *Y. lipolytica*. En primer lugar, se esteriliza el medio a 121°C por 15 minutos, luego se disminuye la T° a 30°C, se ajusta el pH a 5,5, la aireación a 1[vvm], la agitación a 158 [rpm] (ver detalle en Anexo 6.1) y se inocula. La duración estimada de esta etapa es de 5 horas, tomando en cuenta la duración de la fase lag (de adaptación) en el crecimiento de *Y. lipolytica* en manitol del artículo de Li (2019) ^[47], como muestra la Figura 18.

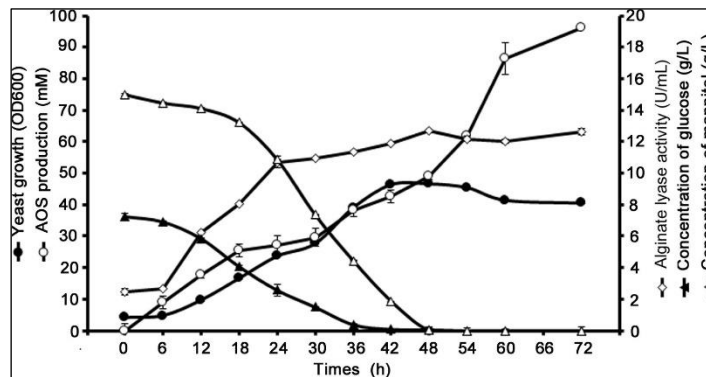


Figura 18: perfil de crecimiento y consumo de sustrato en de la levadura *Y. lipolytica* en medio compuesto de glucosa y manitol ^[47].

Dicho supuesto corresponde a una aproximación, dado que se desconoce el perfil de crecimiento de *Y. lipolytica* y el sustrato del artículo de Li (2019) ^[47] es uno de los más similares encontrados en bibliografía.

En la Figura 19 se presenta el diagrama de flujos:

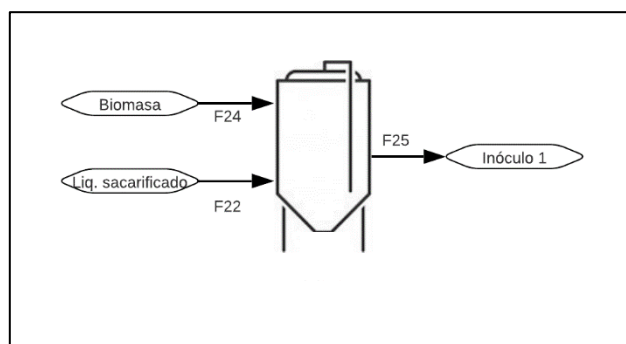


Figura 19: Diagrama de flujos de la etapa de cultivo de adaptación.

Los supuestos considerados en el cultivo de adaptación son los siguientes:

- Se asume que no existirá crecimiento de la levadura en esta etapa, según la duración de la fase lag expresada en la DO_{600} observada en la Figura 18
- Despreciando los requerimientos de mantención se tiene que no existe consumo de sustrato.
- El inóculo corresponde a un 11% del volumen de trabajo del fermentador siguiente

Una vez aplicados los datos se obtienen los flujos presentados en la Tabla 15 (ver cálculo en Anexo 4.7):

Tabla 15: Flujos máscicos por corriente en etapa del cultivo de adaptación

Etapa: cultivo de adaptación				
	Flujo	Nombre	Composición	Cantidad [kg]
Entradas	22	Liquido sacarificado	Solvente DEHU Glucosa	351,4 8,0 0,5
	24	Biomasa	Biomasa	1,6E-04
Salidas	25	Inóculo 1	Solvente	351,4
			DEHU	8,0
			Glucosa	0,5
			Biomasa	1,6E-04

Cabe destacar que se desconoce la efectividad de incorporar una etapa de adaptación en el diseño del proceso, dado que no fue posible realizar un ensayo en laboratorio que demuestre su efectividad. Sin embargo, estudios relacionados al crecimiento de levaduras en alginato incorporan cultivos de adaptación previos a la propagación en el inóculo con el objetivo de aumentar la asimilación de alginato al incorporar genes de asimilación a las levaduras, lo que se realiza por un determinado número de generaciones^[42]. Por esto, se espera lograr adaptar a la cepa en una serie de adaptaciones previas a pequeña escala para luego ser utilizada en el proceso.

4.2.8 Precultivo en medio YPD

En esta etapa se busca proliferar la levadura para servir de inóculo en la fermentación con medio algal. En primer lugar, se incorpora el 1% de extracto de levadura y 2% peptona al agua del medio YPD y se ajusta el pH a 5,5. Luego, se esteriliza el medio a 121°C por 15 minutos y se disminuye la T° a 30°C. Una vez lograda la temperatura señalada, se añade el 2% de dextrosa estéril con el fin de asegurar su calidad y evitar la caramelización. Posteriormente, se fija la aireación a 1[vvm] y la agitación a 76 [rpm] (ver detalle en Anexo 6.1). Finalmente, se inocula con el contenido del fermentador anterior y se opera hasta obtener una DO_{600} igual a 5^[47], como muestra la Figura 18, que ilustra la cantidad de biomasa que debe existir para comenzar con la fermentación principal. En la Figura 20 se presenta el diagrama de flujos:

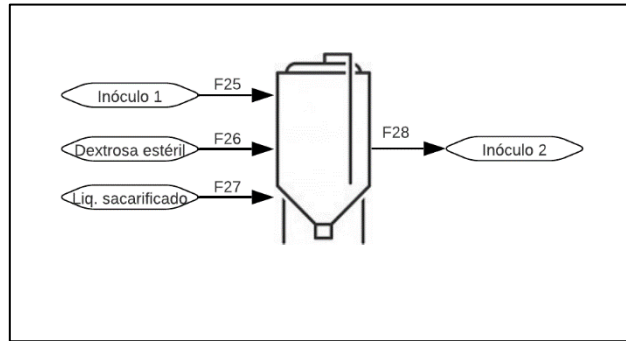


Figura 20: Diagrama de flujos de la etapa de cultivo en medio YPD.

Los supuestos considerados en el cultivo en medio YPD son los siguientes:

- Se asume un rendimiento en glucosa de $0,6 \left[\frac{\text{biomasa}}{\text{g sustrato}} \right]$ y una tasa de crecimiento específica máxima de $0,24 \text{ [h}^{-1}\text{]}$
- El volumen de trabajo del fermentador corresponde a un 11% del volumen de trabajo del fermentador siguiente

Una vez aplicados los datos y supuestos se obtienen los flujos presentados en la Tabla 16 (ver cálculo en Anexo 4.8):

Tabla 16: Flujos másicos por corriente en etapa del precultivo en medio YPD

Etapa: precultivo en medio YPD				
	Flujo	Nombre	Composición	Cantidad [kg]
Entradas	25	Inoculo 1	Solvente	351,4
			DEHU	8,0
			Glucosa	0,5
		Biomasa	0,0	
	26	Dextrosa	Glucosa	57,7
	27	Medio YPD	Peptona	57,7
			Extracto de levadura	28,9
			Agua	2599,0
Salidas	28	Inoculo 2	Solvente	2950,4
			DEHU	8,0
			Glucosa	46,3
			Peptona	45,9
			Extracto de levadura	22,9
		Biomasa	7,20	

4.2.9 Cultivo en medio algal

Corresponde a la etapa final de cultivo, en donde se obtendrá la biomasa húmeda que pasará a formar proteína unicelular para alimentación. En primer lugar, ingresa el líquido sacarificado restante, el concentrado de manitol y un 0,5% (p/v) de la fuente de nitrógeno seleccionada, que corresponde a sulfato de amonio. Posteriormente se esteriliza el contenido a 121°C por 15 minutos, luego se disminuye la T° a 30°C, se ajusta el pH a 5,5, la aireación a 1 [vvm] y la agitación a 135 [rpm] (estimado con la potencia de agitación típica de cultivos celulares de alrededor de 25 [m³] [64], ver Anexo 6.1). Finalmente, se inocula el contenido del fermentador anterior y se deja fermentar por un tiempo de 15 horas, calculado en esta misma etapa. En la Figura 21 se presenta el diagrama de flujos:

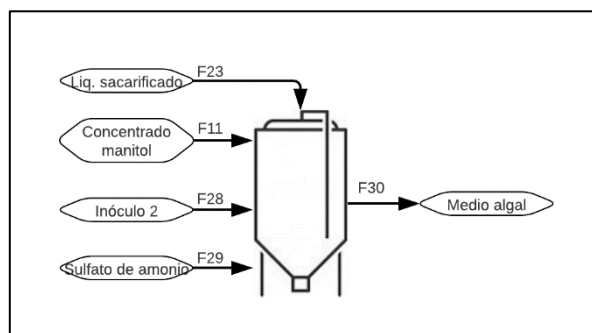


Figura 21: Diagrama de flujos de la etapa de cultivo en medio algal.

Los supuestos considerados en el cultivo en medio algal son los siguientes:

- Se considera un rendimiento en DEHU promedio de 0,4 $\left[\frac{\text{biomasa}}{\text{g sustrato}}\right]$ y una tasa de crecimiento específica máxima de 0,24 $[h^{-1}]$
- Se asume que todos los sustratos presentes muestran el mismo comportamiento cinético.
- Se opera la fermentación hasta acabar por completo el sustrato (dado que en ausencia de sustrato la levadura aún es capaz de sobrevivir consumiendo sus propios lípidos para obtener la energía de mantención y que se debe operar hasta finales de la fase estacionaria para eliminar ácidos nucleicos indeseados. Sin embargo, esto no asegura que al mismo tiempo se puedan consumir proteínas intracelulares que disminuyan el contenido proteico total, razón por la que sería útil conocer en que punto comienza a decrecer la concentración de proteína).
- El consumo de nitrógeno se calcula según el consumo de la fermentación [ver Anexo 5]

Una vez aplicados los datos y supuestos se obtienen los flujos presentados en la Tabla 17 (ver cálculo en Anexo 4.9)

Tabla 17: Flujos másicos por corriente en etapa de la fermentación en medio algal

Etapa: fermentación				
	Flujo	Nombre	Composición	Cantidad [kg]
Entradas	23	Líquido sacarificado	Solvente	12494,1
			Glucosa	19,7
			DEHU	285,4
	11	Concentrado de manitol	Solvente	15713,7
			Manitol	266,9
28	Inóculo 2	Solvente	2950,4	
		DEHU	8,0	
		Glucosa	46,3	
		Peptona	45,9	
		Extracto de levadura	22,9	
29	Nitrógeno	Biomasa	7,2	
		Sulfato de amonio	159,9	
Salidas	30	Medio algal	Solvente	31158,2
			Glucosa	0,0
			DEHU	0,0
			Manitol	0,0
			Peptona	45,9
			Extracto de levadura	22,8
			Biomasa	1227,6
			Sulfato de amonio	60,8

4.2.10 Centrifugación

En esta etapa se realiza una operación de separación sólido/fluido que permite obtener una corriente de biomasa húmeda. Se centrifuga el contenido de la fermentación a 8000xG ^[56], siendo una operación continua que debe ser mantenida a 4°C. Se define el uso de dos centrifugas tubulares industriales en paralelo que permitan procesar grandes flujos de medio algal, como es el caso de las centrifugas *CEPA Zentrifugen* (Modelo Z101 GP) ^[65], obteniéndose una operación de 5,2 horas [ver Anexo 6.1]. En la Figura 22 se presenta el diagrama de flujos:

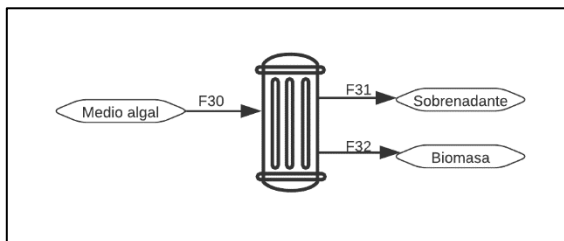


Figura 22: Diagrama de flujos de la etapa de centrifugación.

El dato considerado en la centrifugación es el siguiente:

- Se define el uso de una centrífuga tubular con una eficiencia de un 80%.

Una vez aplicado se obtienen los flujos presentados en la Tabla 18 (ver cálculo en Anexo 4.10):

Tabla 18: Flujos máxicos por corriente en etapa de centrifugación

Etapa: centrifugación				
	Flujo	Nombre	Composición	Cantidad [kg]
Entradas	30	Medio algal	Solvente	31226,9
			Biomasa	1227,6
Salidas	31	Sobrenadante	Solvente	31226,9
			Biomasa	245,5
	32	Biomasa	Biomasa húmeda	982,1

4.2.11 Secado

Corresponde a la última etapa del proceso de producción de proteína unicelular para alimentación animal. Permite disminuir la humedad de la biomasa desde un 80% a un 5%, permitiendo su preservación y mejorando sus características organolépticas. Es una etapa continua conjunta a la centrífuga (dada la descarga intermitente de la centrífuga se considera un tanque de almacenamiento y bombeo), y se define que su duración corresponderá a las últimas 4 horas de trabajo de la centrífuga previa. En la Figura 23 se presenta el diagrama de flujos:

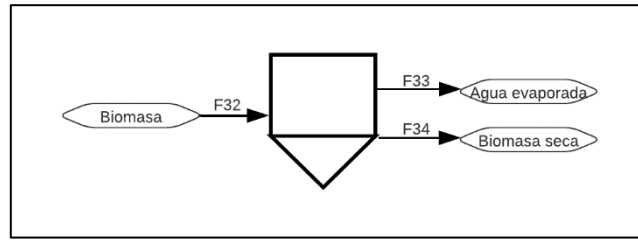


Figura 23: Diagrama de flujos de la etapa de cultivo de secado.

Realizando los balances de masa, se obtienen los flujos presentados en la Tabla 19 (ver cálculos en Anexo 4.11):

Tabla 19: Flujos másicos por corriente en etapa de secado

Etapa: Cámara de secado				
	Flujo	Nombre	Composición	Cantidad [kg]
Entrada	32	Biomasa húmeda	Biomasa húmeda	982,1
Salidas	34	Biomasa seca	Biomasa seca	206,7
	33	Agua evaporada	Agua evaporada	775,3

4.2.12 Balance de masa global

A continuación, en la Tabla 20 se presenta el balance de masa global del proceso, con sus respectivas entradas y salidas. Destaca la formación de 206,75 [kg/lote] de biomasa seca como producto principal; la generación de 3218,9 [kg/lote], 11479,9 [kg/lote] y 14.900,7 [kg/lote] de alga depolimerizada, concentrado con KCl y agua filtrada respectivamente como subproductos y la demanda de 60.771,5 [kg/lote] de agua (sin incluir servicios y lavado), junto con 14,2 [kg/lote] de enzimas comerciales (Htec2, Ctec2 y alginato liasa) y 194,4 [kg/lote] de lisado crudo de oligoalginato liasa.

Tabla 20: Corrientes de entrada y salida del proceso productivo global.

Balance global				
	Flujo	Composición	Cantidad [kg]	Total [kg]
Entradas	F1	Alga fresca	6334,66	67743,99
	F2	Agua	6267,14	
	F7	HCL 0,3%	38982,58	
	F13	Agua	12994,19	
	F14	KOH	1,90	
	F15	Enzimas	13,84	
	F16	M9 con AL	51,98	
	F17	KOH	0,06	
	F20	Crudo de Oligo AL	194,43	
	F24	Biomasa	0,0002	
	F26	Dextrosa	57,7483	
	F27	Medio YPD	2685,60	
	F29	Fuente de nitrógeno	159,86	
	Salidas	F3	Agua lavado	
F5		Agua de alga (interior)	55,70	
F10		Filtrado con KCl	11479,85	
F12		Agua	14900,70	
F18		Alga depolimerizada	3218,88	
F31		Sobrenadante	31226,87	
F33		Agua evaporada	775,31	
F34		Biomasa seca	206,75	
		error		0,6

4.2.13 Rendimientos

En función de los balances de masa presentados, se calcularon los rendimientos del proceso que se presentan en la Tabla 21. Se obtuvieron rendimientos de biomasa seca en alga fresca y alga seca, junto con rendimientos de proteína en alga seca y alga fresca. Para el rendimiento de proteína se asume una concentración promedio de bibliografía de 39% [proteína/peso seco], mientras que para el peso seco del alga se considera la ausencia de un 85% de agua en peso.

Tabla 21: Rendimientos de biomasa seca y proteína en alga fresca y alga seca

Rendimientos				
$\left[\frac{g \text{ biomasa seca}}{kg \text{ alga fresca}}\right]$	$\left[\frac{g \text{ biomasa seca}}{kg \text{ alga seca}}\right]$	$\left[\frac{kg \text{ proteína}}{\text{Lote}}\right]$	$\left[\frac{g \text{ proteína}}{kg \text{ alga fresca}}\right]$	$\left[\frac{g \text{ proteína}}{kg \text{ alga seca}}\right]$
32,6	217,6	80,6	12,7	84,9

4.3 Dimensionamientos

4.3.1 *Selección de equipos*

Considerando que la mayor parte del proceso se realiza de forma batch, a excepción del centrifugado, el secado y la separación por membrana, se escogen los siguientes equipos por etapa. Para el lavado se escoge un tanque que permita la entrada de agua a gran velocidad y tenga un volumen adecuado para el volumen de trabajo. Mientras que, para la molienda, se escoge un molino de martillos utilizado comúnmente para molienda gruesa a media.

Para las reacciones de lixiviación ácida, depolimerización y sacarificación se seleccionaron reactores batch de tanque agitado. Estos deben estar equipados con chaquetas eléctricas que permitan calentamiento y enfriamiento, con un sistema de aireación, un sistema de agitación y sistemas de control de T° y pH (uso de sensores). Considerando los volúmenes de trabajo y condiciones de operación, se decide que se utilizará el mismo reactor para la lixiviación ácida y la depolimerización, el que estará equipado con un sistema de drenado. Cabe destacar que el proceso original consideraba una operación de centrifugación luego del depolimerizado. Sin embargo, el tamaño de los trozos de alga considerado (inferior a ¼ de pulgada, asumiendo que el depolimerizado solo agujerea los trozos de alga) permite recurrir a una sedimentación dentro del mismo tanque, dada la velocidad de sedimentación igual a 2,2 [m/s].

Para las fermentaciones se ocuparán fermentadores con sistemas de calentamiento eléctrico e intercambiadores de calor que permitan la esterilización dentro del equipo y la remoción del calor de fermentación. Además, deben contar con sistemas de aireación, agitación y control de pH y T° (sensores).

La separación por membrana será realizada por membranas en espiral que permitan procesar el flujo en las 2 horas de operación por cada drenado de la lixiviación. Estas serán las ya probadas en el artículo de Camus (2016) ^[56] para las condiciones de pretratamiento, que corresponden a la GR95PP para la microfiltración, GR61PP para la ultrafiltración, NF para la nanofiltración y RO98 pHt™ para la osmosis inversa, todas de ALFA LAVAL. Por lo que resta realizar el escalamiento según el flujo de operación. Cabe mencionar que, además de las membranas, se hace necesario el uso de equipos auxiliares como una bomba, válvulas y sistemas de control que no fueron considerados en los cálculos.

La centrifugación será llevada a cabo por dos centrífugas tubulares, dado que es la de más alta eficiencia para flujos de escala industrial, pero aún así los límites de flujo no cubren los requerimientos del proceso con un solo equipo. Dichos equipos deben contar con un sistema de enfriamiento que permita operar a 4°C dado el calor producido por la velocidad de giro del equipo. Además, dada su descarga intermitente debe contar con un sistema de bombeo, válvulas y tanque de almacenamiento que permitan el flujo constante de fluido altamente viscoso hacia el secador, los que no se consideraron en los cálculos. Cabe destacar que existen bombas especializadas en vaciado de bidones que permiten transportar productos altamente viscosos de hasta 120.000 [cps] denominadas de husillo eléctrico, entre otras ^[66].

Finalmente, para la operación de secado se seleccionó un secador spray, el que permitirá un secado de las gotas asperjadas en segundos evitando la descomposición de la biomasa. Para este equipo se debe integrar un separador ciclónico como equipo auxiliar, que no fue considerado en los cálculos.

4.3.2 Dimensiones

A continuación, se explica brevemente la metodología de cálculo de cada uno de los equipos mencionados en la sección anterior y se presentan sus dimensiones características. Para el detalle completo del dimensionamiento de cada equipo ver Anexo 6.

En el caso del tanque de lavado, los reactores y los fermentadores se hizo uso de relaciones entre la altura y el diámetro del tanque $\left(\frac{H}{D}\right)$, entre el diámetro del tanque y diámetro del impeler $\left(\frac{D_i}{D}\right)$ y márgenes de seguridad para el cálculo de las dimensiones características. Dichos valores corresponden a $\left(\frac{H}{D}\right) = 1.5$ y $margin = 10\%$ para el tanque, $\left(\frac{H}{D}\right) = 1.5$, $\left(\frac{D_i}{D}\right) = \frac{1}{3}$ y $margin = 20\%$ para los reactores y $\left(\frac{H}{D}\right)=3$, $\left(\frac{D_i}{D}\right) = \frac{1}{3}$ y $margin = 20\%$ para los fermentadores. Además, se calcularon las revoluciones por segundo para mantener el nivel de agitación con el uso del “escalamiento mediante mantención de la velocidad tangencial $(ND_i)_{escala1} = (ND_i)_{escala2}$ ”. Por último, se calculó la potencia de agitación necesaria en [kW]. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 22 (para más detalle ver Anexo 6).

Tabla 22: Dimensiones de tanque, reactores y fermentadores.

Dimensiones características						
Nombre	Tag	Volumen [m ³]	Altura [m]	Diámetro [m]	Diámetro impeler [m]	Potencia [kW]
Tanque de lavado	TQ1	13,79	3,41	2,27	-	-
Reactor lixiviación y depolimerización	SR1	22,37	4,00	2,67	0,89	2,14
Reactor sacarificación	SR3	15,79	3,56	2,38	0,79	4,28
Fermentador 1	FM1	0,43	1,70	0,57	0,19	0,01
Fermentador 2	FM2	3,89	3,55	1,18	0,39	0,06
Fermentador 3	FM3	38,70	7,63	2,54	0,85	3,99

Para conocer las dimensiones de las membranas se calculó el flujo volumétrico a procesar según los requerimientos del proceso y se hizo una búsqueda en catálogos de ALFA LAVAL a partir del flujo cruzado típico de membranas en espiral, obteniendo sus dimensiones y el modelo de cada una de estas (ver detalle en Anexo 6). En cambio, tanto las centrífugas como el secador fueron dimensionados con ecuaciones de diseño a partir de los flujos a procesar, corroborando las dimensiones de las centrífugas con valores de catálogo ^[65]. Las dimensiones características de los equipos continuos se presentan en la Tabla 23.

Tabla 23: Dimensiones características equipos continuos.

Dimensiones características					
Nombre	Tag	Flujo de trabajo [m ³ /h]	Altura [m]	Diámetro [m]	Modelo/ observación
Membrana microfiltración	MF	7,06	0,965	0,095	GR95PP 516825
Membrana microfiltración	NF	6,35	0,965	0,095	GR61PP 516495
Membrana microfiltración	UF	5,72	0,965	0,095	NF 530979
Membrana osmosis inversa	OI	5,15	0,965	0,095	RO98 pHt™ 516645
Centrífuga	CF1	3	0,75	0,15	CEPA Z101 GP
Centrífuga	CF2	3	0,75	0,15	CEPA Z101 GP
Secador spray	CS1	0,219	1,57	1,05	-

4.4 *Balances de energía*

El estudio de los balances de energía considera la cantidad de calor que es necesario remover o agregar a cada equipo para mantener las condiciones de operación. Este cálculo se realiza asumiendo una temperatura ambiente promedio de 15°C, dado que la ubicación de la planta se encontraría en la región de Los Lagos, desde donde se extrae el alga fresca.

Los balances se dividen en tres grupos: calentamientos, enfriamientos y mantenciones. Dentro de los calentamientos se encuentran las operaciones de lixiviación ácida, depolimerización y sacarificación (que deben operar a temperaturas mayores que la ambiente) y las tres fermentaciones cuyos medios deben ser esterilizados a 121°C por 15 minutos. Para los enfriamientos se considera la disminución de la temperatura del reactor de depolimerización, la disminución de temperatura de los medios de cultivo hasta su T° de operación y el enfriamiento del flujo que va a las centrífugas a 4°C. Mientras que, para las mantenciones, se consideran los tiempos y las temperaturas de operación cada reacción y fermentación.

Con los resultados obtenidos se define que los reactores 1 y 3 poseerán chaquetas eléctricas que tengan la capacidad de realizar calentamientos y enfriamientos. En cambio, los calentamientos de los fermentadores serán realizados por resistencias eléctricas y los enfriamientos por intercambiadores de calor, que corresponden a chaquetas enfriadoras para los fermentadores 1 y 2 y a un intercambiador interno para el fermentador 3. Por otro lado, se define que el flujo que ingresa a la centrífuga será enfriado por un intercambiador externo previo, debido a que corresponde a una operación continua y no batch como el resto de los equipos (ver Anexo 7 para más detalle).

Cabe destacar que no se considera la capacidad de refrigeración propia de la centrífuga para mantener los cambios de temperatura en su interior (provocados por el calor liberado por la velocidad de giro del equipo). Para esto se debe observar el consumo eléctrico de las centrífugas tubulares en la mantención de la operación, el que corresponde a 2,2 [kW]^[65] con una duración de 5,2 horas.

En la Tabla 24 se muestran los resultados obtenidos para los calentamientos. Se presentan las temperaturas a las que se debe calentar cada flujo y la cantidad de calor por lote (Q total) que será entregada por las resistencias en cada uno los equipos.

Tabla 24: Calor requerido para las operaciones de calentamiento (entregado por resistencias eléctricas)

Calentamientos					
Lixiviación ácida	Flujos [kg/Lote]	Temperatura Inicial [°C]	Temperatura Final [°C]	Q[kj/lote]	Q total [kJ/lote]
F6: alga	6.497	15	25	114.349	1.746.160
F7: HCl 0,3%	38.983	15	25	1.631.811	
Depolimerización	Flujos [kg/Lote]	Temperatura Inicial [°C]	Temperatura Final [°C]	Q[kj/lote]	Q total [kJ/lote]
F8: alga lixiviada	3.119	25	50	137.219	1.497.061
F13: agua	12.994	25	50	1.359.842	
Sacarificación	Flujos [kg/Lote]	Temperatura Inicial [°C]	Temperatura Final [°C]	Q[kj/lote]	Q total [kJ/lote]
F20: líquido depolimerizado	12.962	15	25	536.626	544.764
F21: Crudo Oligo AL	194	15	25	8.139	
Fermentador 1	Flujos [kg/Lote]	Temperatura Inicial [°C]	Temperatura Final [°C]	Q[kj/lote]	Q total [kJ/lote]
F25: líquido sacarificado	360	15	121	157.953	157.953
Fermentador 2	Flujos [kg/Lote]	Temperatura Inicial [°C]	Temperatura Final [°C]	Q[kj/lote]	Q total [kJ/lote]
F25: líquido sacarificado	360	15	121	157.953	1.361.868
F27: medio YPD	2.743	15	121	1.203.915	
Fermentador 3	Flujos [kg/Lote]	Temperatura Inicial [°C]	Temperatura Final [°C]	Q[kj/lote]	Q total [kJ/lote]
F24: L. sacari.	12.799	15	121	5.616.943	14.064.123
F11: c. mannitol	15.981	15	121	7.036.331	
F28: inóculo 2	3.103	15	121	1.361.799	
F29: sulf. De amonio	160	15	121	49.051	

Por otro lado, dado que todos los enfriamientos (excepto el del reactor de depolimerización) se realizan con intercambiadores, es necesario calcular la masa (o flujo en el caso de la centrífuga) de enfriamiento que permita el intercambio. Para esto se define el uso de flujos de agua fría (obtenida desde un sistema de enfriamiento) a excepción del refrigerante utilizado en la centrífuga. Así, en la Tabla 25, se muestra la cantidad de calor que debe ser removido (Q total), el flujo de servicio necesario, el área del intercambiador (A) y el tiempo necesario para lograrlo (t) (esto dado que la mayoría de los enfriamientos son batch).

Tabla 25: Calor removido por las operaciones de enfriamiento (Q total), flujos de servicio, área de intercambiadores (A) y tiempo de enfriamiento (t).

Enfriamientos					
Depolimerización	Flujos [kg/Lote]	Temperatura Inicial [°C]	Temperatura Final [°C]	Q[kj/lote]	Q total [kJ/lote]
F8: alga lixiviada	3.119	50	25	-137.219	-1.502.501
F13: agua	12.994	50	25	-1.359.842	
F16: M9 buffer	52	50	25	-5.439	

Fermentador 1	Flujos [kg/Lote]	Temperatura Inicial [°C]	Temperatura Final [°C]	Q[kj/lote]
F25: liq sacarificado	360	121	30	-135.601

FE1	Flujos (Kg/lote)	Temperatura Inicial (°C)	Temperatura Final (°C)	Q total [kJ/lote]	A [m^2]	t [min]
Agua	1.800	10	28	135.601	3	8

Fermentador 2	Flujos [kg/Lote]	Temperatura Inicial [°C]	Temperatura Final [°C]	Q[kj/lote]
F25: líquido sacarificado	360	121	30	-135.601
F27: medio YPD	2.743	121	30	-1.033.550

FE2	Flujos [kg/Lote]	Temperatura Inicial [°C]	Temperatura Final [°C]	Q total [kJ/lote]	A [m^2]	t [min]
Agua	15.517	10	28	1.169.151	13	17

Fermentador 3	Flujos [kg/Lote]	Temperatura Inicial [°C]	Temperatura Final [°C]	Q[kj/lote]
F24: L. sacari.	12.799	121	30	-4.822.092
F11: c. mannitol	15.981	121	30	-6.040.623
F28: inóculo 2	3.103	121	30	-1.169.092
F29: sulf. De amonio	160	121	30	-42.110

FE3	Flujos [kg/Lote]	Temperatura Inicial [°C]	Temperatura Final [°C]	Q total [kJ/lote]	A [m^2]	t [min]
Agua	160.242	10	28	12.073.917	357	6

Centrifuga 1	Flujos [kg/s]	Temperatura Inicial [°C]	Temperatura Final [°C]	Q[kj/s]
F30: medio algal	2	30	4	-245

FE4	Flujos [kg/s]	Temperatura Inicial [°C]	Temperatura Final [°C]	Q total [kJ/lote]	A [m^2]
Refrigerante	12	-10	-2	245	1.735

Posteriormente, se estudia la cantidad de calor a remover o ceder a los equipos para mantener las condiciones durante todo el tiempo de operación. Para esto se calcula el calor de mantención (Q_m) considerando la entalpía de reacción (ΔH_{rxn}), la potencia de agitación (w_s) y el calor cedido al ambiente por convección (Q_p). Los resultados se muestran en la Tabla 26.

Tabla 26: Calor de mantención (Q_m) a remover según los valores de calor cedido al ambiente por convección (Q_p), potencia de agitación (w_s) y entalpía de reacción (ΔH_{rxn}).

Mantenciones				
Equipo	Q_p [kW]	w_s [kW]	ΔH_{rxn} [kW]	Q_m [kJ/s]
Lixiviación ácida (reactor 1)	8,1	-2,1	-	10,2
Depolimerización fase 1(reactor 1)	28,3	-2,1	-	30,4
Depolimerización fase 2 (reactor 1)	8,1	-2,1	-	10,2
Sacarificación (reactor 3)	6,4	-4,3	-63,7	-53,0
Fermentación 1	1,1	0,0	0,0	1,1
Fermentación 2	4,8	-0,1	0,0	4,8
Fermentación 3	22,0	-0,3	-129,3	-107,0

Debido a la falta de datos correspondientes a la caracterización de los flujos, no fue posible calcular el calor de reacción de las etapas de lixiviación ácida y depolimerización en el reactor 1. Sin embargo, dado el orden de magnitud bajo que se obtiene para el calor cedido y potencia de agitación en relación con la entalpía de reacción obtenida para la reacción que si se pudo calcular (sacarificación), se asume que el calor de mantención de la lixiviación ácida y de la depolimerización será inferior y que de todos modos hay que enfriar el reactor 1 (con chaqueta eléctrica como se mencionó anteriormente), junto con el reactor 3. Los fermentadores 1 y 2 deben ser calentados por las resistencias eléctricas que los componen, mientras que al fermentador 3 se le debe remover el calor generado por el metabolismo de la levadura utilizando el intercambiador interno considerado. En la Tabla 27, se muestra el flujo de servicio necesario para mantener al fermentador 3.

Tabla 27: Flujo de servicio requerido para la mantención del fermentador 3.

Mantención fermentador	Flujos [kg/s]	Temperatura Inicial [°C]	Temperatura Final [°C]	Q[kJ/s]	
F30: medio algal	-	30	30	-107	
FE5	Flujos [kg/s]	Temperatura Inicial [°C]	Temperatura Final [°C]	Q[kJ/s]	A [m ²]
Agua	460	10	28	107	357

Finalmente, se calcula la cantidad total de agua de servicio (FE1, FE2, FE3 y FE5) y refrigerante requerido (FE4) y se estudia la cantidad de energía [kW] que debe utilizar el sistema de enfriamiento para entregarla. Los resultados se muestran en la Tabla 28.

Tabla 28: Flujos de servicio totales y energía requerida para producirlos.

SE1	Flujos (Kg/lote)	Temperatura Inicial (°C)	Temperatura Final (°C)	Q(KJ/lote)
Agua	59.831.921	15	10	-1.252.282.113
SE2	Flujos (Kg/lote)	Temperatura Inicial (°C)	Temperatura Final (°C)	Q(KJ/lote)
Refrigerante	178.921	15	-10	-18.724.070

4.5 Diagrama de flujos

Considerando los flujos estudiados en el balance de masa, los equipos principales y auxiliares mencionados en el apartado de dimensionamiento y los intercambiadores de calor y flujos de servicio presentados en el apartado del balance de energía, se confecciona el diagrama de flujos de la planta de producción de proteína unicelular de *Y. lipolytica* a partir de *M. pyrifer*. El resultado se muestra en la Figura 24.

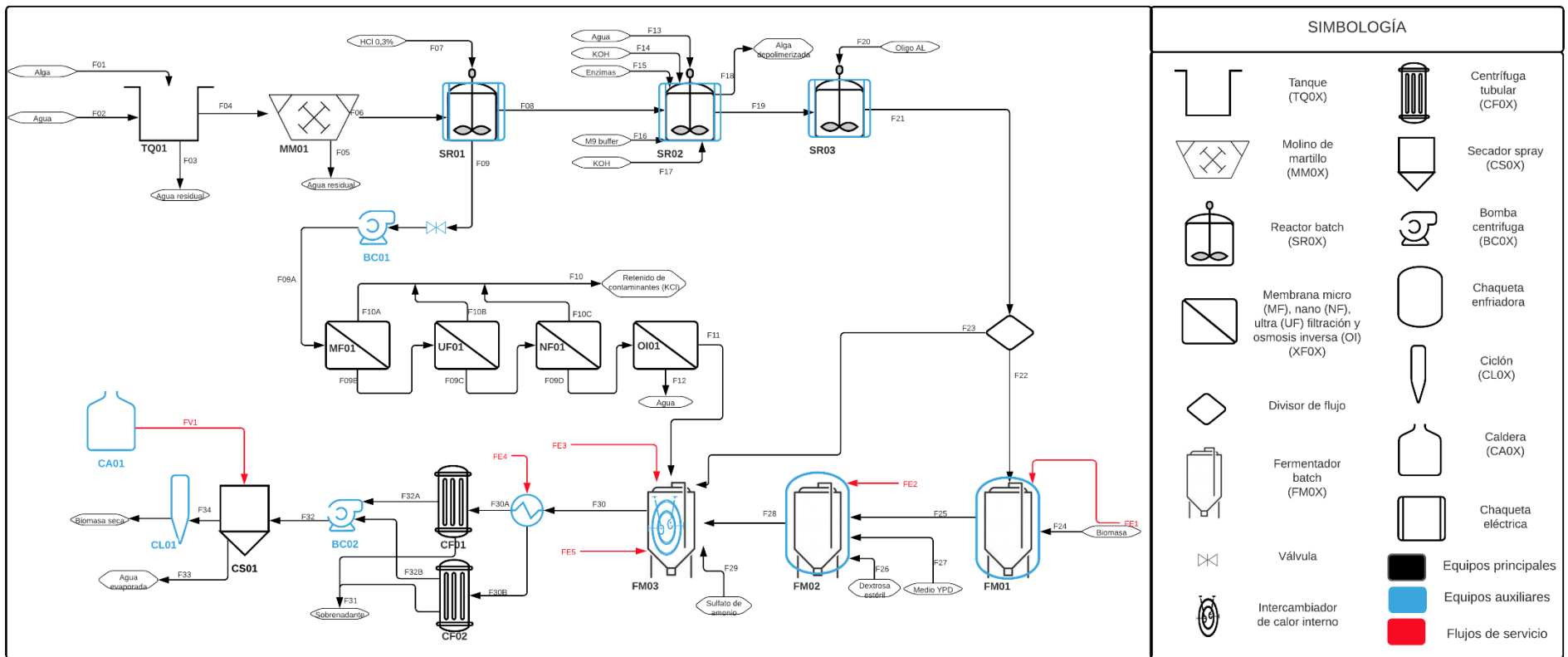


Figura 24: Diagrama de flujo de la planta de producción de proteína celular de *Y. lipolytica* a partir de *M. pyrifer*

4.6 Análisis de sensibilidad

Con el fin de determinar la influencia de los parámetros cinéticos de *Y. lipolytica* sobre la producción total de biomasa seca (proteína unicelular), se realiza un análisis de sensibilidad de los valores del rendimiento en glucosa, DEHU y la tasa de crecimiento específica máxima μ_{max} asumidos en las fermentaciones diseñadas.

En el caso del rendimiento, su valor afecta directamente los niveles de producción de biomasa, mientras que la tasa de crecimiento influye en el tiempo de procesamiento de los lotes (asumiendo que el fermentador en medio algal opera hasta agotar el sustrato), por lo que su valor modifica el tamaño de los equipos considerados para procesar todo el caso base en un año. A continuación, en la Tabla 29 se muestra la influencia del rendimiento biomasa/sustrato, considerando el menor valor, el mayor valor y un valor medio reportados para dicho parámetro en la literatura y mostrados en la Tabla 7 del marco teórico. Mientras que en la Tabla 30, se muestra la influencia de la tasa de crecimiento específico en los tiempos de fermentación y la dimensión de los equipos, considerando el mayor y el menor valor reportados para dicho parámetro en la literatura.

Tabla 29: Variación de la producción al modificar el rendimiento

Sensibilidad rendimientos				
	% variación rendimiento	kg biomasa/lote	kg biomasa/kg alga húmeda	% variación producción
Base $Y_{X/glu} = 0,6$ $Y_{(X/DEHU)} = 0,4$	0,0%	206,7	32,3	0,0%
$Y_{X/glu} = 0,1$ $Y_{(X/DEHU)} = 0,1$	-75,0%	51,2	8,1	-75,0%
$Y_{X/glu} = 0,23$ $Y_{(X/DEHU)} = 0,23$	-42,5%	117,8	18,6	-42,5%
$Y_{X/glu} = 0,65$ $Y_{(X/DEHU)} = 0,65$	62,5%	332,8	52,5	62,5%

Tabla 30: Variación de tiempos de procesamiento y tamaño de reactores al modificar la tasa de crecimiento

Sensibilidad tasa de crecimiento						
Tasa de crecimiento [1/h]	% variación tasa crecimiento	t fermentación [h]	% variación t fermentación	t procesamiento/lote [días]	% variación t lote	% variación tamaño reactores
Base= 0,24 [1/h]	0%	15	0%	3	0%	0%
0,12 [1/h]	-50,0%	30	100%	4	66,6%	18%
0,38 [1/h]	58,3%	9	-40%	1	-66,6%	-31%

4.7 Disposición de la planta (layout)

Por último, se realizó un diseño preliminar de la planta a través de un *layout* en el software AutoCAD, el que se presenta en la Figura 25. Para su confección se consideraron los equipos seleccionados y su posible ubicación espacial dentro de la planta.

Dentro de las consideraciones del diseño se encuentra la instalación de una zona de comedor de oficinas y una de planta, laboratorio, oficinas del jefe de planta, control de calidad, recursos humanos, prevención de riesgos y sala de reuniones. Además de una zona de bodega de productos y una zona de cambio para los trabajadores de planta con duchas y baños (separados por sexo). Esta última zona fue sobredimensionada, dado que la cantidad de trabajadores de la planta escapa del análisis del presente informe. Sin embargo, su ubicación sigue los lineamientos del artículo 25 del D.S 594 (2019) ^[67]. Todas las zonas mencionadas fueron ideadas con aforos reducidos y espacios suficientes para un eventual contexto de trabajo en pandemia.

La disposición de los equipos sigue un orden lógico que permita el flujo de materia en su interior, considerando pasillos de desplazamiento de distancia superior a 1,5 [m] (como indica el artículo 8 del D.S. 594), distancias mínimas de 2 [m] entre equipos y de 3 [m] entre los equipos y las paredes. Se incluyen tanques de almacenamiento de productos intermedios del proceso.

Finalmente, se considera la ubicación de zonas de seguridad y una zona exclusiva para la generación de vapor a partir de la caldera según el artículo 9 del D.S. 10 (2017) ^[68]. Cabe destacar que el área total de la planta no es definitiva, dado que su finalidad es sólo mostrar una posible ubicación de los equipos. Sin embargo, para el diseño se utilizó un área aproximada de 2.000 [m²].

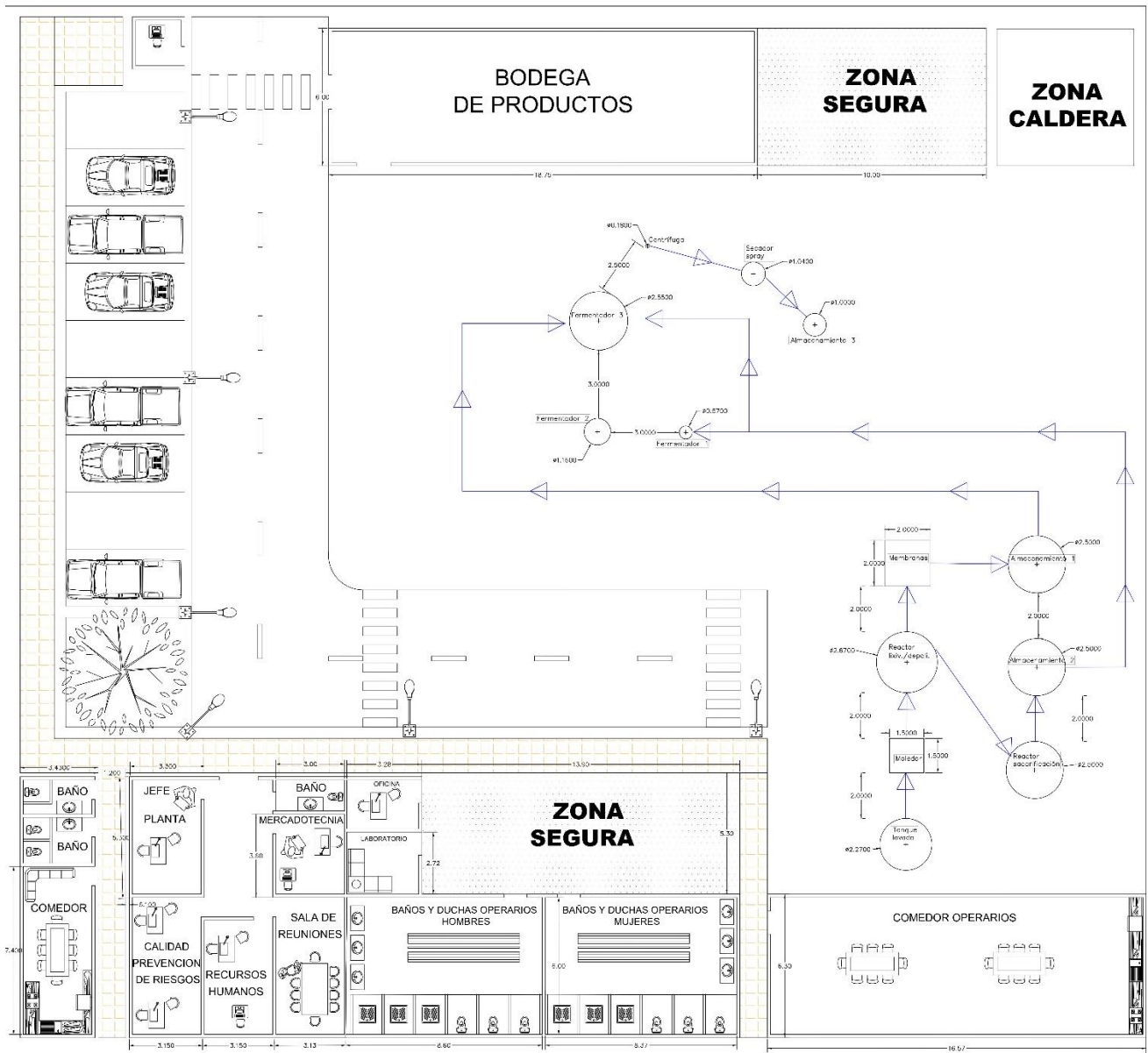


Figura 25: Diseño preliminar de la planta productiva de proteína unicelular desde *Y. lipolytica*.

5. Discusiones

El objetivo del presente estudio consiste en el diseño conceptual de una plata de producción de *Y. lipolytica* para su uso como proteína unicelular a partir de la utilización de alga fresca *M. pyrifera* como sustrato. En términos generales fue posible realizar cada una de las tareas planteadas en la metodología. Sin embargo, existen gran cantidad de supuestos en diferentes etapas de la confección que deben ser discutidos para tener una idea del alcance del diseño planteado:

Diseño del proceso

Debido a que toda la fase del pretratamiento diseñada proviene de estudios previos realizados en la misma alga en análisis, se espera que dicha parte del proceso tenga los menores niveles de incertidumbre de todo el diseño. Mientras que la fase de cultivos corresponde a la etapa más variable dado el desconocimiento del crecimiento del microorganismo en el sustrato.

Una de las variaciones del diseño propuesto y el diseño original del pretratamiento corresponde a la eliminación de la centrífuga que separa el líquido depolimerizado del alga depolimerizada, dado que se asumió un tamaño de alga depolimerizada obtenida que al calcular su velocidad de sedimentación arrojó valores que permiten sedimentarla sin ayuda de fuerza centrífuga, solo sedimentación.

Balances de masa

En primer lugar, para la operación de lavado se toma como supuesto una caracterización de conchas en frondas de *Macrocystis pyrifera* que corresponden a la región de Magallanes, mientras que la ubicación de la planta está en Puerto Montt, región de Los Lagos. En ese sentido, dada la posible diferencia de corrientes de temperatura en el agua es posible que los organismos presentes en la región original sean muy distintos a los propuestos. Sin embargo, permiten ponerse en el peor de los casos dado que se consideró uno de los periodos con mayor presencia de organismos en el alga, lo que permitiría evaluar la producción que se logra con la menor disponibilidad posible de alga.

En cuanto a las reacciones de lixiviación, sacarificación y depolimerización, se toma como supuesto la aplicación directa de las proporciones obtenidas a escala piloto en el estudio desde el que se extrajo el procedimiento ^[56], por lo que se piensa que dichas producciones pueden variar a escala industrial. Sin embargo, son la mejor aproximación posible al estudio escalado.

La cantidad de enzimas comerciales utilizadas, como ya se mencionó, sigue la proporción del estudio de Camus (2016) ^[56], por lo que la cantidad de enzima obtenida es razonable en comparación a la escala piloto desde donde se obtienen las proporcionalidades. Por otro lado, las grandes cantidades de lisado crudo de oligo alginato liasa se justifican considerando que se desconoce la real proporción de enzima dentro del crudo, que no ha sido purificado para obtener la enzima. Por esta razón, se asume que grandes cantidades de solvente vienen incluidas en el crudo. Así, la cantidad y procedencia del crudo de oligoalginato liasa utilizado en el proceso podría variar significativamente la producción de monómeros de alginato en el líquido sacarificado, al desconocer el procedimiento de obtención del lisado y su composición de enzima.

En cuanto a las cantidades de alginato liasas y oligo alginato liasas utilizadas en el proceso, existe la posibilidad de optimizarlas según las investigaciones realizadas en el artículo de Gimpel *et al.* (2018) ^[69]. En el se demuestra que arreglos de endo y exo alginato liasas combinados pueden mejorar los resultados de la sacarificación. Además, el tipo de alginato liasa puede ser seleccionado basado en las condiciones de operación del paso previo, evitando los costos de mantener condiciones para enzimas puntuales.

Por otro lado, existe la opción de purificar el crudo de lisado de OAL, lo que permitiría tener un mayor control en las cantidad de enzima que se está utilizando (estandarización del proceso) y evitando desperdicios al utilizar cantidades óptimas. Sin embargo, traería consigo la incorporación de una línea con equipos de purificación de enzimas.

En cuanto a los supuestos tomados en el desarrollo de los fermentadores, se considera que son los que tienen más incidencia en el diseño completo de la planta, principalmente porque se toman parámetros cinéticos del hongo a escala de laboratorio o piloto, que además fueron estudiados en sustratos diferentes al sustrato algal. En este estudio se escogieron principalmente parámetros relacionados al metabolismo de glucosa. En este sentido puede que el crecimiento real sea mayor o menor al considerado, pero se toma en cuenta que la glucosa, aun cuando es un sustrato de fácil asimilación, no es el sustrato preferente del hongo, el cual presenta mejores parámetros cinéticos en sustratos de tipo oleaginoso como el glicerol y mezclas de aceites vegetales. Por esto se piensa que el uso de parámetros de la glucosa puede representar una aproximación de lo que sería la asimilación del alginato por parte del hongo, en el caso de que posea las rutas metabólicas para incorporarlo.

Se compara además el tiempo de la fermentación del medio algal obtenido (15 horas) con los tiempos de fermentaciones obtenidos en los estudios de Ravanal (2017) ^[48] y Li (2019) ^[47] (42 horas y 48 horas respectivamente). En ambos se operan fermentaciones hasta que se consume por completo el sustrato; en el primero se estudia el crecimiento de *Candida utilis* en monómeros del alginato, mientras que en el segundo se estudia el crecimiento de *Y. lipolytica* en glucosa y manitol de alga parda. Las variaciones de los resultados pueden deberse a que se consideró un crecimiento en estado estacionario de la levadura (constante) para determinar el tiempo de fermentación, lo que deja fuera del análisis las fases de adaptación y de crecimiento exponencial.

El diseño realizado permite que el consumo de nutrientes varíe si varía el crecimiento del hongo, dado que se incorporó el estudio de la fórmula estequiométrica, el rendimiento en el sustrato y los balances de masa en el diseño del fermentador batch. Por esto, se espera que la aproximación de esta variable sea cercana al consumo real del hongo. Sin embargo, dichas aproximaciones presentan simplificaciones, dado que se realizan asumiendo cinéticas que no incluyen la formación de metabolitos o productos secundarios, ni mantenciones, ni el crecimiento diferenciado por cada tipo de sustrato presente.

Se desprende que la producción del proceso desarrollado depende en proporción directa del rendimiento considerado para la biomasa en el sustrato, por lo que es el parámetro al que más hay que entregarle holgura y analizar en posibles estudios posteriores.

Dimensionamiento

Las principales aproximaciones de los dimensionamientos corresponden a las características físicas de los medios y del alga (densidades y viscosidades) que se desconocen, principalmente por la falta de composición detallada del líquido lixiviado y del líquido depolimerizado. Además, existen otros parámetros como la densidad del alga o del hongo (se asume la densidad de *S. cerevisiae*) que son aproximados. Por lo tanto, se espera que sus valores sobre dimensionen las medidas entregadas en esta sección, pensando en que se utilizaron en su mayoría densidades de alga fresca para obtener los volúmenes de los equipos, y que los residuos de alga deberían tener densidades mayores a la considerada.

Para las dimensiones de las membranas, se presentaron los valores que fue posible obtener a partir de los catálogos de ALFA LAVAL para las dimensiones, los que corresponden a alturas y diámetros de los cilindros en espiral a utilizar. Por dicha razón, no se presentan valores relacionados al área de la membrana.

En cuanto a las potencias de agitación obtenidas con el criterio de escalamiento de mantención de la velocidad tangencial. Se considera que dicho criterio no es adecuado para escalamientos a nivel de metros cúbicos, dado que disminuye en gran proporción la velocidad de agitación y el cultivo realizado no corresponde a células animales que requieran ese tipo de cuidados. Por esto, se consideró la utilización de potencias de agitación tipo para el fermentador de gran tamaño.

Balances de energía

Para los balances de energía no fue posible calcular la entalpía de reacción de las reacciones de lixiviación y depolimerización llevadas a cabo en el reactor uno. Sin embargo, dadas las características del depolimerizado se puede asumir que la reacción es exotérmica y necesitará enfriamiento, dados los bajos niveles de calor emitido al ambiente en comparación con la liberación de calor de la reacción siguiente (sacarificación). Por esta razón, el calor calculado en la mantención de la depolimerización se encontraría más alejado de la realidad que el resto de los cálculos realizados y se espera que su incremento de calor sea similar al calculado para la sacarificación, al ser procesos de catabolismo de azúcares complejos.

Dado que el estudio se realizó bajo simplificaciones y que es importante mantener las condiciones de temperatura para el trabajo de las enzimas y de la levadura en su temperatura óptima de producción de SCP, es que se recalca la importancia del uso de sensores de temperatura presentes en los tanques, teniendo en cuenta que la mayoría de los catálogos de fermentadores y reactores industriales los incorporan (como el catálogo de la marca Inoxpa^[70]).

De la mano de los balances de energía se encuentra la utilización de servicios de enfriamiento, en relación a esto se considera que los volúmenes de agua utilizados en la teoría para mantener la temperatura son elevados, debido principalmente a los requerimientos necesarios para reducir la temperatura de las esterilizaciones de los fermentadores. Sin embargo, debido a que el análisis no considera costos, se podría pensar en incluir los enfriamientos en las chaquetas eléctricas, lo que permitiría disminuir el consumo de agua fresca, pero aumentaría el consumo eléctrico y de este modo el costo del proyecto. Otra opción para reducir el consumo de agua en sistemas de enfriamiento evaporativos sería la presentada en el estudio de Pfromm (2008)^[71] que describe la implementación de sistemas de enfriamiento “seco”. Esto consiste en que ventiladores accionados

eléctricamente dirijan aire ambiente sobre un intercambiador de calor para que el aire reciba el calor del proceso rechazado por el agua de enfriamiento circulando en un circuito cerrado. Los enfriamientos en seco esencialmente no consumirían agua, pero aumentarían los costos de capital quizás en 10 o 15 veces en comparación con el enfriamiento evaporativo. Por lo tanto, sería importante hacer un trade-off entre el consumo de agua y la sustentabilidad del proceso y el costo económico del proyecto.

Sensibilidad

En el apartado de análisis de sensibilidad se presentaron los principales resultados de la influencia de los parámetros cinéticos sobre la producción de proteína unicelular, los tiempos de procesamiento por lote y la dimensión de los equipos.

Estos análisis muestran que el rendimiento es el parámetro más importante por estudiar para lograr conocer la verdadera capacidad de producción de biomasa de la planta. La variación de este valor afecta de forma directamente proporcional y en la misma magnitud la productividad de la planta, independiente del cambio en la tasa de crecimiento específica máxima de *Y. lipolytica*.

Diagrama de flujo y de organización de la planta

El diseño del diagrama de flujo incorpora todos los equipos que se espera encontrar en la planta, a excepción de los sistemas de *piping* (tuberías y bombas) para trasladar las masas de un equipo a otro y los tanques de almacenamiento. Mientras que el *layout* presentado es menos riguroso, ya que está fuera de los objetivos de este estudio conocer la cantidad de personal o la estructura organizacional de la planta, información que permitiría definir correctamente la cantidad de oficinas, baños y zonas de seguridad. Sin embargo, su confección permite visualizar como sería una posible planta piloto y la relación de tamaño de los equipos con el resto de los objetos presentes en el diagrama, además de visualizar posibles espacios dentro de la planta en donde se puedan incluir más equipos.

6. Alcances

- Dada la falta de información de parámetros concretos de crecimiento de *Yarrowia lipolytica* en sustrato rico en alginato, que no pudieron ser estudiados en el laboratorio previo a la realización de este trabajo, es que el contenido del informe representa una aproximación del posible escalamiento a nivel industrial de la generación de la levadura para producir proteína unicelular y se espera que sea útil para estudios posteriores una vez que se investigue la capacidad del microorganismo de metabolizar el alga.
- Las dimensiones entregadas en el informe no tienen como objeto ser utilizadas directamente en la creación de una planta, si no que entregar una aproximación de la magnitud de los equipos que permitirían desarrollar el proceso, esperando corroborar la mayor cantidad de supuestos antes de llevarlo a un nivel de aplicación. En ese sentido, el presente trabajo permitiría tener en consideración las condiciones que se deben evaluar para lograr una producción industrial y serviría de insumo para luego corregir ciertos valores que se vayan definiendo.

7. Conclusiones

Fue posible realizar el diseño conceptual a escala industrial del cultivo de la levadura *Yarrowia lipolytica* ocupando como sustrato alga fresca *Macrocystis pyrifera*, con el fin de ser utilizado como proteína unicelular para alimento animal, cumpliéndose los objetivos planteados en el informe. Entre ellos: Se definen las operaciones unitarias del procesamiento de alga fresca, cultivo y obtención de proteína unicelular de *Y. lipolytica* con un diseño consistente en 10 operaciones unitarias, las que se dividen en tres líneas de producción. Además, se logra plantear un caso base de procesamiento de ~7.200 [kg alga/lote], obteniéndose un nuevo lote de biomasa cada 3 días.

Se establecen los balances de masa de cada equipo, determinándose la cantidad de insumos, productos y nivel de producción de proteína unicelular a partir del consumo de alga parda *M. pyrifera*. Entre estos destaca la producción de 204 [kg/lote] de proteína unicelular (SCP) con un rendimiento de 217,6 [g biomasa/kg alga seca], la producción de 3.219 [kg/lote] de alga depolimerizada y la producción de 293 [kg/lote] de DEHU en solución.

Se expone la posibilidad de optimizar parte de la cantidad de enzimas utilizadas por medio del uso de arreglos de exo y endo alginato liasas, las que permitan mejorar los niveles de sacarificación del alga.

También, se dimensionan los equipos seleccionados en el diseño que compondrán la planta productora de proteína unicelular, con reactores que van desde los 15,8 [m^3] hasta los 22,4 [m^3] y fermentadores que van desde los 0,43 [m^3] a los 38,7 [m^3], junto con dos centrifugas tubulares de 15 [cm] de diámetro y 75 [cm] de largo y un secador spray de 1,05[m] de diámetro.

Se determinan las potencias de agitación necesarias para cada uno de los equipos agitados por medio de criterios de escalamiento, siendo el criterio de velocidad tangencial inadecuado para escalas de decenas de metros cúbicos, para lo que se utiliza la potencia típica.

Se determinan los requerimientos energéticos de la planta productora de SCP a partir de alga fresca, definiendo el tipo de intercambiador o resistencia eléctrica para cada equipo que permita seguir las condiciones de operación, más la cantidad de servicio de agua (cinco corrientes) y de refrigerante (una corriente) requerido por lote, igual a 59.831 [m^3 /lote] y 178.921 [kg/lote] respectivamente.

Finalmente, se logra determinar el tamaño y disposición (layout) de una planta productora de proteína unicelular a partir de alga fresca, obteniéndose un área tentativa de 2.000 [m^2] que considera oficinas administrativas, zonas de seguridad, estacionamiento, bodegas, camarines y la zona de planta productiva.

En definitiva, fue posible desarrollar el diseño de un proceso de producción industrial de *Y. lipolytica* con datos bibliográficos de crecimiento en sustrato diferente al algal. Sin embargo, no se puede asegurar la factibilidad del proceso hasta que no se conozcan parámetros cinéticos de *Y. lipolytica* en sustrato con monómeros de alginato. Siendo el parámetro de rendimiento de biomasa en sustrato $\left(Y\left(\frac{x}{s}\right)\right)$ crítico para la producción de la planta.

8. Recomendaciones

Debido a la gran cantidad de supuestos tomados por el desconocimiento de valores propios de *Y. lipolytica* creciendo en sustrato algal rico en alginato, se recomienda y proyecta la investigación en laboratorio del crecimiento de la levadura en variados residuos de alga y tipos de pretratamiento. Para así tener certeza de la capacidad del *Y. lipolytica* de metabolizar los monómeros del alginato y conocer la factibilidad del proceso analizando sus parámetros cinéticos. En este sentido, los valores más inciertos que deben estudiarse son:

- Perfil de crecimiento del hongo estudiado en el sustrato algal (duración de la fase lag, exponencial y estacionaria).
- Punto del crecimiento al que se obtiene el mayor número de proteínas intracelulares.
- Parámetros cinéticos del hongo en el sustrato (rendimiento en monómeros de alginato y tasa máxima de crecimiento).

Luego de conocer la factibilidad del crecimiento del hongo en el sustrato algal, se proyecta una posible modificación genética de la levadura con el fin de poder prescindir de las cantidades de enzimas utilizadas en el proceso y mejorar los niveles de rendimiento en el sustrato.

Finalmente, dados los altos niveles de uso de agua en el tratamiento y la mantención del proceso, se recomienda evaluar el uso de agua de mar, tanto para medios de cultivo como para servicios o un cambio en el tipo de flujo refrigerante considerado para las mantenciones, junto con un posible estudio de integraciones energéticas que se encuentra fuera de los alcances de este estudio. Lo que permitiría reducir los niveles de uso de agua fresca en el proceso global.

9. Bibliografía

- [1] BALINA, K., FRANCESCO, R. y BLUMBERGA, D. 2017. Seaweed biorefinery concept for sustainable use of marine resources. *Energy Procedia* 128: 504–511.
- [2] LEE, R.A. y LAVOIE, J.M. 2019. From first- to third-generation biofuels: Challenges of producing a commodity from a biomass of increasing complexity. *Animal Frontiers* 3(2):6-11.
- [3] RITALA, A. *et al.* 2017. Single Cell Protein- State-of-the-Art, Industrial landscape and patents 2001-2016. *Frontiers in Microbiology* 8:2009.
- [4] BOLAND, M.J. *et al.* 2013. The future supply of animal derived protein for human consumption. *Trends in Food Science & Technology* 29: 62-73.
- [5] FAOSTAT. Livestock primary data. [en línea] <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL>> [consulta: 15 enero 2021]
- [6] KADIM, I.T. *et al.* 2015. Cultured meat from muscle stem cells: a review of challenges and prospects. *Journal of Integrative Agriculture* 14 (2): 222-233.
- [7] GHASEMI, Y., RASOUL-AMINI, S., MOROWYAT, M.H. Algae for the production of SCP, in *Biochemistry Research trends. Bioprocess Sciences and Technology*. Nueva York, ed. Liang M.-T, 2011. pp.163–184.
- [8] BOURDICHON, F. *et al.* 2012. Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. *International Journal of Food Microbiology* 156 (3): 301-301.
- [9] LANDETA, C., MUÑOZ, R., BLANCO, A., LIENQUEO, M.E. 2021. Valorization and upgrading of the nutritional value of seaweed and seaweed waste using the marine fungi *Paradendryphiella salina* to produce mycoprotein. *Algal Research* 53.
- [10] LIU, B. *et al.* 2013. Towards industrially feasible treatment of potato starch processing waste by mixed cultures. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 171: 1001-1010.
- [11] LIU, B. *et al.* 2014. Production of single-cell protein with two-step fermentation for treatment of potato starch processing waste. *Cellulose* 21: 3636-3645.
- [12] YADAV, J.S.S. 2014. Mixed culture of *Kluyveromyces marxianus* and *Candida krusei* for single-cell protein production and organic load removal from whey. *Bioresource Technology* 164: 119-127.
- [13] DUARTE, L. *et al.* 2008. Yeast Biomass Production in Brewery's Spent Grains Hemicellulosic Hydrolyzate. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 148: 119-129.
- [14] HASHEM, M. *et al.* 2014. Production of single-cell protein from wasted date fruits by *Hanseniaspora uvarum* KKUY-0084 and *Zygosaccharomyces rouxii* KKUY-0157. *Annals of Microbiology* 64: 1505-1511.
- [15] YADAV, J.S.S. 2016. Food-grade single-cell protein production, characterization and ultrafiltration recovery of residual fermented whey proteins from whey. *Food and Bioproducts Processing* 99: 156-165.
- [16] RHISHIPAL, R. y PHILIP, R. 1998. Selection of marine yeasts for the generation of single cell protein from prawn-shell waste. *Bioresource Technology* 65: 255-256.

- [17] VALENTINO, M.J.G., GOORCHIAN, H., HAIJHOSAINI, R. 2016. Single cell protein potential of endophytic fungi associated with bamboo using rice bran as substrate. *Advances in Applied Science Research* 7: 68-72.
- [18] AHMADI A.R. *et al.* 2010. Determination of the amount of protein and amino acids extracted from the microbial protein (SCP) of lignocellulosic wastes. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 13: 355-361.
- [19] AGGELOPOULUS T. *et al.* 2014. Solid state fermentation of food waste mixtures for single cell protein, aroma volatiles and fat production. *Food Chemistry* 145: 710-716.
- [20] SISMAN T. *et al.* 2012. Single-cell protein as an alternative food for zebrafish, *Danio rerio*: a toxicological assessment. *Toxicology and Industrial Health* 29: 792-799.
- [21] DE GREGORIO *et al.* 2002. SCP and crude pectinase production by slurry-state fermentation of lemon pulps. *Bioresource Technology* 83: 89-94.
- [22] CUI W. *et al.* 2011. Direct conversion of inulin into single cell protein by the engineered *Yarrowia lipolytica* carrying inulinase gene. *Process Biochemistry* 46: 1442-1448.
- [23] ZUNIGA-JARA, S. y SORIA-BARRETO, K. 2017. Prospects for the commercial cultivation of macroalgae in northern Chile: the case of *Chondracanthus chamissoi* and *Lessonia trabeculata*. *Journal of Applied Phycology* 30:1135–1147.
- [24] SERNAPECA. Estadísticas. [en línea] <<http://www.sernapesca.cl/informes/estadisticas>> [consulta: 28 septiembre 2020]
- [25] JACH M. *et al.* 2020. Statistical evaluation of growth parameters in biofuel waste as a culture medium for improved production of single cell protein and amino acids by *Yarrowia lipolytica*. *AMB Express* 10(1): 35-35.
- [26] VEGA, R. y DOMÍNGUEZ, A. 1986. Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Yarrowia lipolytica*. *Archives of Microbiology* 144(2): 124-130.
- [27] MADZAK, C. 2015. *Yarrowia lipolytica*: recent achievements in heterologous protein expression and pathway engineering. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:4559–4577.
- [28] GROENEWALD, M. *et al.* 2013. *Yarrowia lipolytica*: Safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. *Critical Reviews in Microbiology* 40(3): 187-206.
- [29] CZECH, A. *et al.* 2016. Nutritional value of *Yarrowia lipolytica* yeast and its effect on growth performance indicators in piglets. *Ann. Anim. Sci.* 16 (4): 1091–1100.
- [30] GUERRERO, M. Figura 1. [en línea] <https://www.researchgate.net/figure/Morphology-of-Yarrowia-lipolytica-P01A-strain-grown-as-yeast-in-YNB-glucose-medium_fig6_287293867> [consulta: 11 enero 2020]
- [31] DOBROWOLSKI, A. *et al.* 2019. Lipid Production From Waste Materials in Seawater-Based Medium by the Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Frontiers in Microbiology* 10: (547).
- [32] PATSIOS, S. *et al.* 2020. Sustainable Animal Feed Protein through the Cultivation of *Yarrowia Lipolytica* on Agro-Industrial Wastes and by-Products. *Sustainability* 12(4):1398.
- [33] JUSZCZYK, P. *et al.* 2013. Biomass production by novel strains of *Yarrowia lipolytica* using raw glycerol, derived from biodiesel production. *Bioresource Technology* 137:124–131.

- [34] JACH, M. *et al.* 2017. *Yarrowia lipolytica* Grown on Biofuel Waste as a Source of Single Cell Protein and Essential Amino Acids for Human Diet. Saudi J. Med. Pharm. Sci. 3(12B):1344-1351.
- [35] ADEDAYO, M.R. *et al.* 2011. Single cell proteins: as nutritional enhancer. Advances in Applied Science Research 2(5): 396-409.
- [36] ATHENSTAEDT, K. *et al.* 2006. Lipid particle composition of the yeast *Yarrowia lipolytica* depends on the carbon source. Proteomics 6(5): 1450-1459.
- [37] PAPANIKOLAOU, S. *et al.* 2007. Industrial derivative of tallow: a promising renewable substrate for microbial lipid, single-cell protein and lipase production by *Yarrowia lipolytica*. Electronic Journal of Biotechnology 10(3).
- [38] DOS SANTOS, E. *et al.* 2012. Evaluation of the composition of culture medium for yeast biomass production using raw glycerol from biodiesel synthesis. Brazilian Journal of Microbiology: 432-440.
- [39] KORNEEVA, O.S. *et al.* 2016. La influencia de las condiciones de cultivo en el crecimiento de la biomasa. *Yarrowia lipolytica* - productor de proteína de alimentación. Boletín de la Universidad Estatal de Tecnologías de Ingeniería de Voronezh 1:182-185.
- [40] YAN, J. *et al.* 2018. Engineering *Yarrowia lipolytica* to Simultaneously Produce Lipase and Single Cell Protein from Agro-industrial Wastes for Feed. Scientific Reports 8(1): 758–10.
- [41] ZHAO, M-X. *et al.* 2013. The simultaneous production of single-cell protein and a recombinant antibacterial peptide by expression of an antibacterial peptide gene in *Yarrowia lipolytica*. Process Biochemistry 48:212-217.
- [42] TAKAGI, T. *et al.* 2017. Construction of bioengineered yeast platform for direct bioethanol production from alginate and mannitol. Appl Microbiol Biotechnol. 101: 6627-6636.
- [43] KARASU-YALCIN, S., TIJEN, B. M., YESIM, O. Z. 2010. Effects of Different Fermentation Conditions on Growth and Citric Acid Production Kinetics of two *Yarrowia lipolytica* Strains. Chem. Biochem. Eng. 24 (3): 247-360.
- [44] WORKMAN, M., HOLT, P., THYKAER, J. 2013. Comparing cellular performance of *Yarrowia lipolytica* during growth on glucose and glycerol in submerged cultivations. AMB Express: 3:58.
- [45] ROBLES-RODRIGUEZ, C. *et al.* 2018. Modeling and optimization of lipid accumulation by *Yarrowia lipolytica* from glucose under nitrogen depletion conditions. Biotechnology and bioengineering 115:1137–1151.
- [46] GUO, Z-P. *et al.* 2017. Expressing accessory proteins in cellulolytic *Yarrowia lipolytica* to improve the conversion yield of recalcitrant cellulose. Biotechnology for Biofuels 10:298.
- [47] LI, S-Y. *et al.* 2019. Combined enzymatic hydrolysis and selective fermentation for green production of alginate oligosaccharides from *Laminaria japonica*. Bioresource Technology 281:84–89.

- [48] RAVANAL, M. C. *et al.* 2017. The role of alginate lyases in the enzymatic saccharification of brown macroalgae, *Macrocystis pyrifera* and *Saccharina latissimi*. *Algal Research* 26: 287-293.
- [49] MUÑOZ Muñoz, Rosa de Los Angeles. Cultivo de hongos marinos a partir de residuos de la industria algal rica en alginato. Tesis (Ingeniería Civil Química y en Biotecnología). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, 2018. 64 h.
- [50] BALAR, N. *et al.* 2019. Variation in the proximate composition of edible marine macroalga *Ulva rigida* collected from different coastal zones of India. *Journal of Food Science and Technology* 56(10): 4749-4755.
- [51] GOUR, S. y RUMA, P. 2011. Biochemical composition and lipid characterization of marine green alga *Ulva rigida*- a nutritional approach. *Journal of Algal Biomass Utilization* 2 (4): 10– 13.
- [52] SUBSECRETARIA DE PESCA Y ACUICULTURA. Alga huiro flotador [en línea] <<http://www.subpesca.cl/portal/616/w3-article-85025.html#presentacion>> [consulta: 20 octubre 2020]
- [53] RAVANAL, M. C. *et al.* 2016. Comparison of different types of pretreatment and enzymatic saccharification of *Macrocystis pyrifera* for the production of biofuel. *Algal Research* 13: 141-147.
- [54] LEYTON, A, MIKKOLA, JP., LIENQUEO, M. 2017. Improvement in Carbohydrate and Phlorotannin Extraction from *Macrocystis Pyrifera* Using Carbohydrate Active Enzyme from Marine *Alternaria Sp.* as Pretreatment. *J Appl Phycol* 29: 2039-2048.
- [55] BUSCHMANN, A. *et al.* 2014. The Status of Kelp Exploitation and Marine Agronomy, with Emphasis on *Macrocystis Pyrifera*, in Chile. *Advances in Botanical Research* 71(1): 161-188.
- [56] CAMUS, C. *et al.* 2016. Scaling up bioethanol production from the farmed brown macroalga *Macrocystis pyrifera* in Chile. *Biofuels, bioproducts and biorefining* 10:673-685.
- [57] MANSILLA, Andrés. “Bases biológicas de manejo de macroalgas en la XII región”. Magallanes, Chile. Universidad de Magallanes, 2007. 352 h.
- [58] TSIGIE, Y.A. *et al.* 2013. Catalyst-free biodiesel preparation from wet *Yarrowia lipolytica* P01g biomass under subcritical condition. *Fuel Processing Technology* 115: 50–56.
- [59] HEDENSKOG, G. y MOGREN, H. 1973. Some methods for processing of Single- Cell protein. *Biotechnology and bioengineering* 15: 129-142.
- [60] SHARMA, S. y HORN, S. 2016. Enzymatic saccharification of brown seaweed for production of fermentable sugars. *Bioresource Technology* 213:155-161.
- [61] ALFA SAVAL. Alfa Laval UF-pHt™ spiral membranes. [en línea] <<https://www.alfalaval.com/globalassets/documents/products/separation/membranes/spiral-membranes/uf-spiral/uf-pht-spiral-membranes-200000298-en.pdf>> [consulta: 20 septiembre 2020]
- [62] ALFA SAVAL. Alfa Laval NF and RO spiral membranes. [en línea] <<https://www.alfalaval.com/globalassets/documents/products/separation/membranes/spiral->

membranes/nf-spiral/nf-and-ro-spiral-membranes_200000088_en.pdf> [consulta: 20 septiembre 2020]

[63] PAYE, J. *et al.* 2016. Biological lignocellulose solubilization: comparative evaluation of biocatalysts and enhancement via cotreatment. *Biotechnology for biofuels*, 9:8.

[64] MEYER, H.P., MINAS, W. y SCHMIDHALTER, D. *Industrial Scale Fermentation*. [en línea] Wiley.VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. <https://application.wiley-vch.de/books/sample/3527341811_c01.pdf> [consulta: 21 enero 2021].

[65] SYSBIOTECH. CEPA Z 101/Z101 GP. [en línea] <<https://en.sysbiotech.at/cepa-z-101-z101-gp/>> [consulta: 18 enero 2021].

[66] TÉCNICA DE FLUIDOS. Catálogo de bombas. [en línea] <<https://www.tecnicafluidos.es/downloads/2/tecnica-de-fluidos-catalogo-bombas.pdf>> [consulta: 18 enero 2021].

[67] BCN. Decreto 594| Aprueba reglamento sobre condiciones sanitarias y ambientales básicas en los lugares de trabajo. [en línea] <<https://www.bcn.cl/leychile/navegar?idNorma=167766&idParte=9311178&idVersion=>>> [consulta: 28 octubre 2020]

[68] BCN. Decreto 10| Aprueba reglamentos de calderas, autoclaves y equipos que utilizan vapor de agua. [en línea] <<https://www.bcn.cl/leychile/navegar?idNorma=1055319>> [consulta: 28 octubre 2020]

[69] GIMPEL, J. *et al.* 2018. Saccharification of Brown Macroalgae Using an Arsenal of Recombinant Alginate Lyases: Potential Application in the Biorefinery Process. *J. Microbiol. Biotechnol.* 28(10):1671-1682.

[70] INOXPA. Equipo de fermentación microbiana- fermentador industrial. [en línea] <<https://www.inoxpa.es/productos/equipos/mas-equipos/fermentador-industrial>> [consulta: 21 enero 2021]

[71] PFROMM, P.H. 2008. The Minimum Water Consumption of Ethanol Production via Biomass Fermentation. *The Open Chemical Engineering Journal* 2:1-5.

[72] VATSAL, A., ZINJARDE, S., RAVI, A. 2011. Growth of a tropical marine yeast *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 on bromoalkanes: relevance of cell size and cell surface properties. *Yeast* 28: 721–732.

[73] BALDWIN, W. y KUBITSCHKEH. 1984. Buoyant density variation during cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology* 158(2):701-704.

[74] MARTÍNEZ, Liliana Ángeles. Dimensionamiento y simulación de un secador por aspersión de nivel piloto. Tesis (Maestro en ciencias en bioprocesos). México D.F. Instituto politécnico nacional. Unidad profesional interdisciplinaria de biotecnología, 2009. 152 h.

[75] ISSU. Balance de energía del paneton [en línea] <https://issuu.com/andersonticonaargandonaa/docs/balance_de_energ__a_del_paneton.doc > [consulta: 01 octubre 2020]

[76] Worldmeteo. El tiempo en Puerto Montt, Chile. [en línea] <<https://www.worldmeteo.info/es/america-del-sur/chile/puerto-montt/tiempo-100927/>> [consulta: 15 octubre 2020]

[77] Michaelis smith engineers ltd. Approximate viscosities of some common liquids [en línea] <<https://www.michael-smith-engineers.co.uk/resources/useful-info/approximate-viscosities-of-common-liquids-by-type>> [consulta: 29 septiembre 2020]

10. Anexos

10.1 Anexo 1: Estadísticas sernapesca año 2017

A continuación, en las Tablas A1 y A2, se presentan estadísticas por región y mes del desembarco de algas en el año 2017.

Tabla A 1: Desembarque total de algas año 2017 por especie y región (Fuente: sernapesca (2017))

ESPECIE	XV	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	XIV	X	XI	XII	RM	AI	BF	Total
ALGAS MIXTAS	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
CAROLA	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	2
CHASCA	-	-	-	-	27	7	186	5	2	-	-	1	-	-	-	-	-	228
CHICOREA DE MAR	-	-	-	185	68	-	-	-	808	-	-	209	-	-	-	-	-	1.270
COCHAYUYO	-	-	-	-	570	138	1.825	732	2.276	29	991	2.633	-	-	-	-	-	9.194
HAEMATOCOCCUS	-	29	-	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	35
HUIRO	31	341	1.272	9.986	3.531	2.334	206	213	167	12	39	11.735	1	2	-	-	-	29.870
HUIRO NEGRO	163	16.030	55.266	86.078	31.502	5.070	569	834	7.590	-	-	747	1	-	-	-	-	203.850
HUIRO PALO	21	452	4.947	16.965	31.622	2.434	-	110	358	-	1	8	-	-	-	-	-	56.918
LECHUGUILLA	-	-	-	-	81	-	-	-	-	-	-	37	-	-	-	-	-	118
LIQUEN GOMOSO	-	-	-	610	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	610
LUCHE	-	-	-	-	9	-	-	27	62	-	10	36	14	-	-	-	-	158
LUGA CUCHARA	-	-	-	-	-	12	352	104	492	-	104	363	-	-	-	-	-	1.427
LUGA NEGRA	-	-	-	-	-	-	2	1	3.090	1	419	17.745	2	-	-	-	-	21.260
LUGA-ROJA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	9.742	1.923	8.390	-	-	-	20.058
PELILLO	-	-	843	1.975	4.796	4	-	12	896	-	562	55.001	-	-	-	-	-	64.089
SPIRULINA	-	39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	39

Tabla A 2: Desembarque total de algas año 2017 por especie y mes (Fuente: sernapesca, 2017)

ESPECIE	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC	Total
ALGAS MIXTAS	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	4
CAROLA	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2
CHASCA	64	28	16	17	23	-	-	-	5	17	17	41	228
CHICOREA DE MAR	131	136	226	118	49	18	17	52	86	174	146	117	1.270
COCHAYUYO	1.582	1.170	1.248	946	495	202	167	243	384	452	711	1.594	9.194
HAEMATOCOCCUS	4	8	7	5	3	1	1	2	-	1	2	1	35
HUIRO	3.726	4.179	2.709	2.884	2.772	2.052	1.862	1.297	948	2.146	2.723	2.572	29.870
HUIRO NEGRO O CHASCON	18.989	20.915	23.774	18.753	13.095	12.201	14.643	14.533	15.086	15.913	15.363	20.585	203.850
HUIRO PALO	4.994	4.839	3.743	4.482	3.421	2.317	5.467	4.618	3.455	7.613	8.068	3.901	56.918
LECHUGUILLA	30	38	20	2	2	3	5	4	3	4	4	3	118
LIQUEN GOMOSO	-	-	-	-	30	52	54	82	89	60	100	143	610
LUCHE	9	9	10	24	28	14	12	9	11	10	13	9	158
LUGA CUCHARA O CORTA	345	271	278	163	29	16	1	6	7	17	60	234	1.427
LUGA NEGRA O CRESPA	4.806	6.098	4.539	2.842	1.408	578	132	3	4	10	117	723	21.260
LUGA-ROJA	2.409	2.882	2.923	1.536	856	135	-	1	555	1.921	3.470	3.370	20.058
PELILLO	8.741	5.804	5.768	4.435	3.231	3.090	3.064	3.443	2.969	4.822	9.655	9.067	64.089
SPIRULINA	-	-	-	-	13	1	3	4	2	6	6	4	39

10.2 Anexo 2: Caracterización de organismos en frondas de *M. pyrifera*

Se utilizan los datos presentados en el estudio de Mansilla para determinar la cantidad de gramos de organismos presentes en 10 [gr] de alga. Para esto, se toman en consideración sólo los datos promedio del mes de otoño y de las zonas medias de las frondas para una caracterización general de un individuo de *M. pyrifera*.

Se decide obtener el promedio de masa de individuos de cuatro praderas diferentes de la XII región, estas son Isla London, Isla Carlos III, Seno Duntze y Bahía El Águila. Los datos utilizados se muestran en la Tabla A3 y en la Figura A1.

Tabla A 3: Cantidad de individuos encontrados en N segmentos de 10 gramos, según ubicación geográfica, mes del año y zona de la fronda desde donde se extrajo.

LONDON					
		INVIERNO	PRIMAVERA	VERANO	OTOÑO
	N		10		9, 9, 8
	APICAL		8 (73) 875		9 (67) 179
FRONDAS	MEDIO		45 (145) 427		0 (111) 555
	BASAL		21 (62) 419		2 (42) 103

CARLOS III					
		INVIERNO	PRIMAVERA	VERANO	OTOÑO
	N		10	10	10
	APICAL		2 (16) 52	8 (20) 28	9 (105) 274
FRONDAS	MEDIO		6 (51) 143	7 (31) 60	17 (243) 704
	BASAL		29 (84) 367	6 (53) 197	16 (91) 270

DUNTZE					
		INVIERNO	PRIMAVERA	VERANO	OTOÑO
	N		10	9	10, 10, 9
	APICAL		11 (35) 96	6 (15) 38	3 (34) 86
FRONDAS	MEDIO		14 (60) 147		0 (21) 59
	BASAL		6 (36) 114		3 (15) 33

B. AGUILA					
			PRIMAVERA	VERANO	OTOÑO
	N		10		10
	APICAL		0 (27) 81		9 (45) 106
FRONDAS	MEDIO		10 (38) 57		11 (96) 219
	BASAL		15 (124) 1015		8 (56) 167

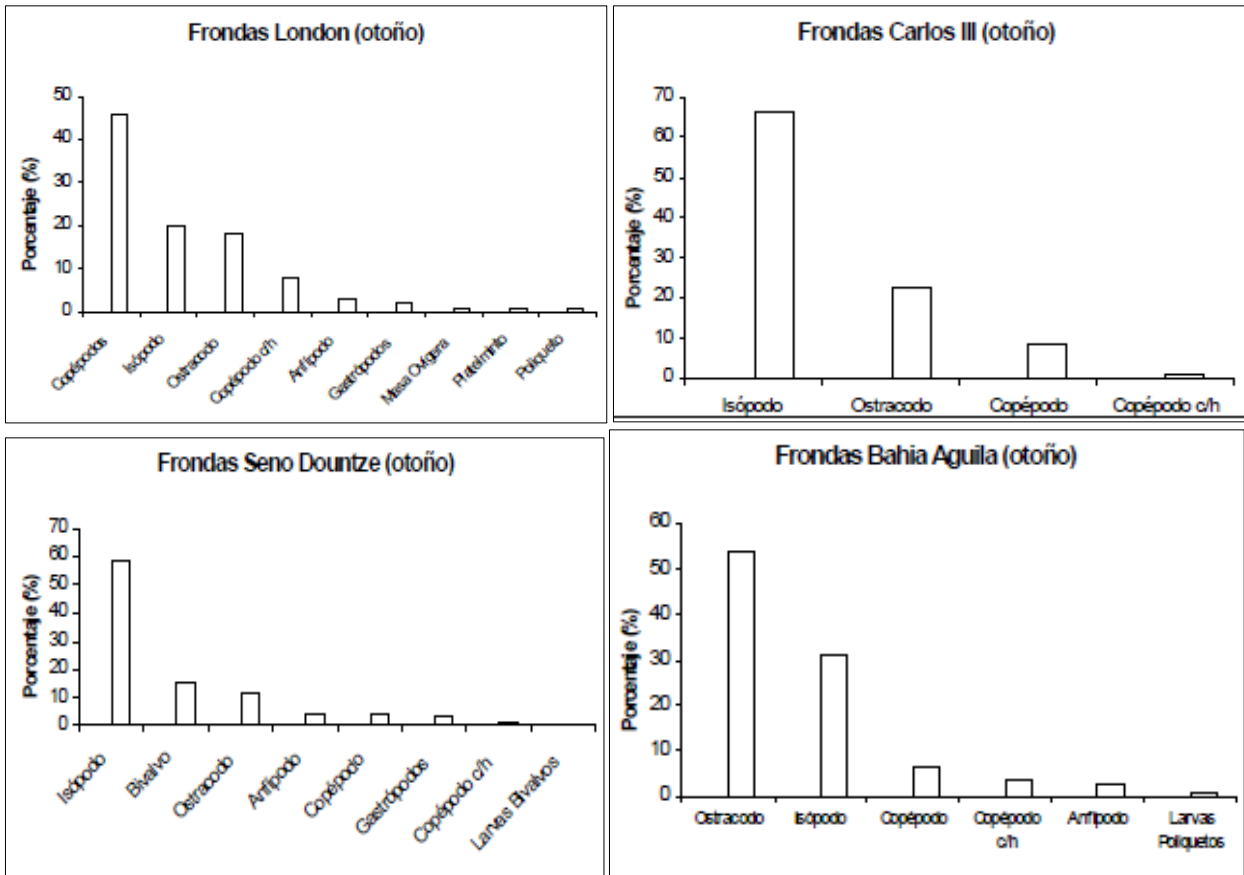


Figura A 1: Abundancia porcentual de organismos en el total de organismos encontrados en el mes de otoño, por ubicación geográfica.

El último dato que conocer para obtener la caracterización de organismos en el alga es la masa promedio de cada tipo de organismo presente. Para esto se realiza una búsqueda bibliográfica, obteniendo los siguientes valores.

Tabla A 4: Peso de organismos presentes en algas de la XII región.

Peso promedio por individuo (gr)	
Organismo	gr/individuo
Copépodo	0,0001152
Isópodo	0,008
Ostracodo	0,00006
Artrópodo	0,38
Gastropodo	3
Molusco gaimardia	9

Con los datos presentados se calcula el número de organismos cada 10[g] de alga:

$$N^{\circ} \text{ organismos en } 10 [g] = \frac{N^{\circ} \text{ de organismos promedio}}{N} \quad (1)$$

También el número de organismos de cada especie:

$$N^{\circ} \text{ especie } x = N^{\circ} \text{ organismos en } 10 [g] * \% \text{ abundancia especie } x \quad (2)$$

Y finalmente la cantidad de gramos de cada especie en 10 [g] de alga:

$$\frac{\text{gr especie } x}{10 [gr] \text{alga}} = N^{\circ} \text{ especie } x * [g] \text{ por individuo} \quad (3)$$

En la Tabla A5 se ordenan los datos manejados obteniendo una cantidad promedio de 1,2 $\left[\frac{[gr] \text{organismos}}{10 [gr] \text{alga}} \right]$.

Tabla A 5: Cálculo de la cantidad de gramos de organismos cada 10 gramos de alga

Organismo/región	Isla London			Isla Carlos III			Seno Duntze			Bahía El Águila		
	%	N° ind.	gr/10 gr alga	%	N° ind	gr/10 gr alga	%	N° ind	gr/10 gr alga	%	N° ind	gr/10 gr alga
Total	100	12,3	-	100	24,3	-	100	2,1	-	100	9,6	-
Copedópodo	54	6,66	0,0008	12	2,92	0	4	0,084	1E-05	11	1,06	1E-04
Isópodo	21	2,59	0,0207	65	15,8	0,13	59	1,239	0,01	31	2,98	0,024
Ostracodo	18	2,22	0,0001	23	5,59	0	13	0,273	2E-05	55	5,28	3E-04
Anfípodo	4	0,49	0,1875	0	0	0	5	0,105	0,04	3	0,29	0,109
Gastropodo	3	0,37	1,11	0	0	0	3	0,063	0,189	0	0	0
Molusco gamardia	0	0	0	0	0	0	16	0,336	3,024	0	0	0
Peso en 10 gramos de alga			1,3			0,1			3,3			0,1
Peso promedio en 10 gr alga	1,2											

10.3 Anexo3: Tiempos de procesamiento y caso base

A continuación, en la Figura A2 se presenta la distribución de los tiempos de trabajo estimados para cada etapa del proceso, en ella se observa que es posible obtener un nuevo lote cada 3 días. Con este valor, es posible calcular el caso base de producción.

		Tiempos de trabajo														
Proceso/Días		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Pre-cultivo				■	■		■	■		■	■		■	■		
Lavado	■							■				■				
Molienda				■				■				■				
Lixiviación ácida																
Filtración por membranas	■															
Depolimerización		■	■			■	■		■	■		■	■			
Sedimentación			■							■			■			
Sacarificación				■				■			■			■		
Fermentación					■	■			■	■		■	■		■	
Centrifugación							■			■			■			■
Secado								■			■			■		■

Figura A 2: Distribución de los tiempos de trabajo de cada equipo para conocer el tiempo de procesamiento por lote.

En primer lugar, se calcula la cantidad total de alga a procesar al año, considerando una producción anual de 200 [ton/ha] en 4 hectáreas:

$$200 \left[\frac{t}{ha * año} \right] * 4 [ha] = 800 \left[\frac{t}{año} \right] \quad (1)$$

Luego, considerando jornadas de trabajo 7 días a la semana, un año de 365 días y un mes (30 días) de paro, se estima que el tiempo de trabajo anual es de 335 días. Con este valor se obtiene la cantidad de lotes a procesar al año. Cabe destacar que se deben considerar solo los lotes enteros procesados:

$$\frac{335 \left[\frac{días}{año} \right]}{3 \left[\frac{días}{lote} \right]} = 111,6 \left[\frac{lote}{año} \right] = 111 \left[\frac{lotes}{año} \right] \quad (2)$$

Finalmente, se calculan los kilos a procesar por lote, dividiendo la producción anual en los lotes totales como sigue:

$$\frac{800 \left[\frac{t}{año} \right]}{111 \left[\frac{lotes}{año} \right]} = 7,207 \left[\frac{t}{lote} \right] * 1000 \left[\frac{kg}{t} \right] = 7.207 \left[\frac{kg}{lote} \right] \quad (3)$$

10.4 Anexo 4: Balances de masa

A continuación, se presentan las memorias de cálculo realizada para obtener los balances de masa por equipo.

10.4.1 Lavado

La masa de agua (F2) necesaria para lavar el alga se obtiene asumiendo una razón 1:1 en volumen. Para esto, es necesario calcular el volumen de la masa de alga:

$$V_{F1} = V_{F2} \quad (1)$$

$$V_{F1} = \frac{F1}{\rho_{alga}} \quad (2)$$

$$V_{F1} = 6.767,1 [L]$$

Donde:

V_{F1} : volumen de la masa de alga fresca

ρ_{alga} : densidad del alga fresca = $1,15 \left[\frac{kg}{L} \right]$

F1: masa del alga del caso base = 7.207 [kg]

Luego, se calcula F2 asumiendo la densidad del agua:

$$F2 = V_{F2} * \rho_{agua} \quad (2)$$

$$F2 = 6.767,1 [kg]$$

Donde:

F2: masa de agua potable

ρ_{agua} : densidad del agua = $1,0 \left[\frac{kg}{L} \right]$

Después, se calcula la cantidad de alga y de sólido en F1, sabiendo que la concentración de sólidos en el alga fresca es de 12,1%:

$$F1_{sólido} = x_{sólido} * F1 \quad (3)$$

$$F1_{sólido} = 872,5$$

$$F1_{alga} = (1 - x_{sólido}) * F1 \quad (4)$$

$$F1_{alga} = 6.334,7 [kg]$$

Se realiza el balance de sólido:

$$F1_{sólido} = F3_{sólido} + F4_{sólido} \quad (5)$$

El balance de alga:

$$F1_{alga} = F4_{alga} \quad (6)$$

Y el balance de agua:

$$F2 = F3_{agua} \quad (7)$$

Sabiendo que en el agua residual (F3) se retira un 75% de los sólidos presentes y que el resto de los sólidos se mantiene en el alga lavada (F4), se tiene:

$$F3_{sólido} = 0,75 * F1_{sólido} \quad (8)$$

$$F3_{sólido} = 654,4 [kg]$$

$$F4_{sólido} = F1_{sólido} - F3_{sólido} \quad (9)$$

$$F4_{sólido} = 218,13 [kg]$$

Finalmente,

$$F3 = F3_{agua} + F3_{sólido} \quad (10)$$

$$F3 = 6267,1 + 654,4 = 6.921,5 [kg]$$

$$F4 = F4_{alga} + F4_{sólido} \quad (11)$$

$$F4 = 6334,7 + 218,13 = 6.552,8 [kg]$$

10.4.2 Molienda

Realizando el balance de masa en el equipo se tiene que:

$$F4 = F5 + F6 \quad (1)$$

Asumiendo que el 85% de la composición del alga es agua:

$$F4_{agua} = 0,85 * F4 \quad (2)$$

Se asume que un 1% de la masa de agua del alga se pierde en el proceso (agua residual=F5):

$$F5 = 0,1 * F4_{agua} \quad (3)$$

$$F5 = 55,7 [kg]$$

Finalmente, la masa de alga molida (F6) es:

$$F6 = F4 - F5 \quad (4)$$

$$F6 = 6.497,1 [kg]$$

10.4.3 Lixiviación ácida

Se utiliza una proporción de HCl 0,3% de 2 [L/kg de alga] por cada etapa de lixiviado:

$$V_{F7} = 2 \left[\frac{L}{kg \text{ alga}} \right] * F6 * 3 \text{ etapas} \quad (1)$$

$$V_{F7} = 38.982,6 [L]$$

Para calcular F7, se asume que la densidad del HCl 0,3% es igual a la densidad del agua:

$$F_7 = V_{F7} * \rho_{\text{agua}} \quad (2)$$

$$F_7 = 38.982,6 [kg]$$

Además, la composición de F7 es:

$$F_7 = F7_{HCl} + F7_{\text{agua destilada}} \quad (3)$$

Si la concentración de HCl es de un 0,3% se calcula $F7_{HCl}$ como:

$$0,003 * F7 = F7_{HCl} \quad (4)$$

$$F7_{HCl} = 116,9 [kg]$$

Y, por lo tanto, despejando de (3) se obtiene:

$$F7_{\text{agua destilada}} = 38.865,6 [kg]$$

Para calcular la masa de alga lixiviada, se ocupa el rendimiento en peso del alga molida, que corresponde a un 48%:

$$F8 = 0,48 * F6 \quad (5)$$

$$F8 = 3.118,6 [kg]$$

Realizando el balance de masa global en el equipo y despejando F9 se obtiene que la masa de líquido lixiviado obtenida es:

$$F6 + F7 = F8 + F9 \quad (6)$$

$$F9 = 42.361,1 [kg]$$

Finalmente, se conoce que el % de manitol en el líquido lixiviado es de un 0,63%. Por lo tanto,

$$F9_{\text{manitol}} = 0,0063 * F9 \quad (7)$$

$$F9_{\text{manitol}} = 266,9 [kg]$$

10.4.4 Separación por membrana

En la separación por membrana, se asume que en cada etapa se elimina un 10% de la masa de entrada en el concentrado. Por lo tanto, la masa de permeado en cada etapa es un 90% de la masa de permeado de la etapa anterior:

$$F9A = F9 \quad (1)$$

$$F9B = F9A * 0,9 \quad (2)$$

$$F9B = 38.125,0 [kg]$$

$$F9C = F9B * 0,9 \quad (3)$$

$$F9C = 34.312,5 [kg]$$

$$F9D = F9C * 0,9 \quad (4)$$

$$F9D = 30.881,2 [kg]$$

Por lo tanto, las masas de concentrado son los siguientes:

$$F10A = F9A * 0,1 \quad (5)$$

$$F10A = 4.236,1 [kg]$$

$$F10B = F9B * 0,1 \quad (6)$$

$$F10B = 3.812,5 [kg]$$

$$F10C = F9C * 0,1 \quad (7)$$

$$F10C = 3.431,2 [kg]$$

Se considera además que como el manitol tiene un diámetro inferior a las membranas de microfiltración, ultrafiltración y nanofiltración, este mantiene su masa en cada permeado y conforma íntegramente el concentrado de la osmosis inversa (que solo permite el paso de agua a través de ella):

$$F9A_{manitol} = F9B_{manitol} = F9C_{manitol} = F9D_{manitol} = F11_{manitol} = 266,9 [kg] \quad (8)$$

Finalmente, en la etapa de la osmosis inversa se concentra el manitol presente a un 1,67%. Por tanto, la masa de concentrado de manitol F11 es igual a:

$$F11 * 0,0167 = F11_{manitol} \quad (9)$$

$$F11 = 15.980,5 [kg]$$

Realizando en balance global en la última etapa y despejando F12 se obtiene la masa de agua obtenida en la osmosis inversa:

$$F9D = F11 + F12 \quad (10)$$

$$F12 = 14.900,7 [kg]$$

10.4.5 Depolimerización

En la Tabla A6 se presentan los datos a utilizar para calcular los balances de masa en este equipo:

Tabla A 6: Datos utilizados para obtener los balances de masa en la depolimerización

Datos depolimerización		
Razón agua alga lixiviada	4,167	L/kg
Razón Htec2 por kg alga lixiviada	0,003	L/kg
Razón Ctec2 por kg alga lixiviada	0,0003	L/kg
Relación M9 buffer con alga lixiviada	1,67E-02	L/kg
Densidad Htec2	1,209	Kg/L
Densidad Ctec2	1,226	Kg/L
Densidad M9 buffer	1,0	Kg/L
Concentración de AL en M9 buffer (P_{AL})	7,5	g/L
Concentración Na ₂ HPO ₄ ($P_{Na_2HPO_4}$)	75,2	g/L
Concentración KH ₂ PO ₄ ($P_{KH_2PO_4}$)	30	g/L
Concentración NH ₄ Cl (P_{NH_4Cl})	5	g/L
Concentración NaCl	5	g/L
Peso molecular HCl	36,46	g/mol
Densidad aparente del alga	1,15	kg/L
Capacidad de retención de agua	157	[g/L]
Peso molecular KOH	56,11	g/mol

En primer lugar, se calculan los litros de agua (V_{F13}) necesarios en la operación. Para esto se considera la razón agua/alga lixiviada presentada:

$$V_{F13} = F8 * 4,167 \quad (1)$$

$$V_{F13} = F13 = 12.994,2$$

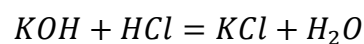
A continuación, es necesario calcular la cantidad de KOH a agregar para obtener un pH=5,5. La que se calcula como sigue:

$$pH = -\log_{10}[H^+] \quad (2)$$

$$[H^+] = 10^{5.5}$$

$$[H^+] = 3,16 * 10^{-6}$$

Escribiendo la reacción ácido-base:



$$[H^+] = [HCl] - [KOH]$$

$$[KOH] = [HCl] - [H^+] \quad (3)$$

Por lo tanto, es necesario conocer la concentración molar del HCl para poder obtener el flujo de KOH (F14). Primero, se calcula la cantidad de moles de HCl en la lixiviación:

$$F7_{HCl} * 1000 \left[\frac{gr}{kg} \right] * PM_{HCl} = 3.207,5 [mol HCl]$$

Luego, se calcula la concentración molar del HCl en la lixiviación:

$$\frac{3.207,5 [mol HCl]}{V_{F17}} = 0,082 \left[\frac{mol}{L} \right]$$

Posteriormente, se calcula el volumen de HCl retenido en el alga:

$$\frac{\left(\frac{F8}{\rho_{alga}} * retención \right)}{1000} = 425 [kg] \sim [L]$$

Y con la concentración molar se calculan los moles de HCl en el alga lixiviada, que son los moles que posteriormente ingresan en el alga a la etapa de depolimerizado:

$$425 [L] * 0,082 \left[\frac{mol}{L} \right] = 35,03 [mol HCl]$$

Finalmente, se obtiene la concentración molar de HCl en el depolimerizado, dividiendo los moles en el volumen total:

$$\frac{35,03 [mol HCl]}{425 [L] + F13} = 0,0026 [M]$$

Reemplazando los valores en (3) se obtiene que la concentración molar de KOH necesaria es de:

$$[KOH] = 2,61 * 10^3 [M]$$

Dividiendo por los litros de agua en que ingresa y multiplicado por su peso molar, se obtienen los kg de KOH (F14):

$$2,61 * 10^3 [M] * F13 = 33,88 [mol]$$

$$\frac{(33,88 [mol] * PM_{KOH})}{1000} = 1,9 [kg] = F14$$

Luego del procesamiento de la primera fase, se calculan las cantidades de enzima (F15) y de M9 buffer (F16) requeridos con relaciones de proporción:

$$F15 = F15_{Htec2} + F15_{Ctec2} \quad (4)$$

$$F15_{Htec2} = 0,003 * F8 * \rho_{Htec2} \quad (5)$$

$$F15_{Ctec2} = 0,0003 * F8 * \rho_{Ctec2} \quad (6)$$

$$F15_{Htec2} = 12,6 [kg]$$

$$F15_{Ctec2} = 1,3 [kg]$$

$$F15 = 13,9 [kg]$$

$$F16 = F8 * 1,67 * 10^2 * \rho_{M9} \quad (7)$$

$$F16 = V_{F16} = 52 [kg] \sim [L]$$

Después, se calculan los [kg] de los reactivos que componen al M9 buffer:

$$F16_{Na_2HPO_4} = [Na_2HPO_4] * F16 \quad (8)$$

$$F16_{KH_2PO_4} = P_{KH_2PO_4} * F16 \quad (9)$$

$$F16_{NH_4Cl} = P_{NH_4Cl} * F16 \quad (10)$$

$$F16_{NaCl} = P_{NaCl} * F16 \quad (11)$$

$$F16_{AL} = P_{AL} * F16 \quad (12)$$

$$F16_{Na_2HPO_4} = 3,9 [kg]$$

$$F16_{KH_2PO_4} = 1,6 [kg]$$

$$F16_{NH_4Cl} = 0,3 [kg]$$

$$F16_{NaCl} = 0,3 \text{ } 3,9 [kg]$$

$$F16_{AL} = 0,4 [kg]$$

Se calcula, por último, la cantidad de agua necesaria en el M9 buffer:

$$F16_{agua} = F16 - F16_{Na_2HPO_4} - F16_{KH_2PO_4} - F16_{NH_4Cl} - F16_{NaCl} - F16_{AL} \quad (13)$$

$$F16_{agua} = 45,6 [kg]$$

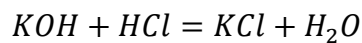
En la segunda fase es necesario regular el pH a valores de 7.5, para esto se calcula nuevamente la necesidad de KOH (F17):

$$pH = -\log_{10}[H^+] \quad (14)$$

$$[H^+] = 10^{7.5}$$

$$[H^+] = 3,16 * 10^{-8}$$

Escribiendo la reacción ácido-base:



$$[H^+] = [HCl] - [KOH]$$

$$[KOH] = [HCl] - [H^+] \quad (15)$$

Se calcula el [HCl] libre, según la neutralización:

$$35,3 [mol HCl] - 33,8 [mol KOH] = 1,15 [mol]$$

Se calcula la concentración molar dividiendo en el volumen de la operación:

$$\frac{1,5 [mol]}{V_{F13} + V_{F15} + V_{F16}} = [HCl] = 1,148 * 10^{-4} [M]$$

Reemplazando en (15):

$$[HCl] - [H^+] = [KOH] = 8,82 * 10^{-5} [M]$$

Multiplicando por el volumen:

$$8,82 * 10^{-5} [M] * (V_{F13} + V_{F15} + V_{F16}) = 1,152 [mol de KOH]$$

Multiplicando por el peso molar del KOH:

$$\frac{1,15 [mol de KOH] * PM_{KOH}}{1000} = 0,06 [kg] = F17$$

Para las salidas del equipo, se obtiene la masa de líquido depolimerizado producido (F19) con la relación entre el agua que ingresa al equipo (F13) y el líquido producido, que corresponde a 1,05 [L/L], y se asume además que luego de sedimentar solo se logra recuperar un 95%:

$$F19 = F13 * 1,05 * 0,95 \quad (16)$$

$$F19 = 12.961,7 [kg]$$

Asumiendo una densidad del líquido depolimerizado igual a la del agua, se obtiene el volumen de la masa de líquido:

$$V_{F19} = F19 * \rho_{agua} \quad (17)$$

$$V_{F19} = 12.961,7 [kg]$$

Finalmente, la masa de alga depolimerizada se obtiene haciendo el balance de masa global en el equipo y despejando F18:

$$F8 + F13 + F14 + F15 + F16 + F17 = F18 + F19 \quad (18)$$

$$F18 = 3.218,9 [kg]$$

10.4.6 Sacarificación

Se obtiene el volumen de crudo de OAL (V_{F20}) con la relación de 0,015 $\left[\frac{L OAL}{L \text{ líquido depolimerizado}} \right]$:

$$V_{F20} = 0,015 \left[\frac{L OAL}{L \text{ líquido depolimerizado}} \right] * V_{F19} \quad (1)$$

$$V_{F20} = 194,4 [L]$$

Asumiendo que la densidad del crudo es similar a la densidad del agua:

$$F20 = V_{F20} * \rho_{agua} \quad (2)$$

$$F20 = 194,4 [kg]$$

Luego, la masa de líquido sacarificado (F21) se obtiene realizando el balance de masa en el equipo y despejando:

$$F19 + F20 = F21 \quad (3)$$

$$F21 = 13156,1 [kg]$$

Se calculan, además, las cantidades de glucosa ($F21_{glucosa}$) y de DEHU ($F21_{DEHU}$) en el líquido según las concentraciones dadas $P_{DEHU} = 22,3 \left[\frac{g}{L}\right]$ y $P_{glucosa} = 1,54 \left[\frac{g}{L}\right]$. Asumiendo que la densidad del líquido sacarificado es similar a la densidad del agua:

$$F21 * \rho_{agua} = V_{F21} \quad (4)$$

$$\frac{(V_{F21} * P_{DEHU})}{1000} = F21_{DEHU} \quad (5)$$

$$\frac{(V_{F21} * P_{glucosa})}{1000} = F21_{glucosa} \quad (6)$$

$$V_{F21} = 13156,1 [L]$$

$$F21_{DEHU} = 293,4 [kg]$$

$$F21_{glucosa} = 20,3 [kg]$$

10.4.7 Cultivo de adaptación

Se tienen 3 cultivos batch consecutivos en donde el cultivo anterior corresponde al inóculo del siguiente. Asumiendo que cada inóculo es un 11% del volumen del fermentador al que ingresa, se calculan los volúmenes del fermentador en medio YPD y el de adaptación.

En primer lugar, el contenido volumétrico que compone el resto del fermentador en medio algal (sin inóculo), es la suma del líquido sacarificado (V_{F21}) y el concentrado de manitol (V_{F11}) y compone un 89% del volumen total. Así, realizando la proporción se obtiene que el volumen del inóculo 2 (V_{F27}) es:

$$V_{F27} = V_{inóculo2} = \frac{(F21 + F11) * 0,11}{0,89} \quad (1)$$

$$V_{F27} = 3.240,9 [L]$$

Luego, del volumen del inóculo 2, un 89% corresponde a medio YPD y un 11% corresponde al inóculo 1:

$$V_{F26} = V_{medioYPD} = 0,89 * inóculo\ 2 \quad (2)$$

$$V_{F26} = 2887,4 [L]$$

$$V_{F25} = V_{inóculo\ 1} = 0,11 * inóculo\ 1 \quad (3)$$

$$V_{F25} = 356,9 [L]$$

Asumiendo una densidad del inóculo 1 igual al líquido sacarificado, que es similar a la del agua, se obtiene la masa del inóculo 1

$$F25 = V_{F25} * \rho_{agua} \quad (4)$$

$$F25 = 356,9 [L]$$

Para el cálculo de la masa de biomasa (F24), se asume que la fermentación comienza con un $OD_{600} = 0,001$. Además, se asume la siguiente curva de calibración.

$$1\ OD_{600} = 0,444 \left[\frac{g\ de\ Y.\ lipolytica}{L} \right] \quad (5)$$

Se tiene entonces que la concentración inicial de levadura en el precultivo es de:

$$\left[\frac{g\ levadura}{L} \right] = 0,444 * 0,001 = 0,000444$$

Se calcula entonces la masa de biomasa (F24) según el volumen del medio:

$$F24 = \frac{0,000444 \left[\frac{g}{L} \right] * F22}{1000} \quad (6)$$

$$F24 = 1,58 * 10^{-4} [kg]$$

Finalmente, dado que se asume que no hay consumo de sustrato ni formación de biomasa nueva, las concentraciones de DEHU y manitol en el medio se mantienen, al igual que la masa de levadura. Por lo tanto, las masas de DEHU y glucosa son:

$$F22_{DEHU} = F25_{DEHU} = \frac{P_{DEHU} * F22}{1000} \quad (7)$$

$$F22_{glucosa} = F25_{glucosa} = \frac{P_{glucosa} * F22}{1000} \quad (8)$$

$$F24 = F25_{levadura} \quad (9)$$

$$F22_{DEHU} = 8,0 [kg]$$

$$F22_{glucosa} = 0,5 [kg]$$

$$F25_{levadura} = 1,58 * 10^{-4} [kg]$$

10.4.8 Precultivo en medio YPD

Los datos utilizados para obtener las masas de cada corriente se presentan en la Tabla A7:

Tabla A 7: Datos utilizados en el balance de masa del precultivo en medio YPD.

Dato	Cantidad	Unidad
Densidad DEHU	1,56	[kg/L]
Densidad Glucosa	1,56	[kg/L]
Densidad Peptona	0,3	[kg/L]
Densidad Ext. Levadura	0,49	[kg/L]
Densidad Levadura	1,112	[kg/L]
Densidad Manitol	0,45	[kg/L]
Densidad Sulfato de amonio	1,77	[kg/L]
Concentración glucosa en YPD ($P_{glucosa}$)	20	[g/L]
Concentración peptona en YPD ($P_{peptona}$)	20	[g/L]
Concentración extracto de levadura en YPD ($P_{Extracto}$)	10	[g/L]

A partir del volumen de medio YPD (V_{F26}), se calculan las masas de glucosa, peptona y extracto de levadura en el medio YPD.

$$\frac{(V_{F26} * P_{glucosa})}{1000} = F26_{glucosa} \quad (1)$$

$$\frac{(V_{F26} * P_{peptona})}{1000} = F26_{peptona} \quad (2)$$

$$\frac{(V_{F26} * P_{extracto})}{1000} = F26_{extracto} \quad (3)$$

$$F26_{glucosa} = 57,5 [kg]$$

$$F26_{peptona} = 57,5 [kg]$$

$$F26_{extracto} = 28 [kg]$$

Utilizando las densidades de la glucosa, la peptona y el extracto de levadura, se obtienen los litros de agua que se deben agregar al medio.

$$V_{F26_{agua}} = V_{F26} - F26_{glucosa} * \rho_{glucosa} - F26_{peptona} * \rho_{peptona} - F26_{extracto} * \rho_{extracto}. \quad (4)$$

$$V_{F26_{agua}} = F26_{agua} = 2599,0 [kg]$$

Para calcular la cantidad de sustrato consumido y la biomasa producida se utilizan ecuaciones de balances de masa para el diseño de reactores batch, que se exponen a continuación:

Balance de nutrientes:

$$t_{batch} = \frac{1}{\mu_{max}} * \ln \left(1 + \frac{S_0 - S_f}{\left(\frac{1}{Y_X \frac{g}{L}} + \frac{q_p}{\mu_{max} * Y_P \frac{g}{L}} + \frac{m_s}{\mu_{max}} \right) * X_0} \right) \quad (5)$$

Donde:

μ_{max} : *tasa máxima de crecimiento específico* [h^{-1}]

S_0 : *concentración inicial de sustrato* [$\frac{g}{L}$]

S_f : *concentración final de sustrato* [$\frac{g}{L}$]

X_0 : *concentración inicial de biomasa* [$\frac{g}{L}$]

$\frac{Y_X}{S}$: *rendimiento de biomasa en el sustrato* [$\frac{g \text{ biomasa}}{g \text{ sustrato}}$]

q_p : *velocidad específica de formación de producto* [$\frac{g \text{ producto}}{g \text{ cel} * h}$]

m_s : *velocidad específica de consumo de sustrato para mantención* [h^{-1}]

Si no se forma producto ligado al metabolismo energético y se desprecia la mantención, se obtiene lo siguiente:

$$t_{batch} = \frac{1}{\mu_{max}} * \ln \left(1 + \frac{S_0 - S_f}{\left(\frac{1}{Y_X \frac{g}{L}} \right) * X_0} \right) \quad (6)$$

Mediante esta ecuación es posible conocer la cantidad final de sustrato S_f . Pero primero se debe obtener la expresión de S_0 y X_0 :

$$S_0 = \frac{(F26_{glucosa} + F27_{glucosa})}{V_{F25} + V_{F26}} * 1000 \quad (7)$$

$$S_0 = 17,97 \left[\frac{g}{L} \right]$$

$$X_0 = \frac{F25_{biomasa} * 1000}{V_{F25} + V_{F26}} \quad (8)$$

$$X_0 = 4,88 * 10^{-5} \left[\frac{g}{L} \right]$$

Reemplazando los valores y despejando Sf:

$$24 [h] = \frac{1}{0,24 [h^{-1}]} * \ln \left(1 + \frac{17,97 - S_f}{\left(\frac{1}{0,6} \right) * 4,88 * 10^{-5}} \right)$$

$$S_f = 17,94 \left[\frac{g}{L} \right]$$

Con este valor, se calcula el % de consumo de sustrato:

$$\%consumo\ sustrato = \frac{S_0 - S_f}{S_0} * 100 \quad (9)$$

$$\%consumo\ sustrato = 0,143$$

Además, se calcula la concentración de biomasa producida con el balance de biomasa:

$$X = X_0 * \exp(\mu_{max} * t) \quad (10)$$

Donde

X: concentración de biomasa en función del tiempo de operación $\left[\frac{g}{L} \right]$

Reemplazando:

$$X = 0,015 \left[\frac{g}{L} \right]$$

Con los valores de consumo de sustrato y concentración de biomasa obtenida se pueden calcular las masas a la salida del fermentador.

Se calcula la masa de biomasa en el inóculo ($F27_{biomasa}$):

$$F27_{biomasa} = \frac{X * (V_{F25} + V_{F26})}{100} \quad (11)$$

$$F27_{biomasa} = 5 * 10^{-2} [kg]$$

Se calculan las masas de los nutrientes finales con el % de consumo de sustrato. Se asume que el consumo es igual para los tres nutrientes presentes (sin contar el DEHU), aun cuando se calcularon los moles consumidos/ moles sustrato en el Anexo 5, dado que se desconoce la composición de la peptona y por tanto no se conoce su masa molar para obtener la relación directa de los gramos consumidos. Entonces:

$$F27_{glucosa} = (F25_{glucosa} + F26_{glucosa}) * (1 - (\% consumo de sustrato * 100)) \quad (12)$$

$$F27_{peptona} = (F26_{peptona}) * (1 - (\% consumo de sustrato * 100)) \quad (13)$$

$$F27_{extracto} = (F26_{extracto}) * (1 - (\% \text{ consumo de sustrato} * 100)) \quad (14)$$

$$F27_{glucosa} = 58,2 [kg]$$

$$F27_{peptona} = 57,7 [kg]$$

$$F27_{extracto} = 28,8 [kg]$$

Finalmente, el DEHU no se consume, dado que aún queda glucosa disponible.

$$F25_{DEHU} = F27_{DEHU} \quad (15)$$

$$F27_{DEHU} = 0,8 [kg]$$

NOTA: los kilogramos de biomasa reportados hasta el momento están expresados en biomasa seca (DW), dado que es el valor reportado por el rendimiento de biomasa.

10.4.9 Fermentación en DEHU

Se calcula la cantidad de sulfato de amonio necesaria, que corresponde a un 5%(p/v).

$$F28 = \left(\frac{\% \frac{p}{v}}{100} \right) * (V_{F23} + V_{F11} + V_{F27}) * 1000 \quad (1)$$

$$F28 = 160.118 [g] = 160,1 [kg]$$

Y el volumen de F28, VF28 se obtiene como:

$$V_{F28} = \frac{F28}{\rho_{sulfato}} \quad (2)$$

$$V_{F28} = 90,5 [L]$$

Posteriormente, se utilizan las ecuaciones de diseño del fermentador batch para obtener el tiempo máximo al que se puede operar la fermentación, considerando que el sustrato final es cero ($S_f = 0$).

$$t_{batch} = \frac{1}{\mu_{max}} * \ln \left(1 + \frac{S_0 - S_f}{\left(\frac{1}{Y_{X/S}} \right) * X_0} \right) \quad (3)$$

Se calcula X_0 y S_0 para reemplazarlos:

$$S_0 = \frac{(F23_{glucosa} + F23_{DEHU} + F11_{manitol} + F27_{glucosa} + F27_{DEHU})}{V_{F26} + V_{F27} + V_{F11}} * 1000 \quad (4)$$

$$S_0 = 19,92 \left[\frac{g}{L} \right]$$

$$X_0 = \frac{F_{27}^{biomasa} * 1000}{V_{F23} + V_{F27} + V_{F11}} \quad (5)$$

$$X_0 = 0,00157 \left[\frac{g}{L} \right]$$

Reemplazando:

$$t_{batch} = \frac{1}{0,24 [h^{-1}]} * \ln \left(1 + \frac{(19,92 - 0) \left[\frac{g}{L} \right]}{\left(\frac{1}{0,4} \right) * 0,00157} \right) \quad (6)$$

$$t_{batch} = 35,6 [h]$$

Además, con el balance de biomasa se calcula la cantidad de biomasa que se puede obtener en la fermentación al trabajar en el tiempo calculado:

$$X_f = X_0 * \exp(\mu_{max} * t) \quad (7)$$

$$X_f = 7,97 \left[\frac{g}{L} \right]$$

Con X_f se calcula la biomasa producida en peso seco (DW):

$$\frac{\text{levadura en peso seco}}{\text{lote}} = \frac{X_f * (V_{F23} + V_{F11} + V_{F27} + V_{F28})}{1000} \quad (8)$$

$$\text{levadura en peso seco} = 256,04 \left[\frac{kg}{\text{lote}} \right]$$

Este peso contiene un 5% de agua que queda disponible en la levadura. Por lo tanto, se retira teóricamente para calcular la materia seca de la levadura:

$$\text{materia seca} = \text{levadura en peso seco} - \left(\frac{5\%}{100} \right) * \text{levadura en peso seco} \quad (9)$$

$$\text{materia seca} = 243,24 [kg]$$

Asumiendo que la masa húmeda posee un 80% de masa en agua, el 20% restante es la materia seca. Haciendo la proporción:

$$\text{Biomasa húmeda} = \frac{\text{materia seca} * 100\%}{20\%} \quad (10)$$

$$\text{Biomasa húmeda} = 1216,2 [kg]$$

El resto de los valores de la salida se obtienen con el consumo de nutrientes. En primer lugar, se asumió que se consumían todos los sustratos, por lo que:

$$F_{29_{DEHU}} = F_{29_{glucosa}} = F_{29_{manitol}} = 0 [kg]$$

Por otro lado, la cantidad de fuente de nitrógeno consumida se calcula en el apartado de consumo en fermentaciones (Ver Anexo 5). En él se obtiene que se consumen $0,209 \left[\frac{\text{mol sulfato consumidos}}{\text{mol de sustrato consumidos}} \right]$.

Ponderando el valor de los moles consumidos por los pesos molares, se obtienen los $\left[\frac{\text{kg sulfato consumidos}}{\text{kg de sustrato consumidos}} \right]$.

$$\text{Consumo de sulfato} = 0,209 \left[\frac{\text{mol sulfato consumidos}}{\text{mol de sustrato consumidos}} \right] * \frac{PM_{\text{sulfato de amonio}}}{PM_{\text{DEHU}}} \quad (11)$$

$$\text{Consumo de sulfato} = 0,158 \left[\frac{\text{kg sulfato consumidos}}{\text{kg de sustrato consumidos}} \right]$$

Posteriormente, es necesario calcular los kilogramos de sustrato consumidos, como sigue:

$$\text{kg de sustrato consumidos} = (F23_{\text{glucosa}} + F27_{\text{glucosa}}) - F29_{\text{glucosa}} + (F23_{\text{DEHU}} + F27_{\text{DEHU}}) - F29_{\text{DEHU}} + F11_{\text{manitol}} - F29_{\text{manitol}} \quad (12)$$

$$\text{kg de sustrato consumidos} = 632,2 \text{ [kg]}$$

Se calculan entonces los kilogramos de sulfato consumidos:

$$\text{kg sulfato consumidos} = \text{Consumo de sulfato} * \text{kg de sustrato consumidos} \quad (13)$$

$$\text{kg sulfato consumidos} = 100,9 \text{ [kg]}$$

Por lo tanto, la masa de sulfato de amonio presente la salida del medio algal ($F29_{\text{sulfato}}$) es:

$$F29_{\text{sulfato}} = F28_{\text{sulfato}} - \text{kg. sulfato consumidos} \quad (14)$$

$$F29_{\text{sulfato}} = 59,2 \text{ [kg]}$$

Y, por último, se asume que la fuente preferente de nitrógeno es el sulfato, por lo que la masa de peptona no varía:

$$F27_{\text{peptona}} = F29_{\text{peptona}} = 57,7 \text{ [kg]}$$

10.4.10 Centrifuga

Dada la eficiencia de la centrifugación, se recupera un 80% del sólido en este equipo. Por lo que la masa de biomasa húmeda ($F31$) es:

$$F31 = 0,8 * F29_{\text{biomasa}} \quad (1)$$

$$F31 = 973 \text{ [kg]}$$

Realizando el balance de masa global en el equipo, se despeja la masa de sobrenadante (F30):

$$F29 + F30 = F31 \quad (2)$$

$$F30 = 31.487,8 [kg]$$

10.4.11 Secador

Se calcula la cantidad de biomasa seca obtenida en el secador (F33), considerando que la biomasa posee un 80% de humedad y se requiere disminuirla a un 5%. Para esto, se calcula en primer lugar la materia seca presente en F31:

$$\text{Materia seca} = F31 * 0,2 \quad (1)$$

$$\text{Materia seca} = 194,6 [kg]$$

Asumiendo el 5% de humedad, se tiene que un 95% de la masa corresponde a la materia seca. Realizando la proporción se obtiene la biomasa seca F33:

$$F33 = \frac{\text{materia seca} * 100\%}{95\%} \quad (2)$$

$$F33 = 204 [kg]$$

Finalmente, realizando el balance de masa global en la cámara de secado, se obtiene la masa de vapor de agua evaporada en el secador (F32):

$$F32 = F31 - F33 \quad (3)$$

$$F32 = 768,1 [kg]$$

10.5 Anexo 5: Cálculo de consumo en fermentaciones

Se realiza el cálculo del consumo molar de las fermentaciones con el fin de utilizar sus valores en el desarrollo del balance de masa y el balance de energía. Los datos utilizados para este cálculo son los siguientes:

Tabla A 8: Datos para calcular el consumo de las fermentaciones

Compuestos	Formula	Peso molecular [g/mol]
Glucosa	C ₆ H ₁₂ O ₆	180,16
Manitol	C ₆ H ₁₄ O ₆	182,17
DEHU	C ₆ H ₇ O ₇	175,12
Extracto de levadura	C ₁₉ H ₁₄ O	274,3
Peptona	-	-
Biomasa W29	CH _{1,675} O _{0,523} N _{0,153}	25,57
Sulfato de amonio	(NH ₄) ₂ SO ₄	132,14
% Cenizas biomasa	5,7	-

El peso molar de la biomasa se calcula según su fórmula estequiométrica, de la siguiente forma:

$$PM_{biomasa} = (1 * PM_C + 1,675 * PM_H + 0,523 * PM_O + 0,153 * PM_N) * \left(1 + \left(\frac{\%cenizas}{100}\right)\right)$$

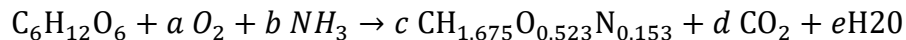
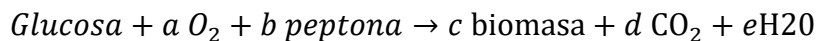
$$PM_{biomasa} = 1 * 12,01 + 1,675 * 1 + 0,523 * 15,9 + 0,153 * 14) * \left(1 + \left(\frac{5,7}{100}\right)\right)$$

$$PM_{biomasa} = 25,57 \left[\frac{g}{mol}\right]$$

Dado que en la primera fermentación se asume que no hay consumo, solo se realiza el cálculo para la fermentación en medio YPD y medio algal.

- **Medio YPD**

Se expresa la reacción de formación de biomasa:



Cabe destacar que se desconoce la fórmula estequiométrica de la peptona, por lo tanto, se asume NH₃.

Se calcula en valor de c:

$$c = Y_{X/S} * PM_{glucosa} * 1/PM_{biomasa}$$

$$c = 0,6 \left[\frac{g \text{ biomasa}}{g \text{ glucosa}} \right] * 180,16 \left[\frac{g \text{ glucosa}}{mol \text{ glucosa}} \right] * \frac{1}{25,57} \left[\frac{mol \text{ biomasa}}{g \text{ biomasa}} \right]$$

$$c = 4,22 \left[\frac{mol \text{ biomasa}}{mol \text{ glucosa}} \right]$$

Se hace el balance por elemento:

$$C: \quad 6 = c + d$$

$$H: \quad 12 + 3b = 1,675c + 2e$$

$$O: \quad 6 + 2a = 0,523c + 2d + e$$

$$N: \quad b = 0,153c$$

Resolviendo el sistema de ecuaciones se obtiene el valor para cada constante:

$$a = 13,157 \left[\frac{mol \text{ } O_2 \text{ consumidos}}{mol \text{ de glucosa}} \right]$$

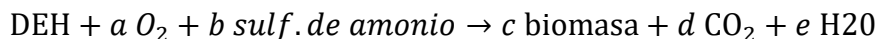
$$b = 0,646 \left[\frac{mol \text{ peptona consumidos}}{mol \text{ de glucosa}} \right]$$

$$d = 1,77 \left[\frac{mol \text{ } CO_2 \text{ producidos}}{mol \text{ de glucosa}} \right]$$

$$e = 10,4 \left[\frac{mol \text{ } H_2O \text{ producidos}}{mol \text{ de glucosa}} \right]$$

- **Medio algal**

Se expresa la reacción de formación de biomasa:



Se calcula en valor de c:

$$c = Y_{X/S} * PM_{DEHU} * 1/PM_{biomasa}$$

$$c = 0,4 \left[\frac{g \text{ biomasa}}{g \text{ DEHU}} \right] * 175,12 \left[\frac{g \text{ DEHU}}{mol \text{ DEHU}} \right] * \frac{1}{25,57} \left[\frac{mol \text{ biomasa}}{g \text{ biomasa}} \right]$$

$$c = 2,74 \left[\frac{mol \text{ biomasa}}{mol \text{ DEHU}} \right]$$

Se hace el balance por elemento:

$$C: \quad 6 = d + e$$

$$H: \quad 7 + 8c = 1,675d + 2f$$

$$O: \quad 7 + 2b + 4c = 0,523d + 2e + f$$

$$N: \quad 2c = 0,153d$$

Resolviendo el sistema de ecuaciones se obtiene el valor para cada constante:

$$a = 9,99 \left[\frac{\text{mol } O_2 \text{ consumidos}}{\text{mol de glucosa}} \right]$$

$$b = 0,21 \left[\frac{\text{mol peptona consumidos}}{\text{mol de glucosa}} \right]$$

$$d = 3,26 \left[\frac{\text{mol } CO_2 \text{ producidos}}{\text{mol de glucosa}} \right]$$

$$e = 6,38 \left[\frac{\text{mol } H_2O \text{ producidos}}{\text{mol de glucosa}} \right]$$

10.6 Anexo 6: Dimensionamientos

10.6.1 Tanque, reactores y fermentadores

10.6.1.1 Dimensiones

En primer lugar, se define el volumen de trabajo ($V_{trabajo}$) de cada equipo según la información entregada por el balance de masa, como se muestra en la Tabla A9:

Tabla A 9: Volúmenes de trabajo por equipo

Equipo	TQ1	SR1	SR2	SR3	FM1	FM2	FM3
Volumen de trabajo [m ³]	12,53	18,64	15,77	13,16	0,36	3,24	32,25

Posteriormente, se seleccionan las relaciones altura/diámetro ($rel_{H/D}$) y los márgenes de seguridad para cada equipo:

- Tanque:
 - $\left(rel_{\frac{H}{D}} \right) = 1,5$
 - $margen = 0,1$
- Reactores:
 - $\left(rel_{\frac{H}{D}} \right) = 1,5$
 - $margen = 0,2$
 - $\left(rel_{\frac{D_i}{D}} \right) = 1/3$
- Fermentadores:
 - $\left(rel_{\frac{H}{D}} \right) = 3$
 - $margen = 0,2$
 - $\left(rel_{\frac{D_i}{D}} \right) = 1/3$

Con esto, se calcula el volumen de cada equipo (V_{equipo}) según la siguiente fórmula:

$$(V_{equipo}) = V_{trabajo} * (1 + margen) \quad (1)$$

Luego, se calcula el diámetro de cada equipo asumiendo una configuración cilíndrica, recordando que el volumen de un cilindro es:

$$V = \pi * \left(\frac{D}{2} \right)^2 * H \quad (2)$$

Reemplazando H:

$$V = \pi * \frac{D^2}{4} * rel_{\frac{H}{D}} * D \quad (3)$$

Despejando D:

$$D_{equipo} = \sqrt[3]{\frac{V_{equipo}}{\pi} * 4 * rel_{\frac{H}{D}}} \quad (4)$$

La altura se calcula directamente con $rel_{\frac{H}{D}}$ como:

$$H = D * rel_{\frac{H}{D}} \quad (5)$$

Finalmente, el diámetro del agitador se obtiene con:

$$D_i = D * rel_{\frac{D_i}{D}} \quad (6)$$

Aplicando las ecuaciones 1, 4, 5 y 6 a cada uno de los volúmenes de trabajo, se obtienen los resultados expresados en la Tabla A10:

Tabla A 10: Dimensiones características de tanque, reactores y fermentadores

Parámetro	TQ1	SR1	SR2	SR3	FM1	FM2	FM3
Volumen de trabajo [m³]	12,53	18,64	15,77	13,16	0,36	3,24	32,25
Margen de seguridad	0,10	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Volumen reactor [L]	13,79	22,37	18,92	15,79	0,43	0,39	38,70
Relación H/D	1,50	1,50	1,50	1,50	3,00	3,00	3,00
Altura H [m]	3,41	4,00	3,78	3,56	1,70	3,55	7,63
Diámetro D [m]	2,27	2,67	2,52	2,38	0,00	1,18	2,54
Diámetro agitador [m]	-	0,89	0,84	0,79	0,57	0,39	0,85

Como se mencionó en el cuerpo del informe, dadas las similitudes de operación y de tamaño del reactor 1 (SR1) con el reactor (SR2), se decide ocupar el reactor 1 (SR1) tanto para la operación de lixiviación ácida como para la depolimerización.

10.6.1.2 Velocidad de agitación

Utilizando el criterio de escalamiento mediante mantención de la velocidad tangencial $(ND_i)_{escala1} = (ND_i)_{escala2}$. Se calculan los rpm a los que debe operar cada equipo para mantener los niveles de agitación de su respectivo modelo en piloto, a excepción del fermentador 3.

Para los reactores, se obtiene el volumen de trabajo ($V_{trabajo}$) de la escala piloto de la lixiviación ácida, depolimerización y sacarificación según (Camus, 2016)^[54] y se sigue el procedimiento de la sección anterior para conocer el diámetro aproximado de su agitador. Además, se registran las rpm mencionadas en el artículo y se transforman a rpm del siguiente modo:

$$rps = \frac{rpm}{60} \quad (7)$$

Como ya se calculó el diámetro del agitador en la escala 2 (sección anterior), es posible obtener las nuevas rps con la siguiente formula:

$$\frac{(rps_{escala1} * D_{i_{escala1}})}{D_{i_{escala2}}} = rps_{escala2} \quad (8)$$

El mismo procedimiento se sigue para los fermentadores. Sin embargo, el modelo a escala piloto es un reactor de 5[L] con una agitación de 550 [rpm] y una aireación de 1 [vvm] para la producción de SCP utilizado en el artículo de (Juszczuk, 2013) [31].

Los resultados se resumen en la Tabla A11.

Tabla A 11:Revoluciones por segundo (N) necesarias para mantener el nivel de agitación.

Equipo	Escala 1 (original piloto)					Escala 2 (industrial)		
	V_trabajo [m^3]	V_reactor [m^3]	Di [m]	[rpm]	N [rps]	Di [m]	N [rps]	[rpm]
Reactor 1	0,38	0,456	0,24	200	3,33	0,89	0,91	55
Reactor 2	0,24	0,290	0,21	200	3,33	0,84	0,83	50
Reactor 3	0,034	0,075	0,13	500	8,33	0,79	1,40	84
Fermentador 1	-	0,005	0,05	550	9,17	0,19	2,62	158
Fermentador 2	-	0,005	0,05	550	9,17	0,39	1,26	76

Para estimar la velocidad de agitación del fermentador 3, es necesario obtener primero su potencia, por lo que las rpm del equipo se presentan en la siguiente sección.

10.6.1.3 Potencia (P) y potencia con gas (P_G):

Para calcular la potencia se debe conocer en primer lugar el número de Reynolds (Re) de cada equipo, el que se calcula como sigue:

$$Re = \frac{N * D_i^2 * \rho}{\mu} \quad (9)$$

Donde:

N : revoluciones por segundo

D_i : diámetro del agitador [m]

ρ : densidad del medio $\left[\frac{kg}{m^3}\right]$

μ : Viscosidad del medio $\left[\frac{kg}{m*s}\right]$

Los valores de densidad son los obtenidos en el balance de masa, mientras que la viscosidad es asumida como la viscosidad del agua a las T° de operación de cada equipo. En la Tabla A12 se muestra el resumen del cálculo del número de Reynolds:

Tabla A 12: Número de Reynolds para cada reactor y fermentador

Cálculo de Reynolds				
Equipo	T° [°C]	μ [kg/m*s]	ρ [kg/m ³]	N_Re
Reactor 1	25	0,00089	1018,98734	8,2E+05
Reactor 2	50	0,0005	1026,00976	1,2E+06
Reactor 3	25	0,00089	1000	9,9E+05
Fermentador 1	30	0,000798	1008,55839	1,2E+05
Fermentador 2	30	0,000798	956,534568	2,3E+05
Fermentador 3	30	0,000798	995,603154	-

Con el número de Reynold calculado, se utiliza el siguiente diagrama (Figura A3) que correlaciona el n° de potencia con (Re). Se asume el uso de una turbina Rushton (curva 1), dada la amplia gama de viscosidades que trabaja y para ponerse en el peor caso. Como todos los (Re) obtenidos están en el régimen turbulento. El valor del n° de potencia (Np) para cada equipo es de ~5.

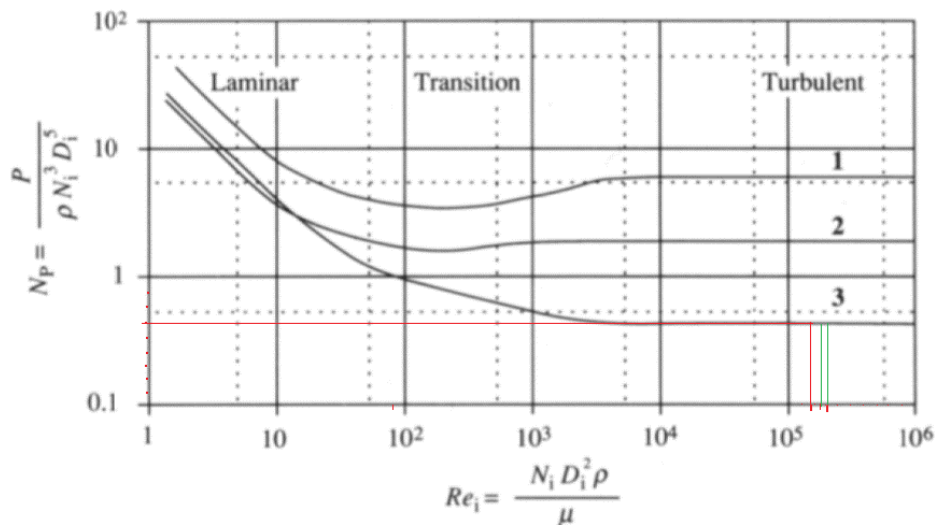


Figura A 3: Correlación entre el número de Reynolds y el número de potencia para tres tipos de agitadores

Finalmente, se despeja la potencia desde el número de potencia (Np), cuya ecuación en la siguiente:

$$N_p = \frac{P * g}{\rho * N^3 * D_i^5} \quad (10)$$

Donde:

N : revoluciones por segundo

D_i : diámetro del agitador [m]

ρ : densidad del medio $\left[\frac{kg}{m^3}\right]$

g : aceleración de gravedad $\left[\frac{m}{s^2}\right] = 9,8$

Utilizando los datos de la Tabla A12, se obtienen los resultados expuestos en la Tabla A13:

Además, en la misma tabla se muestra la potencia de agitación estimada para el fermentador 3, a través del valor típico reportado en bibliografía para cultivos celulares de volúmenes cercanos a 25 $[m^3]$ [64]:

Tabla A 13: Cálculo de la potencia para cada reactor y fermentador

Cálculo de potencia				
Equipo	Np (región turbulenta)	g [m/s ²]	Potencia [kgf*m/s]	Potencia [kW]
Reactor 1	5	9,8	218,31	2,14
Reactor 2	5	9,8	125,07	1,23
Reactor 3	5	9,8	436,41	4,28
Fermentador 1	5	9,8	2,22	0,02
Fermentador 2	5	9,8	9,18	0,09
Fermentador 3	5	9,8	2551,02	25

Luego, para calcular las RPM del fermentador 3, se utiliza la ecuación 10 del número de potencia y se despeja N, reemplazando:

$$5 = \frac{2551,02 * 9,8}{995,6 * N^3 * 0,8^5}$$

$$N = 2,26 [rps]$$

$$N_{fermentador3} = 135 [rpm]$$

Sin embargo, dado que los fermentadores poseen un flujo de gas, es necesario aplicar una corrección el número de potencia considerando que las burbujas de aire disminuyen la potencia consumida por el agitador. Para esto, se utiliza la siguiente relación:

$$\frac{P_G}{P} = \frac{Fa}{N * D_i^3} = N_a \quad (11)$$

Donde:

Fa : flujo de aireacion $\left[\frac{m^3}{s}\right]$

P_G : potencia con gas [kW]

N_a : número de aireación

Se calcula el flujo de aireación considerando que los fermentadores poseen un sistema de aireación de 1[vvm] (volumen de aire por volumen de líquido por minuto) y que vvm es igual a:

$$vvm = \frac{Fa}{V \text{ líquido}} \quad (12)$$

Donde:

$$V_{\text{líquido}} = V_{\text{trabajo}} \text{ en } [m^3]$$

Por lo tanto, multiplicando el vvm por el volumen de trabajo de cada fermentador, y reemplazando los valores en la ecuación 11, se obtiene la relación $\frac{P_G}{P}$ que permite calcular P_G . Los resultados para los tres fermentadores se muestran en la Tabla A14:

Tabla A 14: Resultados de la potencia consumida por la agitación con gas en los fermentadores

Potencia con gas				
Equipo	Aireación (vvm)	Fa	Na	Potencia [KW]
Fermentador 1	1	0,01	0,34	0,01
Fermentador 2	1	0,05	0,70	0,06
Fermentador 3	1	0,22	0,16	3,99

10.6.2 Membranas

Para realizar el dimensionamiento se realiza el escalamiento según el cross-flow típico de cada membrana en $[m^3/s]$. Dicho valor se calcula con los volúmenes del balance de masa, donde:

$$V_{0MF} = 14120,36 [L]$$

$$V_{0UF} = 12708,32 [L]$$

$$V_{0NF} = 11437,49 [L]$$

$$V_{0OI} = 10293,74 [L]$$

Cada uno de estos valores se transforma a m^3 , y se divide por las 2 horas de operación como sigue, obteniendo el Cros-Flow de cada etapa

$$CrossFlow_X = V_{0X} * \frac{1 [m^3]}{1000 [L]} * 2 [h] * \frac{3600 [s]}{1 [h]} \quad (1)$$

$$CrossFlow_{MF} = 7,06 \left[\frac{m^3}{s} \right]$$

$$CrossFlow_{UF} = 6,35 \left[\frac{m^3}{s} \right]$$

$$CrossFlow_{NF} = 5,72 \left[\frac{m^3}{s} \right]$$

$$CrossFlow_{OI} = 5,15 \left[\frac{m^3}{s} \right]$$

Con este valor, es posible realizar una búsqueda en el catálogo de la membrana ^[61]. Se ejemplificará con la membrana de osmosis inversa, y luego el procedimiento es análogo para el resto.

Se necesita una membrana con un crossflow superior a $5,15 \left[\frac{m^3}{s} \right]$. Se realiza la búsqueda en la tabla de la Tabla A15 y se selecciona la que cumpla las condiciones, en este caso la de $6 \left[\frac{m^3}{s} \right]$. La imagen informa que, con esa selección, se tiene un diámetro externo de entre 3.8''/3.9'' y un espesor de espaciado de 30 mil.

Tabla A 15: Tabla de cross flows típicos de membranas espiral [membrana]

Cross-flow and pressure drop						
Typical cross-flow (m ³ /h) and max. pressure drop (bar) at cP 1:						
Outer diameter:	2.5"		3.8"/3.9"		8.0"	
Spacer thickness:	m ³ /h	bar	m ³ /h	bar	m ³ /h	bar
30 mil	—	—	6	1.1	18	0.9
48 mil	1.5	0.6	8	1.1	29	0.9
65 mil	—	—	10	1.1	32	0.9

Note: Calculated at tight fit of spiral membrane and housing by use of standard ATD system
 Maximum pressure drop across the entire housing not to exceed 4.1 bar

Posteriormente, se observa el formato del código de designación de las membranas. Por lo que la membrana debe tener un código que comience en 38 o 39.

Spiral membrane designation	
Example: Alfa Laval RO90-8038/30	
Alfa Laval RO90	= Membrane type
80	= Outer diameter of spiral (8.0")
38	= Length of spiral (38") without ATD system
30	= Thickness of feed spacer (30 mil)

Figura A 4: Formato de designación de las membranas

Se busca en la Tabla A16 el tipo de membrana que informa el artículo de (Camus,2016) para la nanofiltración. En este caso es RO98 pHt. Se ubica el espesor de espaciado (30) y se selecciona la que comience en 38 o 39. Por lo tanto, la membrana escogida en la 516645.

Tabla A 16: Catálogo de tipo y código de membrana.

Standard configurations						
Size ¹		Membrane type and code number ²				
Spiral	Spacer	NF	NF99HF	RO90	RO99	RO98 pHt™
2517	48	519770	522311	525507	522318	517592
2538	48	534807	533928	540855	540094	533929
	30	530979	522292	525508	523570	516645
3838	48	521231	521681	525509	522319	516646
	65	527936	—	—	522320	522333
3938	48	—	—	—	527938	—

Por último, se obtienen las dimensiones de la membrana desde la Tabla A17 que además se ilustran en la Figura A8.

Tabla A 17: Dimensiones de la membrana según el diámetro externo de la espiral.

Standard sizes										
Size ¹	Outer diameter (OD)		Housing diameter (HD)		Spiral length (L1) ²		ATD socket diameter (ID)		ATD socket depth (L2)	
	mm	inches	mm	inches	mm	inches	mm	inches	mm	inches
2517	64.0–65.0	2.52–2.56	66	2.6	432	17.01	21.1	0.831	50	1.97
2538	64.0–65.0	2.52–2.56	66	2.6	965	37.99	21.1	0.831	50	1.97
3838	95.0–96.5	3.74–3.80	97.55	3.84	965	37.99	21.1	0.831	50	1.97
3938	98.5–99.0	3.88–3.90	101.00	4.00	965	37.99	21.1	0.831	50	1.97
8038	198.5–201.5	7.82–7.93	204.14	8.04	965	37.99	28.58	1.125	76	2.99
8038	198.5–201.5	7.82–7.93	204.14	8.04	965	37.99	28.9	1.138	76	2.99

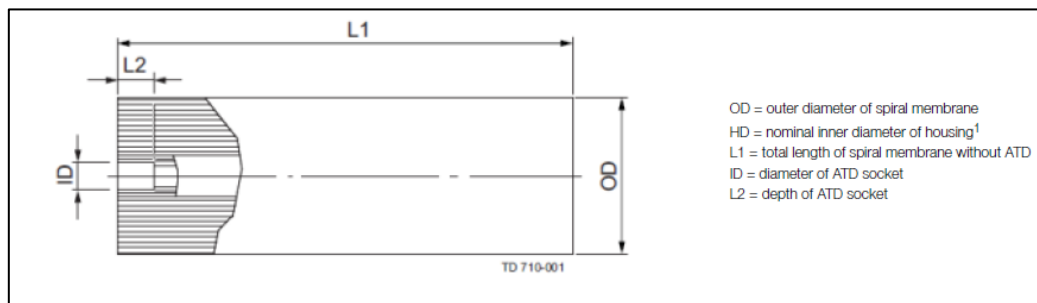


Figura A 5: Dimensiones características de las membranas espiral

Realizando el mismo procedimiento con todas las membranas, se obtienen las siguientes dimensiones:

Tabla A 18: Dimensiones características de las cuatro membranas seleccionadas para las condiciones de operación

Dimensiones membranas alfa laval	OD [mm]	HD [mm]	L1 [mm]	ID [mm]	L2 [mm]	Referencia
GR95PP 516825	95-96,3	97,55	965	21,1	50	[61]
UFX5pht	95-96,5	97,55	965	21,1	50	[61]
NF 530979	95-96,5	97,55	965	21,1	50	[62]
RO98 pHt™ 516645	95-96,5	97,55	965	21,1	50	[62]

10.6.3 Centrífuga

Para dimensionar la centrífuga se utiliza la ecuación de diseño de una centrífuga tubular:

$$Q = V_g * \left\{ \frac{2 * \pi * L * R^2 * \Omega^2}{g} \right\} = V_g * \Sigma \quad (1)$$

Donde:

V_g : Velocidad de sedimentación característica del sólido a separar $\left[\frac{m}{s} \right]$

L : altura de la centrífuga [m]

R : radio característico de la centrífuga [m]

g : aceleración de gravedad $\left[\frac{m}{s^2} \right]$

Ω = velocidad angular de las partículas $\left[\frac{rad}{s} \right]$

También, se conoce la expresión para la velocidad de sedimentación:

$$V_g = \frac{\rho_p - \rho_f}{18 * \mu} * D_p^2 * g \quad (2)$$

Donde:

ρ_p : densidad de la partícula a separar $\left[\frac{kg}{m^3} \right]$

ρ_f : densidad del fluido $\left[\frac{kg}{m^3} \right]$

μ : viscosidad del fluido $\left[\frac{kg}{m*s} \right]$

D_p : diámetro de la partícula a separar [m]

Los datos utilizados para el dimensionamiento fueron los presentados en la Tabla A19:

Tabla A 19: Datos para el dimensionamiento de la centrífuga

Datos Bibliográficos					
Descripción	Símbolo	Magnitud	Unidad	Supuesto	Referencia
G operación	G	8000,0	-	-	[34]
Volumen a tratar	F29	31244,6	[L]	-	BM
Diámetro partícula	d	2,28	[m]	-	[72]
Diámetro partícula	d	2,28E-06	[µm]	-	[72]
Aceleración de gravedad	g	9,8	[m/s ²]	-	-
Densidad sólido	ρ_s	1112,0	[kg/m ³]	S. cerevisiae	[73]
Densidad medio	ρ	997,0	[kg/m ³]	Agua a 4°C	-
Viscosidad medio	μ	0,00105	[kg/m*s]	Agua a 4°C	-
Largo centrífuga industrial	L	0,75	[m]	-	[65]

Radio centrífuga industrial	R	0,075	[m]	-	[65]
-----------------------------	---	-------	-----	---	------

Reemplazando los datos en la ecuación 2, se obtiene el valor de la velocidad de sedimentación del hongo (V_g):

$$V_g = 3,1 * 10^{-7} \left[\frac{m}{s} \right]$$

Posteriormente, utilizando el radio y el largo conocido de la centrífuga CEPA Z101 GP [65] se calcula la capacidad de flujo a procesar por la centrífuga, utilizando la velocidad de sedimentación del hongo y la expresión para la velocidad angular (ecuación 2), se reemplaza en 1:

$$\Omega^2 = \frac{G * g}{R} \quad (2)$$

$$Q = 3,1 * 10^{-7} * \{2 * \pi * 0,75 * (0,075)^2 * 8000\}$$

$$Q = 0,000876 \left[\frac{m}{s} \right]$$

$$Q = 3155,3 \left[\frac{L}{h} \right]$$

Posteriormente, es necesario calcular el tiempo que tomará procesar todo el flujo necesario. Para esto, se revisa si los valores calculados del flujo a procesar y los valores informados en el catálogo del producto son coherentes, observándose según catálogo un flujo a procesar de 3000 [L/h], lo que indica que el producto existe.

Se calcula entonces, el tiempo que tomaría procesar todo el flujo según la capacidad informada en catálogo.

$$t = \frac{F30}{Q} \quad (3)$$

$$t = 10,4 [h]$$

Dada la considerable cantidad de horas que demoraría el uso de una sola centrífuga, se decide dividir el flujo total en dos centrífugas paralelas que permitan reducir el tiempo de procesamiento y así evitar posibles descomposiciones dentro del proceso. Por lo tanto, el tiempo total de procesamiento dividido en dos centrífugas corresponde a:

$$t_{(2 \text{ centrífugas})} = 5,2 [h]$$

10.6.4 Secador

Para el dimensionamiento del secador spray se siguió el procedimiento detallado en la tesis de L. A. Martínez titulada “dimensionamiento y simulación de un secador por aspersión de nivel piloto”.

Los datos por utilizar en el dimensionamiento se presentan en la Tabla A19 (para más detalle de los supuestos tras cada dato ver Planilla SCP).

Tabla A 20: Datos para el dimensionamiento del secador.

Datos Bibliográficos				
Descripción	Símbolo	Magnitud	Unidad	Referencia
Capacidad calórica del aire seco	C_{pa}	1005	[J/kg*K]	[74]
Capacidad calórica del vapor de agua	C_v	1884	[J/kg*K]	[74]
Humedad del aire a la entrada	Y_1	0,01	[kg_agua/kg_gas]	-
Temperatura del aire a la entrada de la cámara	T_{a1}	438,15	[K]	[34]
Temperatura de referencia	T_0	273,15	[K]	[74]
Calor latente de vaporización a T0	λ_0	2502300	[J/kg]	[74]
Capacidad calorífica del sólido	C_{pss}	3933	[J/kg*K]	[75]
Temperatura del sólido a la entrada de la cámara	T_{s1}	277,15	[K]	-
Capacidad calórica del agua	C_{pw}	4186	[J/kg*K]	[74]
Temperatura del sólido a la salida de la cámara	T_{s2}	338,15	[K]	[74]
Humedad de la gota a la salida	X_2	0,05	[kg_agua/kg_sólidoseco]	[32]
Concentración en la alimentación	C_{alim}	1112	[kg sólido/m^3]	-
Densidad de la alimentación	ρ_{alim}	1112	[kg/m3]	[73]
Temperatura del aire a la salida de la cámara	T_{a2}	348,15	[K]	-
Presión de trabajo en Puerto Montt	P_t	102800	[Pa]	[76]
Peso molecular del aire	M_B	28,97	[kg/mol]	[74]
Peso molecular del agua	M_A	18,02	[kg/mol]	[74]
Cte. Antoine	A_A	8	-	[74]
Cte. Antoine	B_A	1730	-	[74]
Cte. Antoine	C_A	233	-	[74]
Cantidad a secar	F31	972,968183	[kg]	BM
Tiempo de trabajo	T	4	[h]	BM
Flujo a trabajar	F_m	0,06756723	[kg/s]	BM
Diámetro del atomizador	D_r	5	[cm]	[74]
Altura de la paleta del atomizador	h_p	0,009525	[m]	[74]
N° de paletas del atomizador	N_p	24	-	[74]
Velocidad angular	N	833	[rps]	[74]
Viscosidad dinámica agua	μ_{agua}	0,00032	[N*s*m^2]	
Viscosidad dinámica levadura	$\mu_{levadura}$	0,368	[N*s*m^2]	[77]
Viscosidad de la alimentación	μ_s	0,45992	[N*s*m^2]	-

Viscosidad de la alimentación	μ_s	4,5992	[poise]	-
Densidad del solido seco	ρ_{ss}	1112	[kg/m3]	[74]
Densidad de la alimentación	ρ_s	1112	[kg/m3]	[74]
Densidad del agua	ρ_w	1000	[kg/m3]	-
Temperatura de bulbo seco del aire de secado	t_{bs}	311,15	[K]	-
Temperatura de la gota en el punto crítico	t_{sc}	311,15	[K]	-
Calor latente de vaporización a Tbh	λ_{bh}	2410760	[J/kg]	-
Humedad de la gota en base húmeda en tiempo t	X_1	0,8	[kg_agua/kg_sólido seco]	[58]

El dimensionamiento se divide en 4 partes:

- 1) Cálculo de la humedad del aire a la salida de la cámara de secado para conocer la humedad relativa. La humedad relativa debe ser menor o igual a la humedad de equilibrio del producto (5%) para que el secador cumpla su función.
- 2) Si se cumple la condición de 1) se procede al cálculo del diámetro de gota asperjada, diámetro crítico, humedad crítica y T° crítica (el punto crítico corresponde al momento en el que la gota permanece a un tamaño constante).
- 3) Cálculo del tiempo de secado y tiempo de viaje desde la entrada al borde de la cámara. El tiempo de secado debe ser menor al tiempo de viaje para evitar que las gotas queden adheridas al borde.
- 4) Cálculo de las dimensiones.

NOTA: las descripciones y unidades de cada parámetro presente en las ecuaciones a continuación, se encuentran explicados en la Tabla A19.

10.6.4.1 Cálculo humedad relativa

Se escribe el balance de materia y el balance de energía del sistema:

$$F_m \cdot (h_{s1} - h_{s2}) = G_m \cdot (H_{a2} - H_{a1}) \quad (1)$$

$$F_m \cdot (X_1 - X_2) = G_m \cdot (Y_2 - Y_1) \quad (2)$$

Donde:

X_1 : humedad de la gota en la entrada [kg agua/kg sólido]

X_2 : humedad de la gota en la salida [kg agua/ kg sólido]

Y_1 : humedad del aire en la entrada [kg agua/kg gas]

Y_2 : humedad del aire en la salida [kg agua/kg gas]

h_{s2} : entalpía del sólido a la salida de la cámara $\left[\frac{J}{kg}\right]$

h_{s1} : entalpía del sólido a la entrada de la cámara $\left[\frac{J}{kg}\right]$

H_{a1} : entalpía del aire a la entrada de la cámara $\left[\frac{J}{kg}\right]$

H_{a2} : entalpía del aire a la salida de la cámara $\left[\frac{J}{kg}\right]$

Se conocen también las expresiones de las entalpías:

$$h_{s1} = C_{ps} \cdot (T_{s1} - T_0) + X_1 \cdot C_{pw} \cdot (T_{s1} - T_0) \quad (3)$$

$$h_{s2} = C_{ps} \cdot (T_{s2} - T_0) + X_2 \cdot C_{pw} \cdot (T_{s2} - T_0) \quad (4)$$

$$H_{a1} = (C_{pa} + C_v \cdot Y_1) \cdot (T_{a1} - T_0) + \lambda_0 \cdot Y_1 \quad (5)$$

$$H_{a2} = (C_{pa} + C_v \cdot Y_2) \cdot (T_{a2} - T_0) + \lambda_0 \cdot Y_2 \quad (6)$$

Reemplazando la ec. 6 en la ec. 2 e igualando con la ec. 1 se despeja Y_2 y se calcula:

$$Y_2 = \frac{[H_{a1} - C_{pa} \cdot (T_{a2} - T_0)] \cdot (X_1 - X_2) + Y_1 \cdot (h_{s2} - h_{s1})}{h_{s2} - h_{s1} + [C_v \cdot (T_{a2} - T_0) + \lambda_0] \cdot (X_1 - X_2)} \quad (7)$$

$$H_{a1} = 193.956,6 \left[\frac{J}{kg}\right]$$

$$h_{s1} = 29.127,2 \left[\frac{J}{kg}\right]$$

$$h_{s2} = 269.249,5 \left[\frac{J}{kg}\right]$$

$$Y_2 = 0,041 \left[\frac{kg \text{ agua}}{kg \text{ gas}}\right]$$

Luego, se calcula la humedad relativa con la siguiente ecuación:

$$\%HR = \frac{P_A}{P_0} \cdot 100 \quad (8)$$

Donde:

$P_A = \text{presión parcial del agua [Pa]}$

$P_0 = \text{presión del vapor de agua a la } T^\circ \text{ del aire de salida [Pa]}$

Los valores de P_0 y P_A se calculan como sigue:

$$\log P = A_A - \frac{B_A}{T_{ax} + C_A} \quad (9)$$

Donde $T_{ax} = T_{a2}$

$$P_A = \frac{Y_2 \cdot P_t \cdot M_B}{M_A + Y_2 \cdot M_B} \quad (10)$$

Reemplazando los datos entregados en la Tabla A19, se obtiene:

$$P_0 = 14061740,3 \text{ [Pa]}$$

$$P_A = 6370,14 \text{ [Pa]}$$

$$\%HR = 0,045$$

El valor obtenido cumple con la condición de ser menor que la humedad de equilibrio del sólido, por lo tanto, el secado es factible en estas condiciones.

Por último, se calcula el flujo de gas necesario reemplazando Y_2 en la ec.1:

$$G_m = 1,63 \left[\frac{kg}{s} \right]$$

Se procede a la segunda fase de cálculo.

10.6.4.2 Cálculo del diámetro de gota asperjada, diámetro crítico, humedad crítica y T° crítica.

Existen correlaciones para calcular el diámetro de sauter, que se define como el diámetro de una gota que tiene la misma relación superficie-volumen que la de todas las gotas formadas por la aspersión. Dichas correlaciones dependen de las características del atomizador. En este caso, se escoge un atomizador rotatorio de diámetro entre 5 a 15 [cm], con altas velocidades periféricas, cuyas dimensiones se encuentran en la Tabla A19. La correlación es la siguiente:

$$D_{vs} = 5240 \cdot M_p^{0.171} \cdot (\pi \cdot D_r \cdot N)^{-0.537} \cdot \mu_s^{-0.017} \quad (11)$$

Donde

M_p : flux másico de la alimentación por cada paleta del atomizador $\left[\frac{g}{s \cdot cm}\right]$:

$$M_p = \frac{F}{h_p \cdot n_p} \quad (12)$$

$$M_p = 2,96 \left[\frac{g}{s \cdot cm}\right]$$

$$D_{vs} = 37,8 [\mu m]$$

Finalmente, el dimensionamiento de la cámara se realizará según el D_{95} , que corresponde al diámetro dentro del que se encuentra el 95% de las gotas asperjadas:

$$D_{95} = 1.4 \cdot D_{vs} \quad (13)$$

$$D_{95} = 53 [\mu m]$$

Se continua con la determinación de los parámetros críticos. El diámetro crítico (diámetro en el punto en que permanece constante) se calcula como sigue:

$$D_c = D_{95} \cdot \left[\frac{\rho_s \cdot (1 + X_2)}{\rho_{ss} \cdot (1 + X_1)} \right]^{\frac{1}{3}} \quad (14)$$

$$D_c = 44,3 [\mu m]$$

Luego, para calcular la humedad absoluta de la gota y del aire en el punto crítico (X_c, Y_c), se debe calcular la humedad removida de la gota (a_r) y la humedad remanente de la gota (a_p), según las siguientes ecuaciones:

$$a_r = \frac{\pi}{6} \cdot (D_{95}^3 - D_c^3) \cdot \rho_w \quad (15)$$

$$a_p = \frac{\pi \cdot D_{95}^3}{6} \cdot X_{1h} \cdot \rho_s - a_r \quad (16)$$

Donde X_{1h} : *humedad de la gota en base húmeda en la entrada de la cámara*

$$X_{1h} = \frac{1}{X1 + 1} = 0,44 \left[\frac{kg \text{ agua}}{kg \text{ sólido húmedo}} \right]$$

$$X_c = \frac{a_p}{\left(\frac{\pi \cdot D_{95}^3}{6} \right) \cdot C_{alim}} \quad (17)$$

$$Y_c = Y_1 + \frac{F_m \cdot (X_1 - X_c)}{G_m} \quad (18)$$

$$a_r = 3,24 * 10^{-11} \left[\frac{kg \text{ agua}}{gota} \right]$$

$$a_p = 6,03 * 10^{-12} \left[\frac{kg \text{ agua}}{gota} \right]$$

$$X_c = 0,07 \left[\frac{kg \text{ agua}}{kg \text{ solido seco}} \right]$$

$$Y_c = 0,04 \left[\frac{kg \text{ agua}}{kg \text{ gas}} \right]$$

Finalmente, se calcula la entalpía de los sólidos y la entalpía del aire en el punto crítico (h_{sc} y H_{ac}) para conocer la temperatura del aire en el punto crítico (T_c):

$$h_{sc} = C_{pss} \cdot (T_{sc} - T_0) + X_c \cdot C_{pw} \cdot (T_{sc} - T_0) \quad (19)$$

$$H_{ac} = \frac{F_m \cdot (h_{s1} - h_{sc})}{G_m} + H_{a1} \quad (20)$$

$$T_{ac} = \frac{H_{ac} - \lambda_0 \cdot Y_c}{(C_{pa} + C_v \cdot Y_c)} + T_0 \quad (21)$$

$$h_{sc} = 160548,07 \left[\frac{J}{kg} \right]$$

$$H_{ac} = 188508,44 \left[\frac{J}{kg} \right]$$

$$T_{ac} = 354,32 [K]$$

Todos los valores calculados anteriormente son útiles para conocer el tiempo de secado de las gotas asperjadas dentro de la cámara.

10.6.4.3 Cálculo del tiempo de secado y tiempo de viaje de la gota asperjada

El tiempo de secado se divide en dos periodos: el secado a velocidad constante (t_c) y el secado a velocidad decreciente (t_d), la suma de ambos entrega el tiempo total (t_T) de secado:

$$t_T = t_c + t_d \quad (22)$$

Las ecuaciones para calcular cada uno de los tiempos se presentan a continuación:

$$t_c = \frac{\lambda_{bh} \cdot \rho_w}{8 \cdot \Delta T_{ml1} \cdot k_{d1}} \cdot (D_{95}^2 - D_c^2) \quad (23)$$

$$t_d = \frac{\lambda_{bh} \cdot D_c^2 \cdot \rho_{ss}}{12 \cdot k_{d1} \cdot \Delta T_{ml2}} \cdot (X_c - X_2) \quad (24)$$

Donde:

k_{d1} : conductividad térmica de la película de aire que rodea a la gota $\left[\frac{J}{s \cdot m \cdot K} \right]$

La conductividad se calcula con una ecuación polinómica a una temperatura promedio entre el aire a la salida de la cámara y el sólido a la salida de la cámara ($T_{(k1)} = 343,15$ [K]). Mientras que los deltas de temperatura medio logarítmico se calculan entre las temperaturas de entrada y el punto crítico (fase constante) y las temperaturas de salida y el punto crítico (fase decreciente).

$$k_d = -3 \cdot 10^{-8} \cdot T^2 + 8 \cdot 10^{-5} \cdot T + 0.0241 \quad (24)$$

$$\Delta T_{ml1} = \frac{(T_{a1} - T_{s1}) - (T_{ac} - T_{sc})}{\ln \left(\frac{T_{a1} - T_{s1}}{T_{ac} - T_{sc}} \right)} \quad (24)$$

$$\Delta T_{ml2} = \frac{(T_{ac} - T_{sc}) - (T_{a2} - T_{s2})}{\ln \left(\frac{T_{ac} - T_{sc}}{T_{a2} - T_{s2}} \right)} \quad (24)$$

Resolviendo cada ecuación se obtiene el tiempo total de secado:

$$k_d = 0,048 \left[\frac{J}{s \cdot m \cdot K} \right]$$

$$\Delta T_{ml1} = 63,02 [K]$$

$$\Delta T_{ml2} = 22,68 [K]$$

$$t_c = 0,084 [s]$$

$$t_d = 0,0079 [s]$$

$$t_T = 0,092 [s]$$

Es decir, el tiempo de secado de cada gota es de aproximadamente 0,1 segundos.

Luego, es necesario calcular la velocidad de las gotas, para conocer si es posible secarlas antes de que lleguen a la pared de la cámara. Dicha velocidad se divide en tres componentes: axial (V_{v0}), radial (V_{r0}) y tangencial (V_{t0}). Sin embargo, la velocidad axial se considera despreciable, por lo que se calculan las otras dos con las siguientes ecuaciones.

$$V_{t0} = \pi \cdot D_r \cdot N \quad (25)$$

$$V_{r0} = \left(\frac{\rho_s \cdot Q_v^2 \cdot \omega^2 \cdot \frac{D_r}{2}}{3 \cdot \mu_s \cdot h_p^2} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (26)$$

Donde:

Q_v : alimentación volumétrica por paleta $\left[\frac{m^3}{s} \right]$

ω : velocidad angular del atomizador $\left[\frac{rad}{s} \right]$

$$Q_v = F_m \cdot \rho_s \cdot N_p \quad (27)$$

$$\omega = 2 \cdot \pi \cdot N \quad (28)$$

Reemplazando los datos en cada una de las ecuaciones se obtiene:

$$Q_v = 0,00000253 \left[\frac{m^3}{s} \right]$$

$$\omega = 5233,89 \left[\frac{rad}{s} \right]$$

$$V_{v0} = 0 \left[\frac{m}{s} \right]$$

$$V_{r0} = 0,678 \left[\frac{ft}{s} \right] = 0,207 \left[\frac{m}{s} \right]$$

$$V_{t0} = 130,85 \left[\frac{m}{s} \right]$$

Finalmente, la velocidad resultante de la gota (V_{res}) se calcula como:

$$V_{res} = \sqrt{V_{t0}^2 + V_{r0}^2 + V_{v0}^2} \quad (29)$$

$$V_{res} = 130,85 \left[\frac{m}{s} \right]$$

Por último, se calcularán las dimensiones de la cámara de secado asumiendo que el tiempo de viaje es igual al tiempo total de secado. Es decir, al tiempo crítico en que la gota alcanza a secarse antes de tocar las paredes.

10.6.4.4 Dimensiones

La ecuación para calcular el radio de la cámara de secado es la siguiente:

$$R_{camara} = \left[t_T \cdot 2.4 \cdot V_{res} \cdot \left(b \cdot \frac{D_r}{2} \right)^{\frac{1}{2}} \right]^{\frac{1}{2}} + \frac{D_r}{4} \quad (30)$$

Donde:

b : anchura de un chorro con la misma velocidad angular que la alimentación $\left[\frac{m}{s} \right]$

$$b = \frac{F}{\rho_{a2} \cdot 2 \cdot \pi \cdot \frac{D_r}{2} \cdot V_{res}} \quad (31)$$

Donde

ρ_{a2} : densidad de la mezcla a la salida de la cámara $\left[\frac{kg}{m^3} \right]$

$$\rho_a = \frac{1 + Y_x}{V_{hx}} \quad (32)$$

Donde:

V_{hx} : volumen húmedo de la mezcla a la salida de la cámara $\left[\frac{m^3}{kg \text{ gas}} \right]$

$$V_{hx} = 8315 \cdot \left(\frac{1}{M_B} + \frac{Y_x}{M_A} \right) \cdot \frac{T_{ax}}{P_t} \quad (33)$$

Resolviendo:

$$b = 0,0033 \left[\frac{m}{s} \right]$$

$$\rho_{a2} = 1,004 \left[\frac{kg}{m^3} \right]$$

$$V_{hx} = 1,036 \left[\frac{m^3}{kg \text{ gas}} \right]$$

$$R_{cámara} = 0,52 [m]$$

Finalmente, la proporción diámetro/radio de la cámara es la siguiente:

$$D_{camara} = 2 \cdot R_{camara} \tag{34}$$

$$D_{cámara} = 1,04 [m]$$

10.7 Anexo 7: Balances de energía

10.7.1 Calentamientos

En primer lugar, se calculan las necesidades de energía de los medios a los que se les debe aumentar su temperatura. Se asume que la ubicación de la planta es en Puerto Montt, por tanto, la temperatura ambiente promedio será de 15°C. Las reacciones que requieren aumentar su temperatura son las de lixiviación ácida, depolimerización, sacarificación y las fermentaciones. Para las fermentaciones se debe aumentar la temperatura desde 15°C a 121°C dentro del mismo tanque para esterilizar los medios de cultivo. Las fórmulas utilizadas para el balance de energía son:

$$Q = m_{\text{medio}} * C_{p_{\text{medio}}} * \Delta T \quad (1)$$

Donde:

Q = calor requerido por el medio [kJ]

m = masa del medio [kg]

ΔT = variación de la temperatura del medio (final – inicial) [°C]

$C_{p_{\text{medio}}}$ = calor específico del medio $\left[\frac{\text{kJ}}{\text{kg} * \text{K}} \right]$

Para realizar el cálculo del calor requerido es necesario conocer el calor específico de cada medio. Para esto se realiza una ponderación de los componentes dentro del medio utilizando los C_p de cada componente. Los datos utilizados son los siguientes:

Tabla A 21: Calores específicos de sustancias presentes en los medios.

Datos de calores específicos		
Cp glucosa	2,26	[kJ/kg*K]
Cp alga	1,76	[kJ/kg*K]
Cp refrigerante	1,318	[kJ/kg*K]
Cp sulfato amonio	2,89	[kJ/kg*K]
Cp agua	4,189	[kJ/kg*K]

Para el calor específico del alga se asumió el valor de la madera. Para los calores de cada tipo de azúcar se asume el C_p de la glucosa. Se calcula el C_p del líquido sacarificado y del concentrado de manitol dado que se conoce su composición de azúcar. Para el resto de los medios (YPD y líquido depolimerizado) se asume el C_p del líquido sacarificado. Finalmente, el medio algal se asume como agua. Los resultados son los siguientes:

Tabla A 22: Valores de Cp asumidos y calculados para los medios trabajados.

Valores de Cp de los medios		
Líquido sacarificado	4,140	[kJ/kg*K]
Líquido depolimerizado	4,140	[kJ/kg*K]
Concentrado manitol	4,154	[kJ/kg*K]
Medio YPD	4,140	[kJ/kg*K]
Medio algal	4,186	[kJ/kg*K]
Inóculo 2	4,140	[kJ/kg*K]

Los datos de masa de cada flujo y diferencias de temperatura se muestran en la Tabla A23. Reemplazando los valores en (1) se obtiene el calor total a transferir a cada medio.

Tabla A 23: Cálculo del calor necesario para subir la T° de los medios

Calentamientos						
Lixiviación ácida	Flujos [kg/Lote]	Temperatura Inicial [°C]	Temperatura Final [°C]	Cp [kJ/kg*K]	Q[kJ]	Q total [kJ]
F6: alga	6497	15	25	1,76	114348,91	1746159,85
F7: HCl 0,3%	38982,58	15	25	4,19	1631810,94	
Depolimerización	Flujos [kg/Lote]	Temperatura Inicial [°C]	Temperatura Final [°C]	Cp [kJ/kg*K]	Q[kJ]	Q total [kJ]
F8: alga lixiviada	3119	25	50	1,76	137218,69	1497061,15
F13: agua	12994	25	50	4,19	1359842,45	
Sacarificación	Flujos [kg/Lote]	Temperatura Inicial [°C]	Temperatura Final [°C]	Cp [kJ/kg*K]	Q[kJ]	Q total [kJ]
F20: líquido depolimerizado	12962	15	25	4,14	536625,66	544764,32
F21: Crudo Oligo AL	194	15	25	4,19	8138,66	
Fermentador 1	Flujos [kg/Lote]	Temperatura Inicial [°C]	Temperatura Final [°C]	Cp [kJ/kg*K]	Q[kJ]	Q total [kJ]
F25: líquido sacarificado	359,93	15	121	4,14	157953,13	157953,13
Fermentador 2	Flujos [kg/Lote]	Temperatura Inicial [°C]	Temperatura Final [°C]	Cp [kJ/kg*K]	Q[kJ]	Q total [kJ]
F25: líquido sacarificado	359,93	15	121	4,14	157953,13	1361868,47
F26: medio YPD	2743,35	15	121	4,14	1203915,34	
Fermentador 3	Flujos [kg/Lote]	Temperatura Inicial [°C]	Temperatura Final [°C]	Cp [kJ/kg*K]	Q[kJ]	Q total [kJ]
F24: L. sacari.	12799,26	15	121	4,14	5616942,72	14064123,27
F11: c. mannitol	15980,52	15	121	4,15	7036330,52	
F27: inóculo 2	3103,12	15	121	4,14	1361799,32	
F29: sulf. De amonio	160,1185382	15	121	2,89	49050,71	

Se considera que todos los calores de calentamiento son entregados por resistencias eléctricas ubicadas en los tanques.

10.7.2 Enfriamientos

Las masas por enfriar son: la segunda etapa del depolimerizado, los medios de cultivo de los fermentadores para esterilización y el flujo de entrada a la centrífuga que opera a 4°C. Los cálculos se realizan con la ecuación 1 y la ecuación de los intercambiadores de calor. Dado que la mayoría (excepto la centrífuga) son masas que enfriar y no flujos, se calcula el tiempo que demora el enfriamiento utilizando la ecuación 2.

$$\dot{Q} = U * A * \Delta T_{ML} \quad (2)$$

$$\Delta T_{ML} = \frac{(T_{c,s} - T_{f,s}) - (T_{c,e} - T_{f,e})}{\ln\left(\frac{T_{c,s} - T_{f,s}}{T_{c,e} - T_{f,e}}\right)} \quad (3)$$

Donde:

\dot{Q} = energía transferida por segundo $\left[\frac{kJ}{s}\right]$

U = coeficiente global de transferencia de calor $\left[\frac{kJ}{m^2 \cdot s}\right]$

A = área de transferencia del intercambiador $[m^2]$

$T_{x,s}$ = temperatura del fluido frío o caliente a la salida $[^{\circ}C]$

$T_{x,e}$ = temperatura del fluido frío o caliente a la entrada $[^{\circ}C]$

Para el enfriamiento del reactor de depolimerización se asume el uso de resistencias a través de una chaqueta eléctrica, por lo que no se calcula un flujo de servicio.

Para el enfriamiento del fermentador 3 se utilizará el mismo intercambiador cuya área fue calculada en la sección de mantenciones (ver siguiente sección). Mientras que, para los otros dos fermentadores, se considera el uso de una chaqueta de enfriamiento del área del manto del tanque como intercambio. Finalmente, para el flujo de enfriamiento de la centrífuga se calcula el área necesaria del intercambiador para remover el flujo de calor.

Se asume que el coeficiente de transmisión de calor del medio de cultivo es de $5.000 \left[\frac{W}{m^2K}\right]$ y el coeficiente del líquido frío es de $10.000 \left[\frac{W}{m^2K}\right]$. Además de que las paredes del intercambiador son muy delgadas y conductores. Así, se calcula U como:

$$\frac{1}{U} = \frac{1}{h_c} + \frac{1}{h_f} \quad (4)$$

El procedimiento consiste en asumir la T° de salida del flujo frío, usar la ecuación (1) para determinar la masa de servicio de enfriamiento, calcular el ΔT_{ML} , calcular el área de las chaquetas (excepto para el fermentador 3 y la centrífuga), calcular \dot{Q} con la ecuación 2 y finalmente dividir Q en \dot{Q} para conocer el tiempo.

En la Tabla A24 se muestran los resultados para los flujos de servicio, áreas de intercambiadores y tiempos necesarios para la remoción de calor.

Tabla A 24: Flujos de calor a remover, kilogramos de flujo de servicio, tiempo de enfriamiento y cálculos de área de los intercambiadores.

Enfriamientos										
Depolimerización	Flujos [kg/Lote]	Temperatura Inicial [°C]	Temperatura Final [°C]	Cp [kJ/kg*K]	Q[kj]	Q[kj] total				
F8: alga lixiviada	3118,61	50	25	1,76	-137218,69	-1502500,52				
F13: agua	12994,19	50	25	4,19	-1359842,45					
F16: M9 buffer	51,98	50	25	4,19	-5439,37					

Fermentador 1	Flujos [kg/Lote]	Temperatura Inicial [°C]	Temperatura Final [°C]	Cp [kJ/kg*K]	Q[kj]					
F25: liq sacarificado	359,93	121	30	4,14	-135601,27					
FE1	Flujos [kg/Lote]	Temperatura Inicial [°C]	Temperatura Final [°C]	Cp [kJ/kg*K]	Q[kj]	U [kW/m²*°C]	A [m²]	ΔT [°C]	Q [kJ/h]	t [min]
Agua	1799,67	10	28	4,19	135601,27	3,30	3,02	27,14	974990,64	8,34

Fermentador 2	Flujos [kg/Lote]	Temperatura Inicial [°C]	Temperatura Final [°C]	Cp [kJ/kg*K]	Q[kj]					
F25: líquido sacarificado	359,93	121	30	4,14	-135601,27					
F26: medio YPD	2743,35	121	30	4,14	-1033549,96					
FE2	Flujos [kg/Lote]	Temperatura Inicial [°C]	Temperatura Final [°C]	Cp [kJ/kg*K]	Q[kj]	U [kW/m²*°C]	A [m²]	ΔT [°C]	Q [kJ/h]	t [min]
Agua	15516,69	10	28	4,19	1169151,23	3,30	13,17	27,14	4246577,85	16,52

Fermentador 3	Flujos [kg/Lote]	Temperatura Inicial [°C]	Temperatura Final [°C]	Cp [kJ/kg*K]	Q[kj]					
F24: L. sacari.	12799,26	121	30	4,14	-4822092,33					
F11: c. mannitol	15980,52	121	30	4,15	-6040623,37					
F27: inóculo 2	3103,12	121	30	4,14	-1169091,87					
F29: sulf. De amonio	160,12	121	30	2,89	-42109,57					
FE3	Flujos [kg/Lote]	Temperatura Inicial [°C]	Temperatura Final [°C]	Cp [kJ/kg*K]	Q[kj]	U [kW/m²*°C]	A [m²]	ΔT [°C]	Q [kJ/h]	t [min]
Agua	160242,04	10	28	4,19	12073917,15	3,30	356,81	29,64	125629178,07	5,77

Centrifuga 1	Flujos [kg/s]	Temperatura Inicial [°C]	Temperatura Final [°C]	Cp [kJ/kg*K]	Q[kj/s]					
F31: medio algal	2,25	30	4	4,19	-245,34					
FE4	Flujos [kg/s]	Temperatura Inicial [°C]	Temperatura Final [°C]	Cp [kJ/kg*K]	Q[kj/s]	U [kW/m²*°C]	A [m²]	ΔT [°C]		
Refrigerante	12,43	-10	-2	2,41	245,34	3,75	1734,68	26,51		

10.7.3 Mantenciones

El flujo de calor necesario para las mantenciones se calcula como la suma de la entalpía de reacción (ΔH_{rxn}), el trabajo mecánico realizado por el sistema (w_s) y el calor cedido al ambiente por convección (Q_p), como se muestra en la siguiente ecuación (se asume que no existe cambio de fase):

$$Q_m = (\Delta H_{rxn}) + w_s - Q_p \quad (5)$$

El trabajo mecánico realizado por el sistema corresponde a la potencia de los agitadores calculada en el dimensionamiento.

El calor cedido por los sistemas se calculará con la ecuación 2, en donde $\Delta T = (T_c - T_f)$. Para eso es necesario estimar el valor de U, que se calcula con la siguiente formula de transferencia en paredes cilíndricas:

$$\frac{1}{U} = \frac{1}{h_{th}} + \frac{1}{h_h} + \frac{B}{k} + \frac{1}{h_c} + \frac{1}{h_{tc}} \quad (6)$$

Donde:

$$h_h: \text{Coeficiente de transmisión de calor en el fluido caliente} = 5000 \left[\frac{W}{m^2 K} \right]$$

$$h_c: \text{Coeficiente de transmisión de calor en el fluido frío} = 26 \left[\frac{W}{m^2 K} \right]$$

$$h_{tc}: \text{Factor de ensuciamiento por el lado del fluido frío} = 0 \left[\frac{W}{m^2 K} \right]$$

$$h_{th}: \text{Factor de ensuciamiento por el lado del fluido caliente} = 1700 \left[\frac{W}{m^2 K} \right]$$

$$k: \text{Conductividad térmica; } = 16 \text{ (acero inoxidable)} \left[\frac{W}{m K} \right]$$

B: ancho de la pared= se asume de 5 [mm] para todos los reactores [m]

Reemplazando se obtiene

$$U = 24,10 \left[\frac{W}{m^2 K} \right] = 0,0241 \left[\frac{kW}{m^2 K} \right]$$

Utilizando el área (manto) de cada reactor como área de intercambio y las temperaturas calientes en cada operación, se obtienen los kW cedidos en la siguiente tabla:

Tabla A 25: Cálculo del calor cedido por convección al ambiente.

Equipo	Tc °C	Tf °C	A_ext [m^2]	U [KW/m^2*s]	Q_p [kW]
Lixiviación ácida (reactor 1)	25,0	15,0	33,5	0,0	8,1
Depolimerización (reactor 1)	50,0	15,0	33,5	0,0	28,3
Depolimerización (reactor 1)	25,0	15,0	33,5	0,0	8,1
Sacarificación (reactor 3)	25,0	15,0	26,6	0,0	6,4
Fermentación 1	30,0	15,0	3,0	0,0	1,1
Fermentación 2	30,0	15,0	13,2	0,0	4,8
Fermentación 3	30,0	15,0	60,9	0,0	22,0

Una vez obtenido el calor cedido por la potencia de agitación y el calor cedido al ambiente, se calcula el ΔH_{rxn} .

Para los fermentadores el valor corresponde a:

$$\Delta H_{rxn} = -a * 460 \left[\frac{kJ}{mol O_2 consumido} \right] \quad (7)$$

Para el fermentador 1 este valor es cero, dado que se asume que no hay consumo de sustrato, por lo que el valor de $\left[\frac{mol O_2 consumido}{mol sustrato consumido} \right]$ es cero.

Para el resto de los fermentadores se utiliza el valor de a calculado en la sección consumo de sustrato (ver Anexo 5). Dicho valor debe ser multiplicado por la cantidad de moles de sustrato consumidos, como sigue:

$$\Delta H_{rxn} = -a \left[\frac{mol O_2}{mol sustrato} \right] * consumo [g sustrato] * \frac{1}{PM_{sustrato}} \left[\frac{mol sustrato}{g sustrato} \right] * 460 \quad (8)$$

Reemplazando:

$$\Delta H_{rxn_{fermentador2}} = -2.806,5 [kJ]$$

$$\Delta H_{rxn_{fermentador3}} = -16761156,3 [kJ]$$

Asumiendo un crecimiento en estado estacionario, se puede dividir el calor por el tiempo de mantención, que corresponde a 24 y 36 horas respectivamente, obteniéndose el flujo de calor de los fermentadores:

$$\Delta H_{rxn_{fermentador2}} = -0,03 [kW]$$

$$\Delta H_{rxn_{fermentador3}} = -129,33 [kW]$$

Para los reactores, la entalpía de reacción se calcula con la entalpía de combustión:

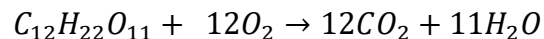
$$\Delta H_{rxn} = -\Delta H_{combustión} = \Sigma(\Delta H_{comb})_{productos} - \Sigma(\Delta H_{comb})_{reactivos} \quad (9)$$

Sin embargo, no se conocen con exactitud las reacciones que ocurren en cada reactor. Se sabe que en el primer reactor reacciona un compuesto de potasio con HCl y forma KCl, mientras que en la depolimerización se forman oligoalginatos desde alginato y en la sacarificación se forman monómeros de alginato desde oligo alginato. Además, no se conocen las composiciones de los medios (gramos o moles presentes) para poder transformar los [kJ/mol] en [kJ].

Aun así, se estimará el valor de la reacción de sacarificación, asumiendo que el compuesto de mayor tamaño es sacarosa y el monómero glucosa. Luego, se utilizará la cantidad de gramos de DEHU y glucosa en la sacarificación para estimar el calor.

El calor de combustión de la glucosa es: $(\Delta H_{comb.})_{glucosa} = -2816,8 \left[\frac{kJ}{mol} \right]$

De la sacarosa se conoce su entalpía de formación (ΔH°), por lo que se calcula su calor de combustión:



$$(\Delta H_{comb.})_{sacarosa} = (12 * -393,5 + 11 * -284,67) - -2221,2 \left[\frac{kJ}{mol} \right]$$

$$(\Delta H_{comb.})_{sacarosa} = -5632,17 \left[\frac{kJ}{mol} \right]$$

$$(\Delta H_{rxn}) = -(-2816,8 - -5632,17) \left[\frac{kJ}{mol} \right]$$

$$(\Delta H_{rxn}) = -2815,37 \left[\frac{kJ}{mol} \right]$$

Ahora, multiplicando por los [kg] de azúcar presentes en el líquido sacarificado y el peso molar:

$$\Delta H_{rxn} = -2815,37 \left[\frac{kJ}{mol} \right] * \frac{1}{PM_{glucosa}} * gr. glu_{liq.sacarificado} \quad (9)$$

$$\Delta H_{rxn} = -4585008,8 [kJ]$$

Finalmente, se divide por el tiempo de mantención de la etapa (20 horas) en segundos.

$$\Delta H_{rxn} = -63,68 \left[\frac{kJ}{s} \right] = [kW]$$

Reemplazando todos los calores en la ecuación 5, se obtienen los resultados expuestos en la Tabla A26.

Tabla A 26: Resultados del calor de mantención de cada etapa estudiada.

Equipo	Q _p [kW]	ws [kW]	ΔH _{rxn} [kW]	Q _m [kW]	Q _m [kJ/s]
Lixiviación ácida (reactor 1)	8,08	-2,14	-	10,22	10,22
Depolimerización fase 1(reactor 1)	28,30	-2,14	-	30,44	30,44
Depolimerización fase 2 (reactor 1)	8,08	-2,14	-	10,22	10,22
Sacarificación (reactor 3)	6,41	-4,28	-63,68	-53,00	-53,00
Fermentación 1	1,09	-0,01	0,00	1,10	1,10
Fermentación 2	4,76	-0,06	-0,03	4,79	4,79
Fermentación 3	22,02	-0,27	-129,33	-107,04	-107,04

Como se observa, el calor de mantención de las primeras reacciones tiene un orden de magnitud bajo, por lo que se asumirá que el calor de reacción será mayor al calor perdido y se hará necesario el enfriamiento. Sin embargo, este se realizará con una chaqueta eléctrica que tenga la posibilidad de realizar enfriamiento y calentamiento, junto con un sensor de temperatura.

Por otro lado, el fermentador uno y dos requieren calentamiento, el que se realiza con las mismas resistencias eléctricas consideradas para la esterilización.

Finalmente, el calor del fermentador de mayor tamaño deber ser removido, por lo que se dimensionará un intercambiador de calor. Se asume que el coeficiente de transmisión de calor del medio de cultivo es $5000 \left[\frac{W}{m^2K} \right]$ y del agua de enfriamiento es $10000 \left[\frac{W}{m^2K} \right]$. Se asume también una T° de salida del fluido frío de 28°. Se obtiene entonces que se requiere un intercambiador de $356,81 [m^2]$ (mismo intercambiador para el enfriamiento del fermentador 3) como muestra la Tabla A27.

El ΔT del fermentador se calcula de la siguiente forma, ya que la temperatura del fermentador no varía.

$$\Delta T_A = \frac{2 * T_F - T_{c1} + T_{c2}}{2} \quad (10)$$

Tabla A 27: Cálculo del área del intercambiador interno del fermentador 3.

Mantención fermentador	Flujos [kg/s]	Temperatura Inicial [°C]	Temperatura Final [°C]	Cp [kJ/kg*K]	Q[kj/s]			
F31: medio algal	-	30	30	4,19	-107,04			
FE5	Flujos [kg/s]	Temperatura Inicial [°C]	Temperatura Final [°C]	Cp [kJ/kg*K]	Q[kj/s]	U	A [m^2]	dT [°C]
Agua	460,30	10	28	4,19	107,04	3,30	356,81	11,00

En resumen:

- Los reactores contarán con una chaqueta eléctrica que sea capaz de realizar tanto enfriamientos como calentamientos.
- Los primeros dos fermentadores contarán con resistencias que permitan el calentamiento para la esterilización y para la pérdida de calor, junto con chaquetas enfriadoras con flujos de agua que permitan el enfriamiento luego de la esterilización.
- Finalmente, el fermentador más grande contará con un intercambiador de calor interno que permita retirar el calor de mantención generado por el metabolismo de la levadura, que será el mismo utilizado para retirar el calor de esterilización. Para el calentamiento de esterilización contará con resistencias eléctricas.