



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA,  
BIOTECNOLOGÍA Y MATERIALES

DISEÑO CONCEPTUAL DE UNA PLANTA PILOTO  
PRODUCTORA DE PROTEÍNA UNICELULAR DE  
*TRICHODERMA REESEI* A PARTIR DE RESIDUOS DE LA  
INDUSTRIA ALGAL

**MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA**

CONSUELO SAMANTA DUARTE SALAS

PROFESORA GUÍA:  
MARÍA ELENA LIENQUEO CONTRERAS

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:  
ORIANA SALAZAR AGUIRRE  
STEPHANIE BRAIN ISASI

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por:  
Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico, Fondecyt 1180794  
Centro de Biotecnología y Bioingeniería (CeBiB) FB0001

SANTIAGO DE CHILE  
2021

**RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR AL  
TÍTULO DE:** Ingeniera Civil en Biotecnología  
**POR:** Consuelo Samanta Duarte Salas  
**FECHA:** Abril 2021  
**PROFESOR GUÍA:** María Elena Lienqueo Contreras

**DISEÑO CONCEPTUAL DE UNA PLANTA PILOTO PRODUCTORA DE PROTEÍNA  
UNICELULAR DE *TRICHODERMA REESEI* A PARTIR DE RESIDUOS DE LA  
INDUSTRIA ALGAL**

Uno de los principales problemas a los que se enfrenta el mundo, en particular los países en desarrollo, es el explosivo ritmo de crecimiento de la población. La agricultura convencional podría ser incapaz de suministrar suficientes alimentos (en particular, proteínas) y de satisfacer esa demanda. Este problema se agrava si se considera el cambio climático. Por lo tanto, para enfrentar estos problemas es vital contar con una fuente de proteína alternativa de mayor calidad. Esto es la proteína unicelular (SCP), la cual se obtiene a partir de microorganismos que tienen una rápida tasa de crecimiento, y son capaces de utilizar materias primas de bajo costo como fuentes de carbono.

El objetivo de este trabajo es diseñar una planta piloto que produzca proteína unicelular de *Trichoderma reesei*, utilizando residuos de la industria algal como fuente de carbono. Para ello, se adoptó una metodología que consiste en: diseñar el proceso productivo junto a las operaciones unitarias, determinar los flujos de materia de cada etapa, calcular las dimensiones de los equipos principales, determinar los flujos de energía, calcular los flujos de servicios necesarios en planta, y analizar los resultados obtenidos.

El proceso productivo comienza con la etapa de neutralización donde se aumenta el pH del residuo algal ácido. En seguida viene la depolimerización donde ingresa el residuo de alga y mediante hidrólisis enzimática se obtiene glucosa fermentable. Luego sigue una centrifugación para separar los residuos sólidos del líquido sacarificado. Este último sigue a una etapa de prealimentación donde se mezcla con medio mínimo. Más tarde, se lleva a cabo una fermentación fed-batch, a la que entra un inóculo de *Trichoderma reesei* proveniente de un cultivo de adaptación. Para finalizar, el caldo de fermentación pasa por una filtración y una etapa de secado, donde se consigue la proteína unicelular seca.

Los principales resultados indican que una planta piloto, a partir de 100 kg de residuos de alga, podría producir 3,9 kg de proteína unicelular seca, cada 2 días, con lo que la producción anual podría alcanzar valores de 608 kg de SCP. La planta contaría con 9 equipos, los que serían 2 reactores, 3 bioreactores, 2 centrifugas, un filtro prensa y una estufa de vacío, y el proceso productivo estaría separado en 10 operaciones unitarias. Los principales insumos serían agua fresca, buffer acetato, medio mínimo y medio extracto de levadura peptona dextrosa (YPD), y los principales residuos serían el filtrado posterior a la fermentación y el residuo depolimerizado.

Con lo anterior, se establece que se cumplen los objetivos planteados, desarrollando con éxito el diseño conceptual de una planta piloto para la producción de proteína unicelular de *Trichoderma reesei*, usando residuos de la industria algal como fuente de carbono.

## **Agradecimientos**

A mi profesora guía, María Elena Lienqueo, gracias por su apoyo y preocupación en este largo proceso, por confiar en mis capacidades, y darme tiempo y espacio cuando lo necesité.

A Stephanie Brain, gracias por tus conocimientos, tus consejos, y tu buena disposición.

A todas las personas que, a través de sus trabajos e investigaciones, contribuyeron y permitieron que esta tesis se realizara con éxito.

Al Centro de Biotecnología y Bioingeniería (CeBiB), por las herramientas brindadas, y al Fondecyt 1180794, por el financiamiento.

A Alexandra Elbakyan, gracias por tu heroico aporte a la ciencia.

# Tabla de contenido

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1 Antecedentes generales	1
1.2 Proteína unicelular (Single Cell Protein, SCP)	2
1.3 Industria algal en Chile	4
1.4 Motivación	4
1.5 Objetivos	5
1.5.1 Objetivo general	5
1.5.2 Ojetivos específicos	5
<b>2. Marco teórico</b>	<b>6</b>
2.1 Algas pardas	6
2.2 <i>Trichoderma reesei</i>	7
2.3 Crecimiento de hongos	9
<b>3. Metodología</b>	<b>15</b>
<b>4. Resultados</b>	<b>17</b>
4.1 Proceso productivo	17
4.2 Balances de masa	23
4.2.1 Neutralización	23
4.2.2 Depolimerización	23
4.2.3 Centrifugación I	24
4.2.4 Prealimentación	24
4.2.5 Precultivo	25
4.2.6 Centrifugación II	27
4.2.7 Cultivo de adaptación	27
4.2.8 Fermentación fed-batch	28
4.2.9 Filtración	30
4.2.10 Secado	30
4.2.11 Balance global	31
4.3 Dimensionamientos	31
4.3.1 Tanques agitados y agitadores	31
4.3.2 Centrífugas	35
4.3.3 Filtro	37
4.3.4 Secador	38
4.4 Balance de energía	39
4.5 Servicios y equipos auxiliares	40
4.6 Layout	42
<b>5. Discusiones</b>	<b>45</b>

5.1 Proceso productivo .....	45
5.2 Balance de masa .....	48
5.3 Dimensionamiento .....	49
5.4 Balance de energía.....	50
5.5 Servicios y equipos auxiliares.....	50
5.6 Layout .....	51
<b>6. Conclusiones .....</b>	<b>52</b>
<b>7. Recomendaciones y proyecciones .....</b>	<b>53</b>
<b>8. Bibliografía.....</b>	<b>54</b>
<b>9. Anexos.....</b>	<b>59</b>
9.1 Anexo 1: Crecimiento microbiano .....	59
9.2 Anexo 2: Cálculo concentraciones buffer .....	60
9.3 Anexo 3: Código Matlab.....	60

## Índice de Tablas

<i>Tabla 1: Lineamientos FAO para la composición de aminoácidos .</i>	<i>2</i>
<i>Tabla 2: Ejemplos de organismos utilizados para producción de SCP.</i>	<i>3</i>
<i>Tabla 3: Comparación análisis proximal entre M. Pyrifera y el residuo a utilizar.</i>	<i>7</i>
<i>Tabla 4: Parámetros cinéticos de Trichoderma reesei en diferentes sustratos.</i>	<i>9</i>
<i>Tabla 5: Contenido de proteína producida a partir de sustratos específicos para las especies fúngicas investigadas como fuente de SCP.</i>	<i>13</i>
<i>Tabla 6: Producción de SCP en cultivos mixtos.</i>	<i>13</i>
<i>Tabla 7: Composición de aminoácidos de monocultivo de Trichoderma reesei comparado con el estándar FAO y la harina de soya.</i>	<i>14</i>
<i>Tabla 8: Programación de la operación de los equipos.</i>	<i>17</i>
<i>Tabla 9: Balance de masa en etapa de Neutralización</i>	<i>23</i>
<i>Tabla 10: Balance de masa en etapa de Depolimerización</i>	<i>24</i>
<i>Tabla 11: Balance de masa en etapa de Centrifugación I.</i>	<i>24</i>
<i>Tabla 12: Balance de masa en etapa de Prealimentación.</i>	<i>25</i>
<i>Tabla 13: Balance de masa en etapa de Precultivo.</i>	<i>26</i>
<i>Tabla 14: Balance de masa en etapa de Centrifugación II.</i>	<i>27</i>
<i>Tabla 15: Balance de masa en etapa de Cultivo de adaptación</i>	<i>28</i>
<i>Tabla 16: Balance de masa en etapa de Fermentación.</i>	<i>29</i>
<i>Tabla 17: Balance de masa en etapa de Filtración.</i>	<i>30</i>
<i>Tabla 18: Balance de masa en etapa de Secado</i>	<i>30</i>
<i>Tabla 19: Balance de masa global del proceso.</i>	<i>31</i>

<b>Tabla 20: Dimensionamiento reactor y agitador de etapa de Neutralización y Depolimerización</b>	<b>33</b>
<b>Tabla 21: Dimensionamiento tanque y agitador de etapa de Prealimentación</b>	<b>34</b>
<b>Tabla 22: Dimensionamiento reactor y agitador de etapa de Precultivo</b>	<b>34</b>
<b>Tabla 23: Dimensionamiento bioreactor y agitador de etapa de Cultivo de adaptación</b>	<b>34</b>
<b>Tabla 24: Dimensionamiento bioreactor y agitador de etapa de Fermentación</b>	<b>35</b>
<b>Tabla 25: Dimensionamiento centrífuga tubular de etapa de Centrifugación I</b>	<b>36</b>
<b>Tabla 26: Dimensionamiento centrífuga tubular de etapa de Centrifugación II</b>	<b>37</b>
<b>Tabla 27: Dimensionamiento filtro prensa de etapa de Filtración</b>	<b>38</b>
<b>Tabla 28: Dimensionamiento estufa de vacío de etapa de Secado</b>	<b>39</b>
<b>Tabla 29: Resultados de balance de energía en cada etapa del proceso</b>	<b>40</b>
<b>Tabla 30: Masa total de servicios</b>	<b>42</b>
<b>Tabla 31: Dimensionamiento equipos auxiliares</b>	<b>42</b>

## Índice de Figuras

<i>Figura 1: Trichoderma reesei RUT-C30 cultivada en placas con PDA. ....</i>	<i>8</i>
<i>Figura 2: Curva de crecimiento típica para una población de células cultivadas en medio líquido. ....</i>	<i>10</i>
<i>Figura 3: Metodología general. ....</i>	<i>16</i>
<i>Figura 4: Diagrama de bloques del proceso de producción de SCP de Trichoderma reesei RUT C-30 a partir de residuos algales. ....</i>	<i>21</i>
<i>Figura 5: Flowsheet del proceso de producción de SCP de Trichoderma reesei RUT C-30 a partir de residuos algales. ....</i>	<i>22</i>
<i>Figura 6: Modelo de crecimiento de Trichoderma en Precultivo. ....</i>	<i>26</i>
<i>Figura 7: Modelo de crecimiento de Trichoderma en Cultivo de adaptación. ....</i>	<i>28</i>
<i>Figura 8: Modelo de crecimiento de Trichoderma reesei en Fermentación fed-batch.....</i>	<i>29</i>
<i>Figura 9: Semejanzas geométricas impulsor tipo hélice.....</i>	<i>32</i>
<i>Figura 10: Arreglos básicos: (a) Contraflujo; (b) flujo paralelo; (c) fuente con temperatura constante y receptor con incremento de temperatura; (d) temperatura constante en el receptor y fuente con temperatura en decremento. ....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 11: Layout preliminar de la planta piloto de producción de SCP.....</i>	<i>44</i>
<i>Figura 12: Modelo de crecimiento de Trichoderma reesei en fermentación batch y fedbatch. (A) A las 30 horas de cultivo. (B) A las 50 horas de cultivo. ....</i>	<i>47</i>



## 1. Introducción

### 1.1 Antecedentes generales

Para el año 2050, se necesitaría producir 1250 millones de toneladas de carne y lácteos al año para satisfacer la demanda mundial de proteína animal, a los niveles actuales de consumo [1]. Esto debido a que se espera un aumento de la población mundial cercano al 33% para ese año, en relación al año 2015 [2]. Sin embargo, la creciente demanda de proteínas no podrá satisfacerse de forma sostenible mediante el aumento de la producción de carne y lácteos, debido a que los animales presentan una baja eficiencia de conversión de la proteína vegetal en proteína cárnica [1]. Es por esto que se necesitan nuevas soluciones. La proteína unicelular (SCP, del inglés Single Cell Protein), es decir, la proteína producida en células microbianas y algales es una opción con potencial.

Gran parte del interés reciente en la proteína unicelular se debe a que puede ser utilizada para la suplementación de proteína de una dieta básica, reemplazando fuentes convencionales costosas como la harina de soya y la harina de pescado. Además, la bioconversión de los residuos agrícolas e industriales en alimentos y forrajes ricos en proteínas tiene el beneficio adicional de abaratar el producto final. Por otra parte, haría que la producción de alimentos dependa menos de la tierra, la agricultura y la ganadería [1,3].

Actualmente, la proteína unicelular se produce a partir de muchas especies de microorganismos. Entre ellos se encuentran algas, hongos y bacterias. Estos dos últimos se han convertido en los principales candidatos para su uso como fuentes de SCP, debido a su rápido crecimiento y alto contenido de proteínas.

El uso de microorganismos como alimento no es reciente, de hecho, desde tiempos antiguos, las comunidades cercanas al lago Chad en África y los aztecas cerca del lago de Texcoco en México han estado cosechando *Spirulina* de las aguas y usándola como alimento seco. En cuanto a los hongos, muchas especies se utilizan como alimento rico en proteínas. Las más populares son las especies de levadura *Saccharomyces*, *Fusarium* y *Torulopsis*. Un ejemplo es el Marmite, una pasta untable producida a partir del extracto de levadura que queda como residuo después de la fermentación de la cerveza [1,3].

Existe una gran diversidad de sustratos que son utilizados para cultivar algas, bacterias y hongos. En el caso de los hongos, en su mayoría son residuos de bajo costo, que suministran el carbono y el nitrógeno para el crecimiento. Basándose en el compuesto dominante en los residuos utilizados, se pueden usar hongos específicos para la producción de biomasa.

La producción de SCP y la elección del sustrato y microorganismo deben tomar en cuenta que el valor nutricional de la proteína estará determinado por su composición de aminoácidos. De los 20 aminoácidos que se encuentran comúnmente en la proteína dietética, varios no pueden ser sintetizados por los animales y, por lo tanto, son esenciales y tienen que ser suministrados a través de la dieta. En este contexto, la producción se puede guiar por los lineamientos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) [4] en cuanto al porcentaje recomendado de ciertos aminoácidos para asegurar la calidad de la proteína, presentado en la Tabla 1.

Tabla 1: Lineamientos FAO para la composición de aminoácidos [4].

Aminoácido	Estándar FAO (%)
Treonina	2,8
Valina	4,2
Cisteína	2,0
Metionina	2,2
Isoleucina	4,2
Leucina	4,8
Tirosina	2,8
Fenilalanina	2,8
Lisina	4,2

## 1.2 Proteína unicelular (Single Cell Protein, SCP)

La proteína unicelular o Single Cell Protein (SCP), es la proteína que se produce al cultivar biomasa microbial o algal. Preferentemente se utilizan aquellos microorganismos que contienen más de 30% de proteína en su composición y que pueden proporcionar un balance adecuado de aminoácidos esenciales. A pesar de su nombre, algunos de los microorganismos que se usan como productores son multicelulares, como por ejemplo algas y hongos filamentosos [1,3].

Las altas tasas de crecimiento o la capacidad de utilizar sustratos únicos, como el dióxido de carbono o el metano, dan como resultado procesos que ofrecen una eficiencia y/o sostenibilidad mucho mayor de lo que es posible en la agricultura tradicional [1,3].

Las algas, los hongos (hongos filamentosos y levaduras) y las bacterias pueden utilizarse como SCP, como se ejemplifica en la Tabla 2. En particular, se ha considerado una amplia gama de especies de hongos como fuente de SCP. A nivel comercial, están disponibles productos de *Saccharomyces*, *Fusarium* y *Torulopsis*. Los hongos que se cultivan como SCP generalmente contienen un 30 a 50% de proteína y su composición de aminoácidos se compara favorablemente con las directrices de la FAO (Tabla 1). El contenido de treonina y lisina es típicamente alto, pero el contenido de metionina es relativamente bajo. Por otra parte, la SCP derivada de hongos debiese proporcionar vitaminas principalmente del grupo del complejo B (tiamina, riboflavina, niacina, entre

otras), y aportar fibra dietética. Asimismo, deberían presentar un contenido moderado de ácidos nucleicos (entre un 7 y 10%), que no obstante es demasiado alto para el consumo humano y requiere un procesamiento para reducirlo [1,3].

Tabla 2: Ejemplos de organismos utilizados para producción de SCP.

Organismo	Contenido de proteína (%)	Referencia
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	De Oliveira et al., 1999
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	45	Waghmare et al., 2016
<i>Euglena gracilis</i>	50-70	Rodríguez-Zavala et al., 2010
<i>Bacillus subtilis</i>	71	Kurbanoglu and Algur, 2002
<i>Escherichia coli</i>	66	Kurbanoglu and Algur, 2002
<i>Methylomonas sp.</i>	69	Yazdian et al., 2005
<i>Fusarium venenatum</i>	44	Wiebe, 2002
<i>Candida tropicalis</i>	56	Gao et al., 2012
<i>Yarrowia lipolytica</i>	48-54	Cui et al., 2011

A modo general, las etapas de producción de SCP comienzan con la preparación de los medios de cultivo, posiblemente a partir de desechos agrícolas o industriales, siguen con la fermentación del microorganismo, y terminan con la extracción y purificación de proteína. Además, se puede realizar un procesamiento final para transformar la SCP en ingredientes y productos de interés comercial [1,3].

Al igual que con cualquier alimento de consumo humano o animal, la SCP debe ser segura para su producción y uso. Las normas internacionales, reguladas a través del Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios, se aplican a los productos comercializados internacionalmente. Las principales preocupaciones son el contenido de ARN, las toxinas producidas por microorganismos, los posibles síntomas de alergia y las sustancias nocivas derivadas de la materia prima, como los metales pesados. Las toxinas son metabolitos secundarios producidos por ciertos hongos y bacterias durante el crecimiento. Aunque se utilicen cepas no productoras de toxinas, las cepas de hongos contaminantes a veces producen toxinas en el medio. Cantidades mínimas de micotoxinas son capaces de producir alergias, enfermedades, erupciones en la piel, neurotoxicidad y otros trastornos. Por lo tanto, las toxinas deben ser eliminadas antes y durante el proceso de producción de SCP.

De forma similar, el origen de la materia prima debe ser considerado cuidadosamente pues si bien el uso de diversos tipos de residuos como materias primas es atractivo desde el punto de vista de los costos y la sostenibilidad, puede ser un desafío desde el punto de vista de la seguridad [1,3].

Las condiciones de cultivo, el pretratamiento de los sustratos, la suplementación de nutrientes, los tipos de fermentación y el mejoramiento de las cepas pueden alterar la composición final de la SCP. En particular, las modificaciones genéticas en los organismos usados para producir SCP podrían aumentar el valor nutricional de la

biomasa, ya sea optimizando la composición de aminoácidos o aumentando el contenido de vitaminas específicas, ácidos grasos, etc. junto con la proteína [1,3].

### **1.3 Industria algal en Chile**

En el año 2000, Meneses y Santelices informaron de 576 especies de algas en la costa de Chile. De estas, en los últimos 10 años, el país ha explotado comercialmente apenas 14 especies, según los datos de los anuarios del Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA 2018). [37]

En el período 2006-2016, la composición de los desembarcos totales de algas estuvo dominada por aquellas especies utilizadas como materia prima para la extracción de los tres principales tipos de ficoloides. Las especies de algas pardas cosechadas fueron las fuentes más importantes de alginatos, y en conjunto representaron más del 60% de los desembarques totales de algas en el país que oscilaron entre 200.000 y 390.000 toneladas métricas secas (TMS) anuales. Los desembarcos totales de las algas fuentes de carrageninas variaron entre 50.000 y 78.000 TMS anuales y mostraron las mayores fluctuaciones durante el periodo analizado. En cuanto a las algas productoras de agares, sus volúmenes cosechados han ido disminuyendo desde 2004 hasta la actualidad, alcanzando sólo 41.259 TMS anuales en 2016. [37]

En términos de ingresos económicos, Chile exporta algas marinas como materia prima sin procesar, al igual que hace con otros recursos naturales. La mayoría se secan, se envasan y se exportan a China, Japón, Noruega, Francia (principalmente las algas pardas) y a Canadá, Francia, Dinamarca y Taiwán (principalmente las algas rojas). [37]

### **1.4 Motivación**

En primer lugar, el año 2016 en Chile se generaron cerca de 21,2 millones de toneladas de residuos. El 58% corresponde a residuos de origen industrial. Respecto a los residuos generados, solo el 24% es valorizado, el resto son eliminados principalmente en rellenos sanitarios y vertederos [5], que si bien cumplen con la normativa ambiental, no son la mejor opción. La valorización tiene el beneficio de reducir el volumen de residuos que llega a vertederos, y sustituir las materias primas provenientes de recursos naturales por estos materiales recuperados. Además, permite ahorrar costos e incluso generar ingresos al obtener productos de alto valor comercial [6].

En segundo lugar, la ganadería industrial contribuye al cambio climático pues es responsable de la emisión del 14,5% de los Gases de Efecto Invernadero (GEIs). Además, monopoliza la tierra cultivable y fomenta la deforestación, ya que cerca del 75% de la superficie agrícola es destinada a la ganadería. Asimismo, los cambios del uso del

suelo están asociados a la pérdida generalizada de biodiversidad. Los monocultivos a gran escala (ya sean cultivos o ganado) reducen la población de una gran variedad de especies, esto implica una alteración en el ciclo de nutrientes y un cambio en la organización ecológica de la comunidad [7,8]. La proteína obtenida a partir de microorganismos no tiene estas desventajas.

En tercer lugar, las macroalgas, como biomasa, tienen el potencial de sustituir y desplazar total o parcialmente la biomasa terrestre para producir productos bioquímicos sostenibles. Estas son evolutivamente diversas y abundantes tanto en la costa como en el mar. En comparación con las plantas terrestres, las algas son de tres a cuatro veces más capaces de crecer y convertir la energía solar en energía química. No compiten con los alimentos de primera necesidad, y son menos susceptibles a las catástrofes naturales o medioambientales. Sin mencionar, que al utilizar los residuos que genera la industria algal, se reduce o minimiza la carga contaminante y aumenta el valor añadido de los productos principales. [39]

En este contexto, se busca aprovechar los residuos ricos en polisacáridos de la industria algal, para producir proteína unicelular, otorgándoles un valor agregado a la vez que se ofrece una alternativa más sustentable para abastecer la demanda de proteínas de la creciente población.

## **1.5 Objetivos**

### **1.5.1 Objetivo general**

El objetivo general del presente trabajo es realizar el diseño conceptual de una planta a escala piloto para la producción de proteína unicelular de *Trichoderma reesei* utilizando residuos de la industria algal como fuente de carbono.

### **1.5.2 Objetivos específicos**

Los objetivos específicos del presente trabajo son:

- ◆ Determinar la cantidad de materias primas y nivel de producción de proteína unicelular.
- ◆ Diseñar el proceso de cultivo y obtención de proteína unicelular de *T. reesei* utilizando como sustrato residuos de la industria algal
- ◆ Dimensionar los equipos que compongan la planta productora.
- ◆ Determinar el consumo energético de la planta productora.
- ◆ Determinar el tamaño y disposición (layout) de los equipos de la planta productora.

## 2. Marco teórico

### 2.1 Algas pardas

Las algas, en particular las comestibles, son una fuente natural muy interesante de compuestos con actividad biológica. Se sabe que las algas son de bajo contenido calórico, ricas en polisacáridos, minerales, vitaminas, proteínas, esteroides y fibras alimentarias. La concentración total de polisacáridos en las algas puede variar entre el 4% y el 76% del peso seco, mientras que el contenido de proteínas puede ir entre un 5% y 30%. Además, los lípidos representan entre el 1 y el 5% de la composición celular, y también se reconocen como fuentes ricas en varios elementos como Ca, Mg, Na, P y K, que en algunas especies pueden representar hasta el 36% (p/p) de la materia seca [11]. La composición nutricional varía con la especie, ubicación geográfica, estación, humedad y temperatura [36].

Macroalgas es un término colectivo utilizado para las algas marinas que son generalmente visibles a simple vista. Las macroalgas adoptan una amplia gama de formas, que van desde simples costras, hasta formas más complejas con estructuras altamente especializadas. Su tamaño varía desde unos pocos milímetros hasta plantas de 70 metros de altura (por ejemplo, en algas del género *Macrocystis*). Se pueden clasificar en algas verdes, rojas y pardas. Estos colores son el resultado de los diferentes pigmentos fotosintéticos o clorofilas que utiliza cada alga y que reflejan diferentes longitudes de onda de luz [13,14,15].

Las algas pardas conocidas popularmente como huiros, deben su color característico al predominio del pigmento fucoxantina, que enmascara los demás pigmentos. Sus reservas alimentarias suelen ser polisacáridos complejos, azúcares y alcoholes superiores. Su pared celular está formada por una capa mucilaginoso externa que contiene ácidos algínico y fucínico, y una capa interna de celulosa. Estas algas son una fuente rica en sodio, potasio, y yodo, y también aportan cobre, hierro, zinc, cobalto, manganeso, entre otros [16]. Con algunas excepciones, todas las algas pardas son marinas. Generalmente habitan en las aguas más frías, pero algunas especies se encuentran en aguas muy cálidas [16].

Las algas pardas no tienen marcadores etarios, en consecuencia, los cambios en la estructura poblacional son tamaño-dependiente, en contraste a los animales que son edad-dependiente. Además de la ausencia de marcadores etarios, las algas pardas muestran una enorme plasticidad fenotípica en función de las características ambientales (exposición, movimiento de agua, herbívora, competencia). [17]

Al año 2004, la producción mundial de algas pardas mostraba un incremento sostenido de su explotación. Esta mayor demanda estaba determinada por su consumo para alimento humano y por los productos derivados que se obtienen de estas plantas, especialmente farmo-químicos [17].

En Chile, las algas pardas han sido utilizadas principalmente como materia prima para la extracción de alginatos. La extracción de estos azúcares naturales está sustentada en un 84% por dos especies de la orden Laminariales: *Lessonia nigrescens* y *Lessonia trabeculata* [17].

El procesamiento de las macroalgas para obtener los productos comerciales genera desechos, que generalmente se eliminan y no se aprovechan. En el caso de las industrias del alginato y la carragenina, se generan anualmente en todo el mundo aproximadamente 39.000 y 28.000 toneladas de residuos, respectivamente. Se presume que estos residuos podrían tener concentraciones considerables de carbohidratos. [38]

En este trabajo se plantea utilizar un residuo que proviene de la industria agroquímica que utiliza algas pardas como materia prima para producir bioestimulantes y biofertilizantes. El pH del residuo es de 3,71 y es necesario tratarlo previamente. En trabajos anteriores de Muñoz [24], se determinó que su composición proximal es similar al alga *Macrocystis pyrifera* en cuanto al porcentaje de alginato y celulosa, como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3: Análisis proximal de *M. Pырifera* y el residuo a utilizar.

	Ceniza (%)	Proteína (%)	Extracto no nitrogenado (%)	Alginato (%)	Celulosa (%)
<i>M. pyrifera</i>	10,8	13,2	36,0	21,8	7,6
Residuo	23,5	15,8	47,8	31,4	11,7

## 2.2 *Trichoderma reesei*

*Trichoderma* es un género de hongos filamentosos comunes que presentan gran variedad de estilos de vida e interacciones con otros hongos, animales y plantas. Algunas especies del género predominan en la micoflora del suelo en una amplia gama de zonas geográficas y climáticas. Se caracterizan por un rápido crecimiento, principalmente conidios (esporas) de color verde brillante y una estructura de conidióforos (hifas) repetidamente ramificados. Son colonizadores muy exitosos de sus hábitats, lo que se refleja tanto en su eficiente utilización del sustrato en cuestión como en su capacidad de secreción de metabolitos, antibióticos y enzimas. Son capaces de tratar con ambientes tan diferentes como el rico y diversificado hábitat de una selva tropical, así como con el entorno oscuro y estéril de un fermentador biotecnológico o un matraz de agitación. Bajo todas estas condiciones, responden a su entorno mediante la regulación del crecimiento, la conidiación, la producción de enzimas, y por lo tanto ajustan su estilo de vida a las condiciones del medio, que pueden ser explotadas para el beneficio de la humanidad [9] [18].

De todas las especies incluidas en este género, *Trichoderma reesei* es la especie con mayor importancia industrial. Ha sido completamente secuenciada y se ha empleado con éxito durante décadas en la producción de enzimas, principalmente celulasas, y actualmente se utiliza como huésped para la producción de proteínas recombinantes. *Trichoderma reesei* como sistema de expresión tiene alto potencial, ya que puede crecer en sistemas de fermentación y medios de cultivo baratos para producir y secretar grandes cantidades de proteína recombinante con modificaciones post-traduccionales convencionales.

Todas las cepas de *Trichoderma reesei* que se utilizan actualmente a escala comercial se han derivado de una única cepa que se recogió en las Islas Salomón durante la Segunda Guerra Mundial. La base genética de las respectivas mutaciones que condujeron a una mayor producción de celulasa en estas cepas industriales es fundamentalmente desconocida. Sin embargo, B.S. Montenecourt y D.E. Eveleigh prepararon dos líneas separadas de mutantes que dieron lugar a las cepas hipercelulolíticas RUT C-30 y RL-P37 [19].

La *T. reesei* RUT C-30 (Figura 1) es una cepa que produce enzimas celulolíticas de forma más eficiente que una *T. reesei* de tipo silvestre, y la expresión de celulasa no es reprimida por la glucosa en la misma medida que en algunas otras cepas. La RUT C-30 se ha convertido en la cepa más utilizada para la producción de celulasa en laboratorio, y se ha utilizado con éxito en la producción de varias proteínas recombinantes de diferentes orígenes (fúngico, bacteriano, vegetal, bovino y humano) [20].

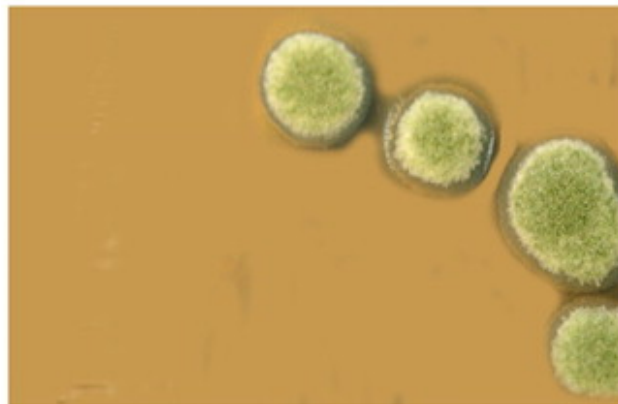


Figura 1: *Trichoderma reesei* RUT-C30 cultivada en placas de agar papa-dextrosa (PDA) [21].

La celulasa es una mezcla compleja de enzimas extracelulares, compuesta principalmente por tres enzimas sinérgicas que participan en la degradación de la celulosa: la endoglucanasa (EG), la exoglucanasa (o celobiohidrolasa, CBH) y la  $\beta$ -glucosidasa (BGL). La EG hidroliza aleatoriamente los enlaces glicosídicos internos de la celulosa, produciendo principalmente celodextrina y oligosacáridos. La CBH libera unidades de celobiosa de los extremos de la cadena de celulosa. A continuación, la BGL hidroliza la celobiosa y los oligosacáridos para liberar D-glucosa fermentable. *Trichoderma reesei* tiene una notable capacidad para producir celulasa en cantidades



superiores a 100 [g/L], sin embargo, tiene una baja actividad  $\beta$ -glucosidasa, lo que reduce la eficiencia en la degradación de la biomasa y compromete su aplicación industrial. Particularmente, esto hace que la celobiosa se acumule en el medio e inhiba el crecimiento [26].

En cuanto a la cinética de crecimiento de *Trichoderma reesei*, se realiza una búsqueda bibliográfica de los parámetros cinéticos del hongo en distintos sustratos y condiciones de operación. Estos valores se presentan en la Tabla 4. En esta tabla también se agregan datos cinéticos determinados experimentalmente en el Centro de Biotecnología y Bioingeniería (CeBiB), en cultivos de *Trichoderma reesei* RUT C-30 nativa y recombinante utilizando como sustrato *Ulva rigida* y glucosa.

Tabla 4: Parámetros cinéticos de *Trichoderma reesei* en diferentes sustratos.

Cepa	Fuente de carbono	Condiciones de operación	Operación	Parámetros	Referencia
T. reesei 30s-3-13	Celulosa (50 g/L)	26°C, pH 5,0	Batch	um: 0,096 [1/h] Ks: 11,27 [g/L] Yxs: 1,19 [g/g]	[29]
T. reesei RUT C30	Glucosa (10 g/L) Celulosa (10 g/L)	28°C, pH 4,8	Batch	um: 0,091 [1/h] Ks: 4,64 [g/L]	[30]
T. reesei RUT C30	Glucosa	28°C	Batch	Yxs: 0,63 [g/g]	[19]
T. reesei RUT C30	Lactosa	30°C, pH 4,8	Continua	Yxs: 0,6 [g/g]	[31]
T. reesei RUT C30	Hidrolizado de aserrín (10 g/L)	25°C, pH 5,0	Continua	Yxs: 0,44-0,57 [g/g]	[32]
T. reesei RUT C30	Ulva rigida (2,5%)	30°C	Batch	um: 0,029 [1/h]	
T. reesei RUT C30 recombinante	Ulva rigida (2,5%)	30°C	Batch	um: 0,033 [1/h]	
T. reesei RUT C30	Glucosa (2%)	30°C	Batch	um: 0,061 [1/h]	

### 2.3 Crecimiento de hongos

Algunos hongos crecen en medios líquidos de una forma dispersa y homogénea, pero la mayoría crecerán naturalmente en forma de micelio. Estas pautas de crecimiento afectan la determinación de las características cinéticas de la curva de crecimiento teórica en la práctica puesto que no se pueden tomar muestras representativas del mismo cultivo.

En estas circunstancias, para obtener incluso una medida sencilla de la tasa de crecimiento durante un período de cultivo prolongado es necesario cosechar cultivos enteros en cada punto temporal, lo que significa que hay que iniciar muchos cultivos replicados al mismo tiempo para garantizar una buena medición de la precisión y la variabilidad a lo largo de la incubación [27].

La curva de crecimiento de un hongo filamentoso en cultivo Batch sigue esencialmente la misma cinética que la curva de crecimiento de un organismo unicelular. Estas curvas (Figura 2) que expresan la biomasa o el número de células en función del tiempo de incubación muestran una fase lag o de latencia, una fase de aceleración, una fase exponencial, una fase de desaceleración, una fase estacionaria, y una fase de muerte. Esta descripción se aplica a un medio en el que el nutriente limitante es la fuente de carbono y de energía, como la glucosa. Cuando el nutriente limitante no es la fuente de carbono y energía la situación es más complicada debido al crecimiento desbalanceado [27]. Para más detalle, ver Anexo 1.

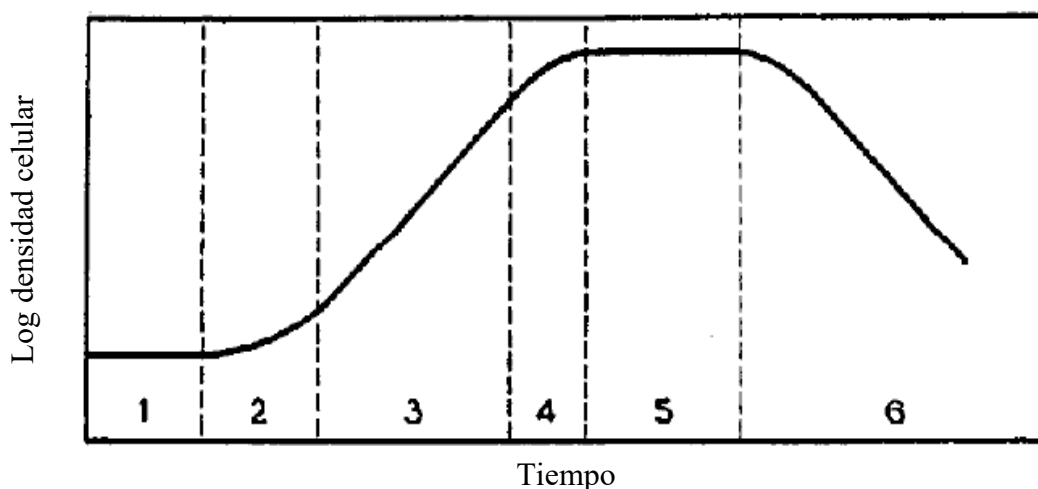


Figura 2: Curva de crecimiento típica de una población de células cultivadas en medio líquido [63].

El crecimiento celular se describe generalmente por la tasa de crecimiento específico,  $\mu$ , y la evolución en el tiempo de la concentración celular,  $X$ . La tasa de crecimiento específico se define por el incremento de células (g) por gramo de células secas (g) por hora (h), y puede ser modelada por la ecuación siguiente [28].

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (1)$$

La tasa de crecimiento específico está relacionada con muchas variables de proceso, como la temperatura, el pH, el oxígeno disuelto, la concentración de sustrato (S), la concentración de producto (P), la concentración celular y el tiempo (t). La ecuación de Monod que utiliza la concentración de sustrato como única variable independiente se muestra en la Ec. (2). En las aplicaciones reales, sólo se consideran las variables claves del proceso, ya que la temperatura, el pH, y otras variables pueden ser controladas y despreciadas de la ecuación,

$$\mu = \frac{\mu_{max} \cdot S}{k_m + S} \quad (2)$$

donde  $\mu_{max}$ , es la máxima tasa de crecimiento específico y  $k_m$ , es el coeficiente de afinidad con el sustrato [28].

En un cultivo batch alimentado, es decir, un cultivo batch el cual se alimenta continuamente con medio de cultivo fresco o con alguno de sus componentes, se tiene que el balance de masa de células y de sustrato está dado por las siguientes ecuaciones:

$$\frac{d(V \cdot X)}{dt} = V \cdot \mu \cdot X \quad (3)$$

$$\frac{d(V \cdot S)}{dt} = F \cdot S_F - \frac{V \cdot \mu \cdot X}{Y_{x/s}} \quad (4)$$

donde V es el volumen del cultivo, F es el flujo de alimentación,  $S_f$  es la concentración de sustrato en la alimentación y  $Y_{x/s}$  es el factor de rendimiento de biomasa (g de biomasa/g de fuente de carbono) [28].

Por otra parte, la variación del volumen con el tiempo del proceso será:

$$\frac{dV}{dt} = F \quad (5)$$

donde el flujo de alimentación (F) se puede mantener constante o puede ser variable [28].

La producción de SCP a partir de hongos incluye una gran variedad de especies y sustratos utilizados, como se muestra en la Tabla 5. Por ello, en bibliografía se han reportado contenidos proteicos que van desde un 10% hasta un 70%. Además, se encuentra que es posible usar desechos agrícolas, aguas residuales, compuestos lignocelulósicos, entre otras fuentes [1].

En particular, con *Trichoderma reesei* se ha reportado [22] que a partir de pulpa de paja de arroz en fermentación de estado sólido se obtiene un contenido de proteína de un 25%. En este mismo estudio, se determina que el aumento del contenido de proteína comienza después de 4 días de incubación y alcanza el máximo después de 14 días. Además, la proteína aumenta con la disminución de la relación inicial de carbono/nitrógeno, pero alcanza valores cercanos al 20%. Los mismos autores, más tarde testearon diferentes sustratos (paja de arroz, cáscara de café, bagazo y mazorca de maíz) para producir SCP [23]. Las condiciones de cultivo fueron una temperatura de 30°C, pH 5, y relación C/N de 20:1. Los resultados fueron un contenido de proteína de 22%, 21%, 16% y 17% respectivamente para cada sustrato.

Por otra parte, en un trabajo realizado por Brain et al [12], donde se cultivó *Trichoderma reesei* RUT-C30 en *Ulva rigida* como fuente de carbono, se determinó que las condiciones óptimas de cultivo eran una temperatura de 25°C y un pH inicial de 4,8; y se obtuvo una concentración proteica máxima de 12,91 [mg/mL] al día 8 de cultivo.

En otro estudio realizado por Muñoz [24] se determinó que al fermentar *Dendryphiella salina*, en residuos de *Macrocystis pyrifera*, se obtenía un mayor aumento en la concentración de proteína al usar el pretratamiento de ultrasonido seguido de una hidrólisis ácida.

Otro resultado interesante es la producción de SCP a partir de pulpa de remolacha, utilizando un cultivo mixto de *Trichoderma reesei* y otras cuatro especies de levaduras [25]. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6. Cabe destacar que el monocultivo de *Trichoderma* sp en pulpa de remolacha tiene un contenido proteico de 49,3% y el máximo contenido de proteína se obtiene con un cultivo mixto utilizando también *Kluyveromyces marxianus*, el cual resultó en un contenido proteico final de 51%. Además, la composición aminoacídica del monocultivo de *Trichoderma* y su comparación con los lineamientos de la FAO y la harina de soya se muestra en la Tabla 7. Esto indica que las proteínas analizadas mostraron un perfil de aminoácidos que se comparaba favorablemente tanto con los valores de referencia de la FAO como con los de la harina de soya o eran más altos, con la excepción de la metionina y la lisina que mostraron valores más bajos.

Tabla 5: Contenido de proteína producida a partir de sustratos específicos para las especies fúngicas investigadas como fuente de SCP.

Organismo	Sustrato	Contenido de proteína (%)	Referencia
<i>Aspergillus flavus</i>	Salvado de arroz	10	Valentino et al., 2016
<i>Aspergillus niger</i>	Orujo de manzana	17-20	Bhalla and Joshi, 1994
<i>Aspergillus niger</i>	Residuos de plátano	18	Baldensperger et al., 1985
<i>Aspergillus niger</i>	Salvado de arroz	11	Valentino et al., 2016
<i>Aspergillus niger</i>	Agua estancada	49	Kam et al., 2012
<i>Aspergillus niger</i>	Licor de desecho	50	Chiou et al., 2001
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Salvado de arroz	10	Valentino et al., 2016
<i>Aspergillus oryzae</i>	Salvado de arroz	24	Ravinder et al., 2003
<i>Candida crusei</i>	Suero de queso	48	Yadav et al., 2014
<i>Chrysoniliasitophilia</i>	Lignina	39	Rodriguez et al., 1997
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Salvado de arroz	10	Valentino et al., 2016
<i>Fusarium venenatum</i>	Glucosa	44	Wiebe, 2002
<i>Candida tropicalis</i>	Melaza	56	Gao et al., 2012
<i>Candida tropicalis</i>	Bagazo	31	Pessoa et al., 1996
<i>Yarrowialipolytica</i>	Inulina, petróleo crudo	48-54	Cui et al., 2011
<i>Levadura marina, no especificada</i>	Residuos de cáscaras de camarón	61-70	Rhishipal and Philip, 1998
<i>Hanseniasporauvarum</i>	Dátiles de palmapodridos	49	Hashem et al., 2014
<i>Kefir sp.</i>	Suero de queso	54	Paraskevopoulou et al., 2003
<i>Kefir sp.</i>	Pulpa de naranja, Melaza, Suero de leche, Pulpa de papa	24-39	Aggelopoulos et al., 2014
<i>Kluyveromycesmarxianus</i>	Suero de queso	43	Yadav et al., 2014, 2016
<i>Kluyveromycesmarxianus</i>	Pulpa de naranja, Melaza, Suero de leche, Pulpa de papa	59	Aggelopoulos et al., 2014
<i>Pleurotusflorida</i>	Paja de trigo	63	Ahmadi et al., 2010
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Pulpa de naranja, Melaza	24	Aggelopoulos et al., 2014
<i>Trichoderma harzianum</i>	Suero de queso	34	Sisman et al., 2013
<i>Trichoderma virideae</i>	Pulpa de cítricos	32	De Gregorio et al., 2002

Tabla 6: Producción de SCP en cultivos mixtos [25].

Sistema microbiano	pH final	Contenido proteína en peso seco (%)	Eficiencia de conversión del sustrato en proteína (%)
<i>Trichoderma reesei</i> (control)	5,1	49,3	35,7
<i>T. reesei</i> + <i>Kluyveromycesmarxianus</i>	5,1	51,0	39,4
<i>T. reesei</i> + <i>Candida utilis</i>	4,8	50,1	38,1
<i>T. reesei</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5,0	49,4	37,9
<i>T. reesei</i> + <i>Saccharomyces vuarum</i>	4,9	49,9	36,2

Tabla 7: Composición de aminoácidos de monocultivo de *Trichoderma reesei* comparado con el estándar FAO y la harina de soya [25].

Aminoácido	T. reesei (%)	Estándar FAO (%)	Harina de soya (%)
Treonina	5,0	2,8	4,0
Valina	6,9	4,2	5,0
Cisteína	4,8	2,0	1,4
Metionina	0,9	2,2	1,4
Isoleucina	9,6	4,2	5,7
Leucina	7,1	4,8	7,7
Tirosina	4,6	2,8	2,7
Fenilalanina	3,8	2,8	5,1
Lisina	4,2	4,2	6,5

En cuanto al uso del residuo algal como fuente de carbono, el trabajo de C.L. Salgado *et al* [38] comparó la fermentación del hongo marino *Paradendryphiella salina* en el residuo y en *M. pyrifer*, obteniendo un rendimiento de micoproteína seca de 320 g y 564 g por kilogramo de biomasa algal, respectivamente. Además, se determinó que, en ambos casos, la fermentación permitió aumentar casi 2,4 veces el contenido protéico, en relación al control, desde 12.9 g/100 g a 31.1 g/100 g en *M. Pyrifer*, y desde 15.8 g/100 g a 37.4 g/100 g en los residuos algales. Asimismo, se observó que la composición aminoacídica se compara favorablemente con la micoproteína de *Fusarium venenatum* (Quorn) y con otras fuentes de proteína dietética (soya y sésamo).

En base a toda la información se diseñará un proceso de producción de SCP a partir de residuos algales utilizando como microorganismo *T. reesei* RUT C-30. El proceso tendrá una etapa de neutralización y sacarificación del residuo algal, una etapa de precultivo y de adaptación, ambas en régimen batch, y una etapa de fermentación fed batch. La temperatura y el pH de cultivo serán de 25°C y 5,5 respectivamente, con una agitación de 200 rpm.

### 3. Metodología

Considerando los objetivos planteados, el diseño conceptual de una planta productora de proteína unicelular debe tener una serie de etapas que permitan determinar las operaciones unitarias del proceso productivo, los flujos de materia a tratar, el tamaño de los equipos, la potencia requerida por la planta, entre otras. Para ello se define la siguiente metodología, ilustrada en la Figura 3.

I. Diseño del proceso: en primer lugar se debe determinar las operaciones unitarias que tendrá el proceso y realizar un diagrama de bloques para visualizar el flujo de materia dentro de este. Esto a partir de bibliografía, donde además se pueden obtener las condiciones de operación. En esta etapa también se definen qué equipos utilizará el proceso.

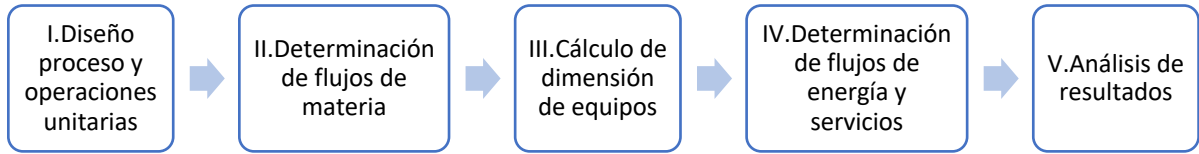
II. Balance de masa: Se define un caso base de 100 kg de residuos algales por lote, y a partir de esto, mediante balances de masa, datos bibliográficos y simulaciones computacionales se determinan los flujos de materias de cada etapa, así como de producto obtenido. Los cálculos se realizan mediante la herramienta Excel y el programa Matlab.

III. Dimensionamiento: A partir de los flujos de materia, se determina la dimensión de los equipos necesarios en el proceso, junto a los equipos auxiliares, a través de las ecuaciones de diseño, y la herramienta Excel. Asimismo, se lleva a cabo un diagrama de flujos (*flowsheet*), que ilustra los equipos seleccionados y sus respectivos flujos de entrada y salida, en el software LucidChart.

IV. Balance de energía: Con la información anterior, se determinan los requerimientos energéticos de los equipos y los flujos de servicios de agua, vapor y refrigerante necesarios para satisfacer estos requerimientos, mediante Excel. Además se determina la potencia instalada de la planta.

V. Layout: Con el dimensionamiento de los equipos, y los balances de masa y energía, se define la disposición tentativa de estos dentro de la planta, mediante un *layout*. Para ello, se utiliza el software LucidChart, y se toman en cuenta medidas de seguridad y requisitos mínimos de una planta de procesos.

VI. Análisis de resultados: Finalmente se analizan los resultados obtenidos y se discute la relevancia de los supuestos utilizados, además de proponer posibles mejoras, recomendaciones y proyecciones del proyecto a futuro.



*Figura 3: Metodología general.*



## 4. Resultados

### 4.1 Proceso productivo

#### I. Límite de batería

El proceso está pensado para acoplarse a una industria que procese algas y tenga residuos con un porcentaje alto de carbohidratos, ya que contempla desde la recepción de la materia prima hasta la obtención de la biomasa seca. *A priori* no se considera una formulación del producto, ya que sería necesario evaluar sus características organolépticas y las distintas regulaciones para ser utilizado como alimento para animales o para humanos. Tampoco se considera el envasado y el almacenamiento de producto terminado. En cuanto a los RILes y RISes, no se considera su tratamiento dentro del proceso.

#### II. Operación de la planta

La planta opera en régimen Batch, con un tiempo de procesamiento de 5 días por lote, obteniéndose producto cada 2 días. Con ello, se tiene una producción aproximada de 156 lotes de SCP por año. En la Tabla 8 se muestra la programación del uso de los equipos en base a los tiempos de operación de cada etapa.

Tabla 8: Programación de la operación de los equipos.

Proceso / Días	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Neutralización												
Depolimerización												
Centrifugación I												
Prealimentación												
Precultivo												
Centrifugación II												
Adaptación												
Fermentación												
Filtración												
Secado												

#### III. Descripción general

##### Pretratamiento del residuo algal

El proceso comienza con una etapa de neutralización, donde el residuo de alga, que tiene un pH de 3,7 es neutralizado mediante un buffer. Inmediatamente, sigue la depolimerización donde el residuo de alga es tratado con un complejo enzimático capaz

de degradar la celulosa presente en el residuo y convertirla en glucosa. Luego este medio depolimerizado pasa por una etapa de centrifugación que permite separar el líquido rico en azúcares de los desechos sólidos. Más tarde este líquido es mezclado con medio mínimo en la etapa de prealimentación, donde además es esterilizado y reservado para su posterior alimentación al reactor fed-batch.

### Preparación del inóculo y fermentación

Por otra parte, se lleva a cabo un precultivo en medio YPD, el cual es centrifugado para obtener un inóculo de *Trichoderma reesei* RUT C-30 que será agregado a un cultivo de adaptación. A este último se le añade una fracción del medio obtenido en la prealimentación y se deja crecer por 25 horas. La fermentación comienza con la adición del inóculo adaptado y una alimentación de líquido depolimerizado y medio mínimo. El proceso continúa hasta las 30 horas, momento en el que se alcanza el estado estacionario y toda la glucosa del medio está agotada.

### Separación de la Biomasa

En seguida, el caldo de fermentación pasa por una etapa de filtración para separar la biomasa del resto del caldo. Y finalmente, la biomasa húmeda pasa a una etapa de secado, donde se obtiene la proteína unicelular con un 5% de humedad.

En la Figura 4 se muestra el diagrama de bloques del proceso completo, y en la Figura 5 se observa el *flowsheet*.

#### IV. Descripción de cada Etapas

- Neutralización

En esta etapa, entra la materia prima, residuos de *Macrocystis pyrifera*, a proceso, y es neutralizada mediante un buffer de 0,5 M acetato de sodio y 0,5 M ácido acético, para llevar el pH del residuo de alga desde 3,7 a un pH cercano a 5,5. La neutralización y la depolimerización ocurren en el mismo equipo.

- Depolimerización

En esta etapa, el medio neutralizado es hidrolizado por celulasas y  $\beta$ -glucosidasas (Novozymes, CTec2 y HTec2) que depolimerizan la celulosa presente en el residuo en sus unidades de glucosa. La reacción ocurre en un medio acuoso, a 50°C por 20 horas. Esta etapa se lleva a cabo en un tanque agitado con una velocidad de 200 rpm. La solución obtenida se deja enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente.

- Centrifugación I

En la siguiente etapa, se coloca el medio depolimerizado en una centrífuga tubular, con el objetivo de separar el líquido rico en glucosa de los desechos sólidos de alga. El equipo funciona a una temperatura de 4°C, y el medio se centrifuga a 12000 G por 30 minutos. Una vez terminado este proceso, el líquido se deja temperar hasta alcanzar la temperatura ambiente.

- Prealimentación

En esta fase, el líquido depolimerizado se mezcla en un tanque agitado a 200 rpm con un flujo que contiene nutrientes en concentraciones similares al medio mínimo [33]. Este nuevo flujo es esterilizado a 120°C por 20 minutos y luego llevado a 25°C. Ello para obtener el flujo de medio fresco que será alimentado al reactor fed-batch, lo que permite que el nutriente limitante permanezca en bajas concentraciones durante la fermentación y mantener al cultivo dentro de los límites de capacidad de aireación del fermentador. El proceso completo tiene una duración de 1 hora.

- Precultivo

Esta etapa ocurre a 25°C en un reactor agitado a 200 rpm. El proceso comienza con la adición y esterilización de medio YPD a 120°C por 20 minutos, el que luego es enfriado hasta la temperatura de operación. Inmediatamente se agrega un inóculo de *Trichoderma reesei* y se deja cultivar por 50 horas.

- Centrifugación II

En esta etapa, se coloca el precultivo en una centrífuga tubular, con la finalidad de separar la biomasa del medio YPD. El equipo funciona a una temperatura de 4°C, y el medio se centrifuga a 8000 G por 10 minutos.

- Cultivo de adaptación

Este cultivo comienza con el inóculo obtenido en la centrifugación y con una fracción de la solución de líquido depolimerizado y medio mínimo. El proceso dura 25 horas y se realiza en un reactor agitado a 200 rpm, a 25°C. El propósito de esta etapa es que el microorganismo tenga un cambio metabólico que le permita crecer en el medio complejo.

- Fermentación fed-batch

La fermentación tiene el objetivo de aumentar la cantidad de biomasa fúngica utilizando el líquido depolimerizado como principal fuente de carbono. Este proceso comienza con el inóculo de *Trichoderma reesei* (proveniente del cultivo de adaptación) en un reactor fed-batch agitado a 200 rpm, a 25°C. De inmediato, comienza a alimentarse el flujo obtenido en la prealimentación en razón de 16 [L/h]. A las 26 horas se corta este flujo, y se deja fermentar por otras 4 horas, hasta alcanzar el estado estacionario y el sustrato se encuentra agotado.

- Filtración

Para este procedimiento, se utiliza un filtro prensa que permite separar la biomasa del resto de componentes del caldo de fermentación. El tiempo de operación es de 4 horas, considerando una caída de presión de 13 [kPa].

- Secado

En la etapa final del proceso, se coloca la SCP húmeda en una estufa de vacío, y se deja secar por 1 hora, a una temperatura de 60°C. Esto permite reducir la humedad de la biomasa a un 5%, lo que otorga mayor estabilidad al producto, así como reducir el porcentaje de ácidos nucleicos a niveles de consumo aceptables (bajo un 2%) [34].

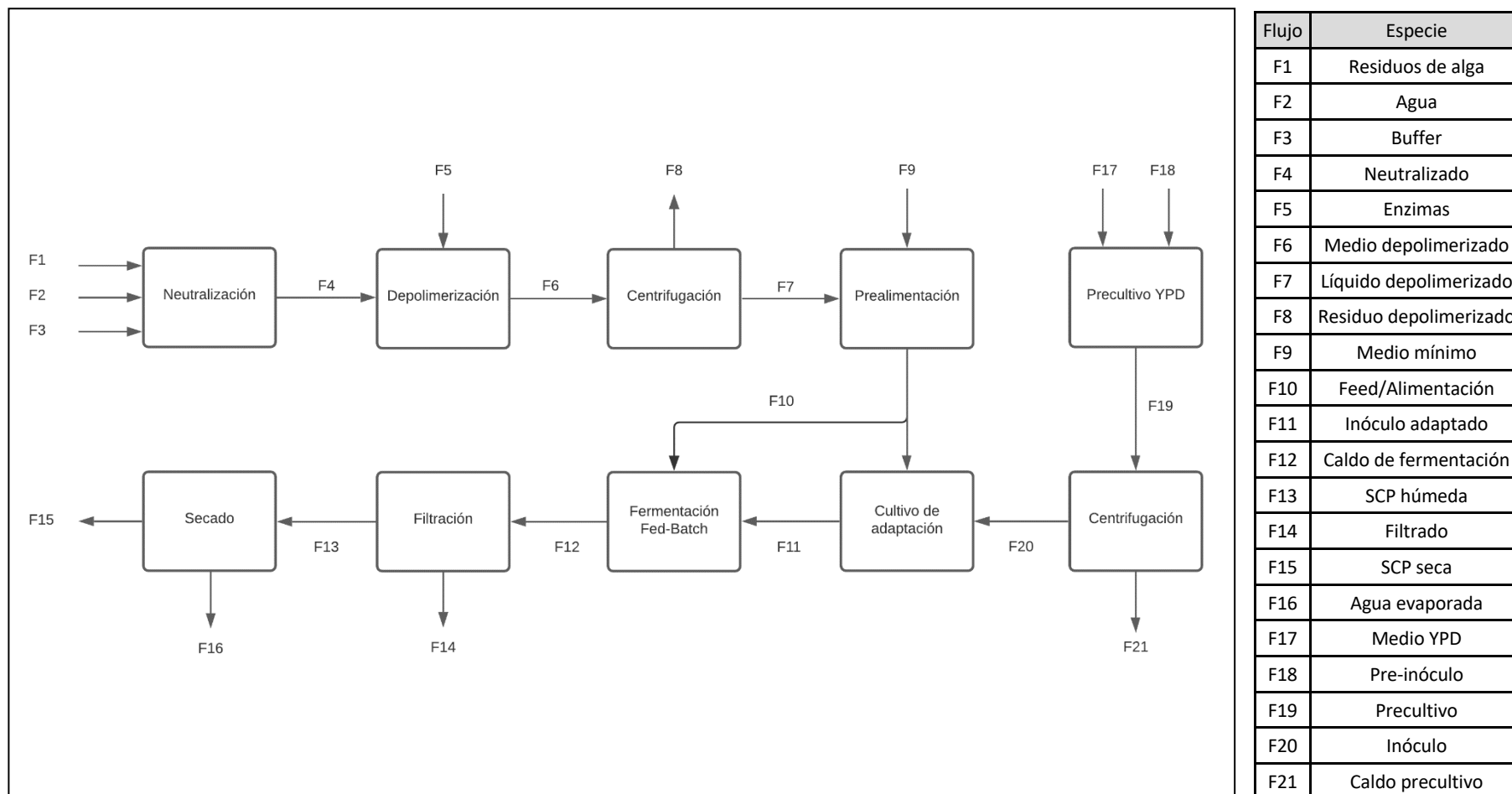


Figura 4: Diagrama de bloques del proceso de producción de SCP de *Trichoderma reesei* RUT C-30 a partir de residuos algales.



## 4.2 Balances de masa

### 4.2.1 Neutralización

En esta etapa entran 3 especies que corresponden a residuos algales, agua y buffer, y se obtiene una solución que se denomina medio neutralizado. La masa inicial de residuos (caso base) se determinó en función de los requerimientos de la etapa de fermentación.

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

- Se utiliza la proporción de agua por kilogramo de materia prima indicada en [35], que corresponde a 4,16 [L/kg].
- La proporción de ácido acético y acetato de sodio se calcula mediante la ecuación de Henderson-Hasselbalch que relaciona el pH con la concentración de sal y ácido, considerando que se quiere llegar a un pH de 5,5. Cálculo en Anexo 2.
- La concentración molar del buffer es de 0,5 M.

A partir de estas consideraciones, se obtienen los resultados de la Tabla 9.

*Tabla 9: Balance de masa en etapa de Neutralización*

Etapa: Neutralización				
	Flujo	Nombre	Composición	Masa [kg]
Entradas	F1	Residuos de alga	-	100,0
	F2	Agua	-	412,5
	F3	Buffer	0,5 M ácido acético	2,52
	0,5 M acetato de sodio		13,85	
Salidas	F4	Neutralizado	-	528,9

### 4.2.2 Depolimerización

En esta etapa, al medio neutralizado se le agregan enzimas comerciales para llevar a cabo la reacción, y la solución obtenida se denomina medio depolimerizado.

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

- Se utiliza la proporción de enzimas por kilogramo de materia prima indicada en [35], que es de 3,33 [mL/kg] para CTec2 y de 0,33 [mL/kg] para HTec2.
- Se utiliza una densidad de 1,15 [g/mL] para la enzima CTec2 [40], y se considera que la enzima HTec2 tiene la misma densidad.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10: Balance de masa en etapa de Depolimerización

Etapa: Depolimerización				
	Flujo	Nombre	Composición	Masa [kg]
Entradas	F4	Neutralizado	-	528,9
	F5	Enzimas	HTec2 CTec2	0,038 0,38
Salidas	F6	Medio depolimerizado	-	529,3

#### 4.2.3 Centrifugación I

En esta fase entra el medio depolimerizado, y se separa mediante centrifugación en un líquido depolimerizado, que contiene la mayor parte de la glucosa obtenida en la etapa anterior, y en un residuo sólido.

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

- La eficiencia de una centrifuga tubular es de 86% [41].
- El residuo está compuesto por un 11,7% de celulosa [24], y la celulosa está compuesta en un 90% por glucosa [42].
- El complejo enzimático tiene un 90% de conversión [43].

Tomando en cuenta lo anterior, se obtienen los flujos de la Tabla 11.

Tabla 11: Balance de masa en etapa de Centrifugación I

Etapa: Centrifugación I				
	Flujo	Nombre	Composición	Masa [kg]
Entradas	F6	Medio depolimerizado	-	528,9
Salidas	F7	Líquido depolimerizado	-	451,0
	F8	Residuo depolimerizado	-	77,8

#### 4.2.4 Prealimentación

En este proceso, ingresa el líquido depolimerizado y se mezcla con nutrientes en las mismas concentraciones que el Medio mínimo [33]. La solución que se obtiene se denomina Feed, ya que más tarde será alimentada al fermentador.



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

- El volumen de trabajo del tanque es de 456 litros.
- Se utilizan las concentraciones de nutrientes del medio mínimo según bibliografía [33], considerando al líquido depolimerizado como solvente.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12: Balance de masa en etapa de Prealimentación

Etapa: Prealimentación				
	Flujo	Nombre	Composición	Masa [kg]
Entradas	F7	Líquido depolimerizado	-	451,0
	F9	Medio mínimo	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,28
			KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,84
			MgSO <sub>4</sub>	0,274
			CaCl <sub>2</sub>	0,274
			FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,0023
			MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,0007
			ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,0006
		CoCl <sub>2</sub>	0,0009	
Salidas	F10	Feed	-	460,7

#### 4.2.5 Precultivo

Esta etapa permite obtener el inóculo que se utilizará en la etapa de fermentación. Las entradas son Medio YPD y 1 gramo de preinóculo de esporas de *Trichoderma reesei*.

Los datos y supuestos considerados en el precultivo son los siguientes:

- El volumen de trabajo del tanque es de 10 litros.
- Se utilizan las concentraciones de nutrientes del medio YPD [44].
- El volumen de inóculo en el precultivo es de 0,05 %v/v.
- La densidad de *Trichoderma reesei* es de 0,334 [g/mL] [45].
- La velocidad de crecimiento máxima es 0,091 [1/h]. [30]
- El rendimiento es 0,63 [g] de biomasa por gramo de glucosa. [19]
- La constante de saturación es 4,64 [g/L]. [30]

El crecimiento es modelado en Matlab (ver código en Anexo 3), y a partir de él se determinan las concentraciones de salida de glucosa y biomasa. Asimismo, se define que el inóculo debe ser cosechado a las 50 horas, mientras se encuentra en la fase exponencial. En la Figura 6 se puede observar el modelo obtenido, y en la Tabla 13 se tiene el balance de masa de esta etapa.

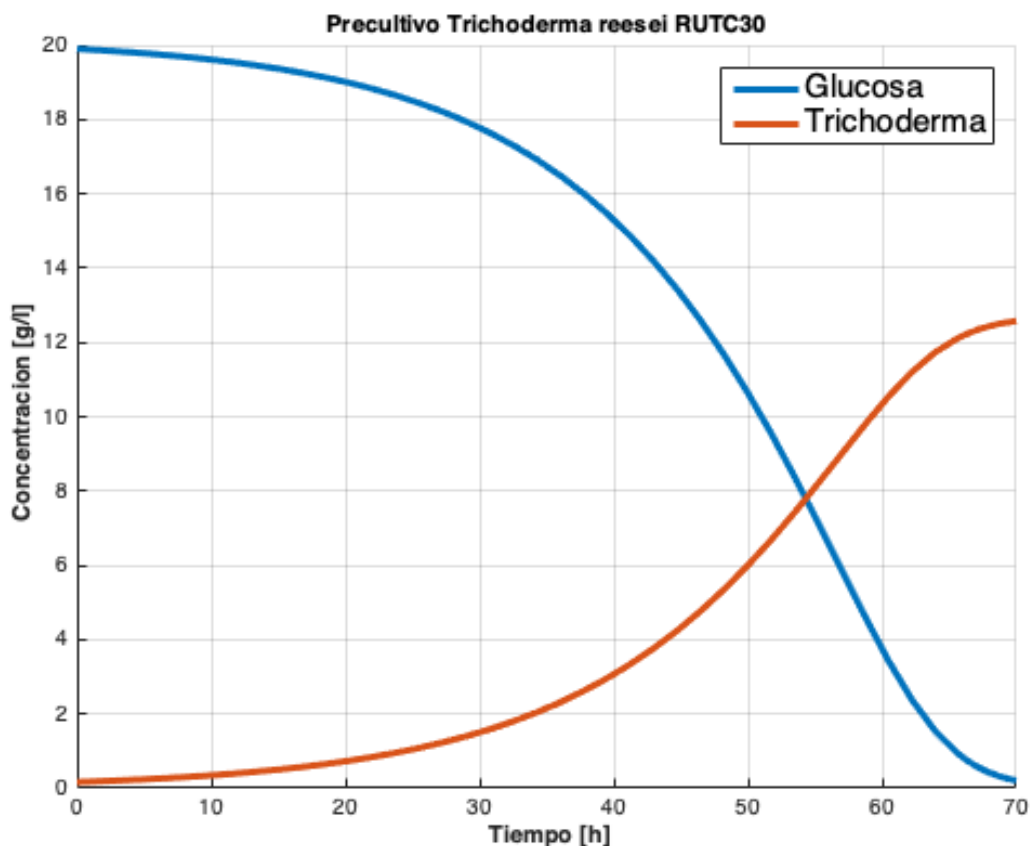


Figura 6: Modelo de crecimiento de *Trichoderma* en Precultivo.

Tabla 13: Balance de masa en etapa de Precultivo

Etapa: Precultivo				
	Flujo	Nombre	Composición	Masa [kg]
Entradas	F17	Medio YPD	Agua destilada	9,2
			Extracto de levadura	0,1
			Peptona	0,2
			Dextrosa	0,2
	F18	Preinóculo	<i>Trichoderma reesei</i>	0,0017
Salidas	F19	Precultivo	-	9,67

#### 4.2.6 Centrifugación II

En esta fase entra el precultivo, y se separa mediante centrifugación en un caldo de cultivo, que contiene medio YPD y parte de la biomasa, y en un inóculo de *Trichoderma reesei*, que será utilizado en la fermentación.

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

- La eficiencia de una centrifuga tubular es de 86% [41].
- La concentración final de *Trichoderma reesei* en el precultivo es de 6 [g/L], determinada a partir de la simulación.

Tomando en cuenta lo anterior, se obtienen los flujos de la Tabla 14.

Tabla 14: Balance de masa en etapa de Centrifugación II

Etapa: Centrifugación II				
	Flujo	Nombre	Composición	Masa [kg]
Entradas	F19	Precultivo	<i>Trichoderma reesei</i>	0,06
			Medio	9,61
Salidas	F20	Inóculo	-	0,052
	F21	Caldo precultivo	-	9,62

#### 4.2.7 Cultivo de adaptación

En esta etapa se agrega una fracción del medio obtenido en la prealimentación y el inóculo de *Trichoderma reesei* de la centrifugación. El caldo obtenido se denomina Inóculo adaptado.

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

- El volumen de trabajo del tanque es de 40 litros.
- Se utilizan los mismos parámetros cinéticos de la etapa de precultivo.

El crecimiento es modelado en Matlab (ver código en Anexo 3), y a partir de él se determinan las concentraciones de salida de glucosa y biomasa. Asimismo, se define que el inóculo debe ser cosechado a las 25 horas, mientras se encuentra en la fase exponencial. En la Figura 7 se puede observar el modelo obtenido, y en la Tabla 15 se tiene el balance de masa de esta etapa.

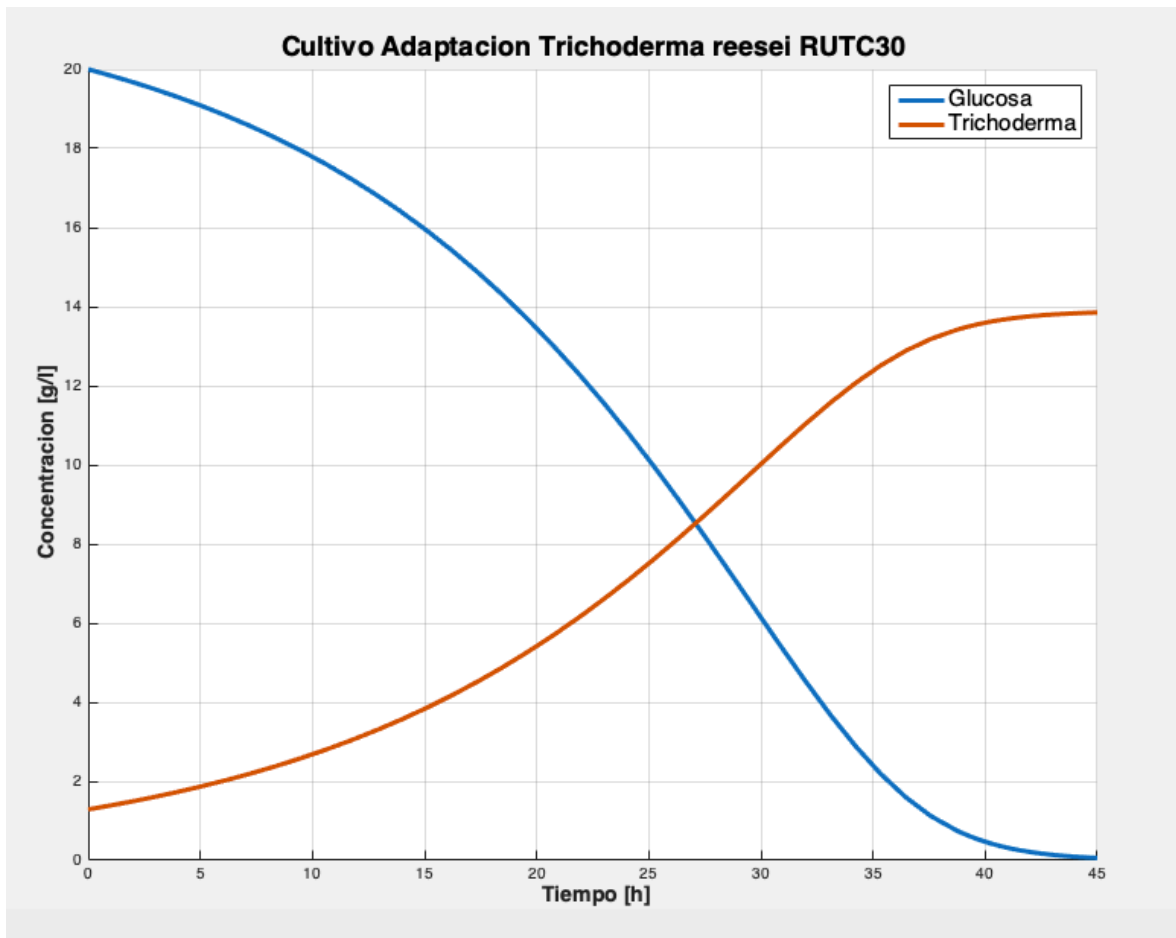


Figura 7: Modelo de crecimiento de *Trichoderma* en medio de adaptación.

Tabla 15: Balance de masa en etapa de Cultivo de adaptación

Etapa: Cultivo de adaptación				
	Flujo	Nombre	Composición	Masa [kg]
Entradas	F10A	Feed	-	40,4
	F20	Inóculo	-	0,0516
Salidas	F11	Inóculo adaptado	-	40,46

#### 4.2.8 Fermentación fed-batch

Las entradas de esta etapa corresponden al inóculo adaptado y un flujo de alimentación que contiene glucosa y nutrientes. La salida se denomina caldo de fermentación.

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

- El volumen inicial del fermentador es de 40 litros.
- La concentración final de *Trichoderma reesei* en el cultivo de adaptación es de 7,5 [g/L], determinada a partir de la simulación.

- La concentración final de glucosa en el cultivo de adaptación es de 10,1 [g/L], determinada a partir de la simulación.
- El flujo de alimentación es de 16 [L/h], por 26 horas.
- Se utilizan los mismos parámetros cinéticos de la etapa de precultivo.

El crecimiento es modelado en Matlab (ver código en Anexo 3), y así se determina la concentración final de biomasa, y el tiempo de fermentación necesario para llegar al estado estacionario. En la Figura 8 se puede ver el modelo obtenido, y en la Tabla 16 se muestran los flujos de esta etapa.

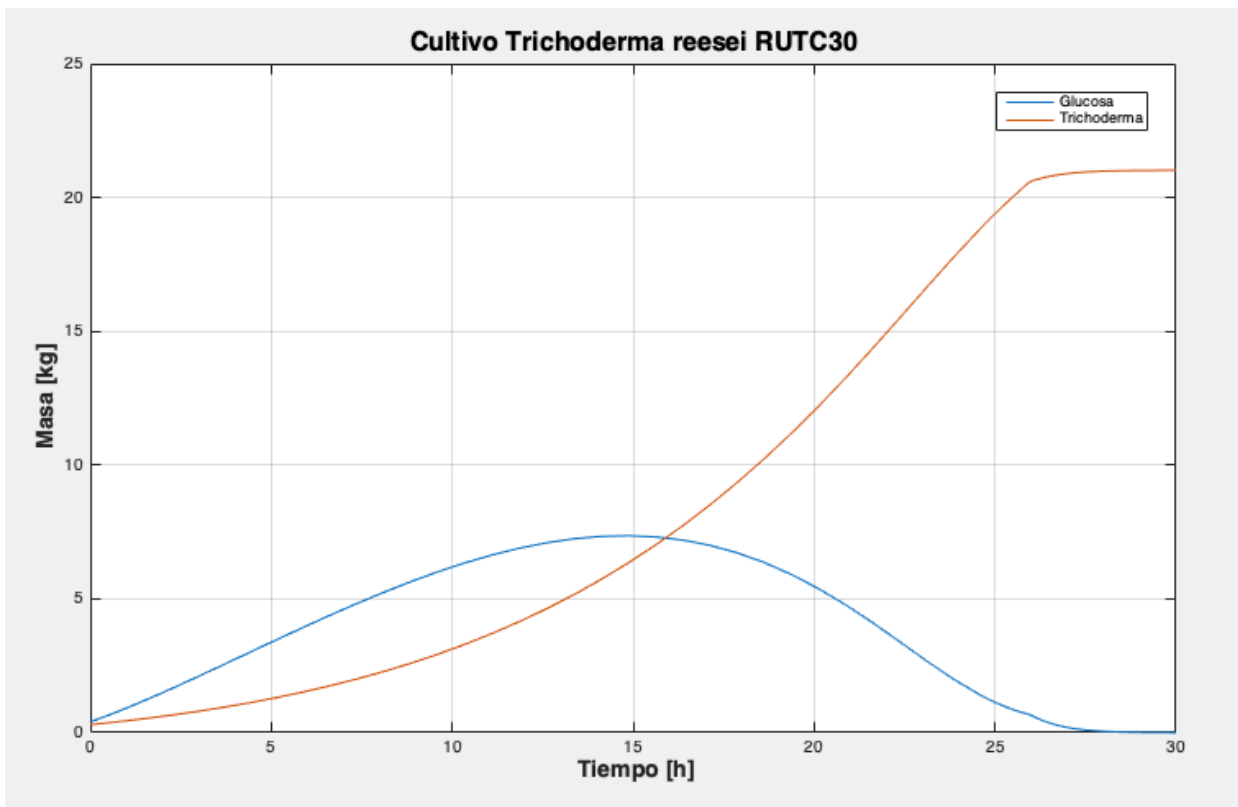


Figura 8: Modelo de crecimiento de *Trichoderma reesei* en Fermentación fed-batch.

Tabla 16: Balance de masa en etapa de Fermentación

Etapa: Fermentación				
	Flujo	Nombre	Composición	Masa [kg]
Entradas	F10B	Feed	-	420,28
	F11	Inóculo adaptado	<i>Trichoderma reesei</i>	0,30
			Medio	40,16
Salidas	F12	Caldo fermentación	<i>Trichoderma reesei</i>	20,5
			Medio	440,25

#### 4.2.9 Filtración

En esta etapa ingresa el caldo de fermentación, y se separa la biomasa del componente líquido del caldo (filtrado). La biomasa permanece con un porcentaje de agua, por lo que se denomina SCP húmeda.

El supuesto considerado en la filtración es que la eficiencia de separación de un filtro prensa es del 95% [46]. Con esta consideración, se determinan los flujos de salida de la Tabla 17

Tabla 17: Balance de masa en etapa de Filtración

Etapa: Filtración				
	Flujo	Nombre	Composición	Masa [kg]
Entradas	F12	Caldo fermentación	<i>Trichoderma reesei</i>	20,5
			Medio	440,2
Salidas	F13	SCP húmeda	-	19,5
	F14	Filtrado	-	441,3

#### 4.2.10 Secado

En la fase final, la biomasa húmeda pasa por un proceso de secado donde se le remueve gran parte del agua contenida en ella, obteniéndose el producto final o SCP seca, lista para su almacenamiento.

Los datos y supuestos considerados en el secado son los siguientes:

- El contenido de humedad inicial es de 81% [47,48].
- El contenido de humedad final es de 5% [49].

En la Tabla 18 se muestran los resultados.

Tabla 18: Balance de masa en etapa de Secado

Etapa: Secado				
	Flujo	Nombre	Composición	Masa [kg]
Entradas	F13	SCP húmeda	SCP	3,7
			Agua	15,8
Salidas	F15	SCP seca	-	3,9
	F16	Agua evaporada	-	15,6

#### 4.2.11 Balance global

A continuación, se presenta el balance de masa global del proceso. Se puede observar en la Tabla 19 que, a partir de 100 kg de residuos de alga, se obtienen 3,9 kg de SCP seca. Además, se ve que el agua es el mayor recurso utilizado. El error asociado es de 0,08%.

Tabla 19: Balance de masa global del proceso.

Balance global				
	Flujo	Especie	Masa [kg]	Total [kg]
Entradas	F1	Residuos de alga	100,00	548,64
	F2	Agua	412,50	
	F3	Buffer	16,38	
	F5	Enzimas	0,42	
	F9	Medio mínimo	9,67	
	F17	Medio YPD	9,67	
	F18	Pre-inóculo	1,67E-03	
Salidas	F8	Residuo depolimerizado	77,85	548,21
	F14	Filtrado	441,27	
	F15	SCP seca	3,90	
	F16	Agua evaporada	15,58	
	F21	Caldo precultivo	9,62	
		Error		-0,08

#### 4.3 Dimensionamientos

##### 4.3.1 Tanques agitados y agitadores

A partir de los balances de masa de cada etapa, se determina el volumen de trabajo que tendrá cada tanque, puesto que son equipos que operan en forma batch y se considera que las reacciones que ocurren en ellos (en la depolimerización, el precultivo y el cultivo de adaptación) no afectan el volumen final, no así en el caso de la fermentación.

En las primeras etapas mencionadas, para calcular el volumen del tanque se considera que este será igual al volumen de entrada más un volumen libre (o margen de error). El volumen de trabajo corresponde al 80% del volumen total del reactor.

$$V_{tanque} = V_T + V_L = \frac{V_T}{0,8} \quad (6)$$

En el caso del reactor fed-batch, se considera tanto el volumen inicial como el aumento de volumen dado por el flujo de alimentación, el aumento de volumen dado por el crecimiento del microorganismo y el volumen libre.

$$V_T = V_i + F \cdot t_A + \frac{(m_f - m_i)_{TR}}{\rho_{TR}} = 0,8 \cdot V_{tanque} \quad (7)$$

donde,

$V_i$ : Volumen inicial del reactor [L].

$F$ : Flujo de alimentación [L/h].

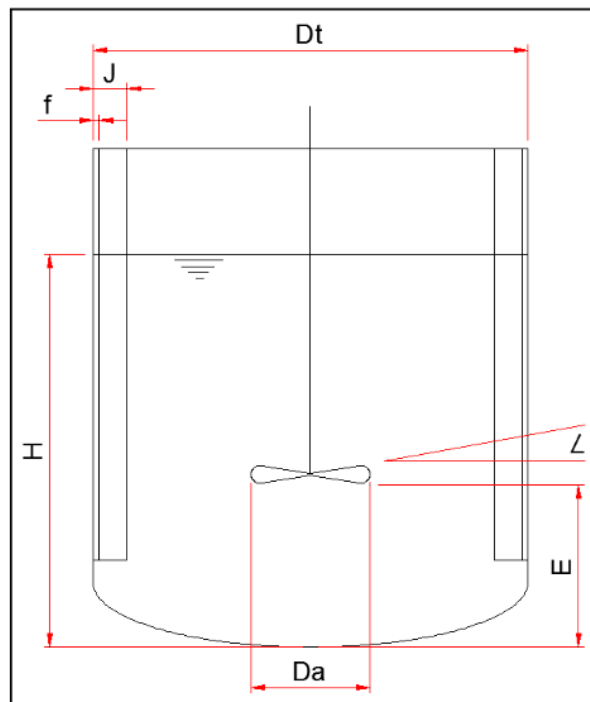
$t_A$ : Tiempo de alimentación [h].

$m_f$ : Masa final de *Trichoderma reesei*[kg].

$m_i$ : Masa inicial de *Trichoderma reesei* [kg].

$\rho$ : Densidad de *Trichoderma reesei* [kg/L].

Además, se considera como supuesto que los tanques tienen geometría cilíndrica y un agitador tipo hélice. Para determinar las dimensiones de estos se utilizan heurísticas o semejanzas geométricas estandarizadas que relacionan las medidas generales de ambos equipos [50]. En la Figura 6 se pueden ver estas correlaciones.



$H / Dt=1$	$Da / Dt=0.33$	$E / Dt=0.33$
$< = 25^\circ$	$J / Dt=0.1$	$f / J=0.02$

Figura 9: Semejanzas geométricas impulsor tipo hélice [50].



La viscosidad del caldo de cultivo se desconoce, pero es necesaria para calcular el número de Reynolds del fluido, y con ello la potencia del agitador. Por ello, a partir de bibliografía [51], se calcula con proporcionalidad directa en base a la concentración de biomasa en el caldo, dando como resultado 0,57 [kg/m·s]. Se reemplazan los datos en la ecuación y se obtiene el Reynolds.

$$Re = \frac{N \cdot d^2 \cdot \rho}{\mu} \quad (8)$$

donde,

N: velocidad de rotación [rps].

d: diámetro del agitador [m].

$\rho$ : densidad del fluido [kg/m<sup>3</sup>].

$\mu$ : viscosidad del fluido [Pa·s].

Para calcular la potencia de los agitadores se consideran factores que relacionan esta con el número de Reynolds del fluido [50]. Para Re menores a 2.000, es decir, flujos laminares, se tiene un factor KL = 43,5; y para Re mayores a 3.000, es decir, flujos turbulentos, se tiene un factor KT = 1. Reemplazando estos valores en las ecuaciones, se obtienen los resultados de las Tablas 20 a la 24.

$$P = KL \cdot N^2 \cdot d^3 \cdot \mu \quad (9)$$

$$P = KT \cdot N^3 \cdot d^5 \cdot \rho \quad (10)$$

donde,

P: potencia del agitador (W)

Tabla 20: Dimensionamiento reactor y agitador de etapa de Neutralización y Depolimerización

Etapa: Neutralización y Depolimerización						
Equipo	T° operación [°C]	pH operación	Agitación [rpm]	Tiempo operación [h]	Volumen de trabajo [L]	Volumen tanque [L]
Tanque agitado	50	5,5	200	20,0	516,7	645,9
Altura [m]	Diámetro [m]	Diámetro agitador [m]	Distancia agitador-fondo [m]	Número de Reynolds	Potencia agitador [W]	
1,09	0,87	0,29	0,29	501954	75,1	

Tabla 21: Dimensionamiento tanque y agitador de etapa de Prealimentación

Etapa: Prealimentación						
Equipo	T° operación [°C]	pH operación	Agitación [rpm]	Tiempo operación [h]	Volumen de trabajo [L]	Volumen tanque [L]
Tanque agitado	25	-	200	1,0	456,3	570,4
Altura [m]	Diámetro [m]	Diámetro agitador [m]	Distancia agitador-fondo [m]	Número de Reynolds	Potencia agitador [W]	
1,04	0,83	0,28	0,28	283667	61,0	

Tabla 22: Dimensionamiento reactor y agitador de etapa de Precultivo

Etapa: Precultivo						
Equipo	T° operación [°C]	pH operación	Agitación [rpm]	Tiempo operación [h]	Volumen de trabajo [L]	Volumen tanque [L]
Tanque agitado	25	-	200	50,0	10,0	12,5
Altura [m]	Diámetro [m]	Diámetro agitador [m]	Distancia agitador-fondo [m]	Número de Reynolds	Potencia agitador [W]	
0,29	0,23	0,08	0,08	22214	0,1	

Tabla 23: Dimensionamiento bioreactor y agitador de etapa de Cultivo de adaptación

Etapa: Cultivo de adaptación						
Equipo	T° operación [°C]	pH operación	Agitación [rpm]	Tiempo operación [h]	Volumen de trabajo [L]	Volumen tanque [L]
Tanque agitado	25	5,5	200	25,0	41,5	51,8
Altura [m]	Diámetro [m]	Diámetro agitador [m]	Distancia agitador-fondo [m]	Número de Reynolds	Potencia agitador [W]	
0,47	0,38	0,13	0,13	57338	1,1	

Tabla 24: Dimensionamiento bioreactor y agitador de etapa de Fermentación

Etapa: Fermentación						
Equipo	T° operación [°C]	pH operación	Agitación [rpm]	Tiempo operación [h]	Volumen de trabajo [L]	Volumen tanque [L]
Tanque agitado	25	5,5	200	30,0	506,1	632,6
Altura [m]	Diámetro [m]	Diámetro agitador [m]	Distancia agitador-fondo [m]	Número de Reynolds	Potencia agitador [W]	
1,08	0,86	0,29	0,29	440	7	

### 4.3.2 Centrífugas

El caudal que debe procesar cada equipo se determina mediante el balance de masa y el tiempo de operación. Tanto el tiempo como el G de operación se basan en las características de procesamiento de una centrífuga tubular. Así se establece que las centrífugas operan a 12000 G y 8000 G, por 30 minutos y 10 minutos, respectivamente.

Para simplificar el dimensionamiento de la centrífuga I, se considera que el medio depolimerizado está conformado por una parte líquida con una densidad y viscosidad igual al agua, y por una parte sólida con densidad igual al alga *Macrocystis pyrifera*. Asimismo, se toma como supuesto que el diámetro de las partículas que se quieren separar es de 0,4 [μm] correspondiente a desechos celulares [52].

Para el dimensionamiento de la centrífuga II, se considera que el precultivo está conformado por una parte líquida con una densidad y viscosidad igual al agua, y por una parte sólida que corresponde a la biomasa de *Trichoderma reesei*. Asimismo, se toma como supuesto que el diámetro de las partículas que se quieren separar es de 10 [μm] [53].

Con estos datos se calcula la velocidad de sedimentación de cada partícula.

$$v_g = \frac{d^2 \cdot (\rho_s - \rho) \cdot g}{18 \cdot \mu} \quad (11)$$

donde,

vg: Velocidad de sedimentación [m/s].

d: Diámetro partícula [m].

ρ<sub>s</sub>: Densidad del sólido [kg/m<sup>3</sup>].

ρ: Densidad del fluido [kg/m<sup>3</sup>]

g: Aceleración de gravedad [m/s<sup>2</sup>].  
 μ: Viscosidad del fluido [kg/m·s].

Con la velocidad de sedimentación y el caudal, se puede obtener el valor de sigma de la centrífuga, y a partir de esto, se pueden determinar sus dimensiones. Para ello es necesario fijar uno de sus parámetros de diseño, ya sea la altura o el radio. En este caso, la altura de la centrífuga I se fija en 1,4 [m] y la de la centrífuga II en 0,3 [m]. Reemplazando la ecuación de G en la ecuación de diseño, se despeja el radio.

$$Q = v_g \cdot \frac{2 \cdot \pi \cdot L \cdot R^2 \cdot \Omega^2}{g} = v_g \cdot \Sigma_{tubular} \quad (12)$$

$$G = \frac{\Omega^2 \cdot R}{g} \quad (13)$$

donde,  
 Q: Caudal [m<sup>3</sup>/s]  
 L: Altura centrífuga [m].  
 R: Radio centrífuga [m].  
 Ω: Velocidad angular de rotación [rad/s].  
 G: Fuerza centrífuga relativa.

Los resultados se muestran en las Tablas 25 y 26.

Tabla 25: Dimensionamiento centrífuga tubular de etapa de Centrifugación I

Etapa: Centrifugación I					
Equipo	T° operación [°C]	G operación	Tiempo operación [h]	Volumen a tratar [L]	Caudal [m <sup>3</sup> /s]
Centrífuga tubular	4	12000	0,5	516,7	0,00028
Velocidad sedimentación [m/s]	Sigma (Q/vg) [m <sup>2</sup> ]	Altura centrífuga [m]	Radio [m]	Diámetro [cm]	
1,18E-08	24351,3	1,4	0,23	46,1	

Tabla 26: Dimensionamiento centrífuga tubular de etapa de Centrifugación II

Etapa: Centrifugación II					
Equipo	T° operación [°C]	G operación	Tiempo operación [h]	Volumen a tratar [L]	Caudal m <sup>3</sup> /s
Centrífuga tubular	4	8000	0,2	10,0	1,66E-05
Velocidad sedimentación [m/s]	Sigma (Q/vg) [m <sup>2</sup> ]	Altura centrifuga [m]	Radio [cm]	Diámetro [cm]	
2,41E-05	0,69	0,3	0,0046	0,0092	

### 4.3.3 Filtro

Para dimensionar el filtro, se deben evaluar parámetros de operación y características del fluido. En cuanto a la operación, se determina que la caída de presión en el filtro es de 13 [kPa] y el tiempo de operación es de 4 horas. Por otra parte, la compresibilidad del caldo de fermentación se considera igual a 0,28 [54].

La resistencia específica de la torta se estima según datos bibliográficos [55], mediante la siguiente ecuación. Determinando la constante empírica alfa, se puede recalculer la resistencia para la presión y compresibilidad de la torta de cada caso.

$$\alpha_s = \alpha \cdot \Delta P^s \quad (14)$$

donde,

$\alpha_s$ : resistencia específica de la torta [m/kg].

$\alpha$ : constante relacionada con el tamaño y forma de la partícula.

P: caída de presión [Pa].

s: compresibilidad de la torta.

La masa de torta por unidad de volumen filtrado se calcula mediante la ecuación 15, que relaciona las fracciones sólidas y húmedas en el fluido a filtrar.

$$C = \frac{J \cdot \rho}{1 - m \cdot J} \quad (15)$$

donde,

C: Masa de torta seca por unidad de volumen de filtrado [kg/m<sup>3</sup>].

J: Fracción másica de sólidos en la suspensión original [kg/kg].

$\rho$ : Densidad del fluido [kg/m<sup>3</sup>].

m: Masa de torta húmeda por unidad de masa de sólidos secos contenidos en ella [kg/kg].

Finalmente, utilizando la ecuación de diseño, se obtiene el área total de filtrado, y tomando en cuenta que el área de filtrado de cada placa del filtro prensa es de 1 [m<sup>2</sup>], se calcula el número de placas necesarias para filtrar todo el flujo.

$$t = \frac{\mu \cdot \alpha_s \cdot C}{2 \cdot \Delta P^{(1-s)}} \cdot \left(\frac{V}{A}\right)^2 \quad (16)$$

donde,

t: Tiempo de operación [s].

$\mu$ : Viscosidad del fluido [kg/m·s].

V: Volumen total de filtrado [m<sup>3</sup>].

A: Área total de filtración [m<sup>2</sup>].

En la Tabla 27 se presentan los resultados del dimensionamiento.

Tabla 27: Dimensionamiento filtro prensa de etapa de Filtración

Etapa: Filtración				
Equipo	Tiempo operación [s]	Caída de presión [Pa]	Volumen total de filtrado [m <sup>3</sup> ]	Área placa [m <sup>2</sup> ]
Filtro prensa	14400	13000	0,44	1,0
Resistencia específica de la torta [m/kg]	Masa de torta por unidad de volumen filtrado [kg/m <sup>3</sup> ]	(V/A) <sup>2</sup>	Área total de filtrado [m <sup>2</sup> ]	N° de placas
8,3E+10	7,6	7,2E-05	52,28	53

#### 4.3.4 Secador

Para la etapa de secado se decide utilizar una estufa de vacío. Este equipo se diseña como un intercambiador de calor, donde la fuente debe permanecer a una temperatura constante igual a 60°C. Por lo anterior, se hace necesario realizar el balance de energía del equipo.

El tiempo de operación es de 1 hora, y se utiliza vapor sobresaturado para calentar, el que tiene una temperatura inicial de 100°C y una temperatura final de 75°C. Además, se considera como dato que el coeficiente global de transferencia de calor (U) del intercambiador es de 1500 [W/m<sup>2</sup> °C] [56].

Una vez obtenido el calor total se despeja de la ecuación 17 el área de intercambio. El dimensionamiento se muestra en la Tabla 28.

$$Q = U \cdot A \cdot \Delta T \quad (17)$$

donde,

Q: Calor suministrado [W].

U: Coeficiente global de transferencia [ $W/m^2\text{°C}$ ].

A: Área de intercambio [ $m^2$ ]

$\Delta T$ : Delta de temperatura [ $\text{°C}$ ].

Tabla 28: Dimensionamiento estufa de vacío de etapa de Secado

Etapa: Secado				
Equipo	Masa a evaporar [kg]	Tiempo operación [s]	T° inicial [ $\text{°C}$ ]	T° operación [ $\text{°C}$ ]
Estufa de vacío	15,6	3600	25	60
Calor a suministrar [KJ/s]	Calor a suministrar [W]	Delta T [ $\text{°C}$ ]	Área de intercambio [ $m^2$ ]	
11	10850	40	0,18	

#### 4.4 Balance de energía

Para los balances de energía se utilizan las ecuaciones de calor sensible y calor latente para determinar el calor total que debe ser agregado o removido a cada proceso. Vale mencionar que el calor latente solo se considera en la etapa de secado, pues es la única donde ocurre un cambio de fase.

$$Q_S = m \cdot c_p \cdot \Delta T \quad (18)$$

$$Q_L = m \cdot \lambda \quad (19)$$

$$Q_{TOTAL} = Q_S + Q_L \quad (20)$$

donde,

Qs: Calor sensible [kJ].

m: Masa a enfriar o calentar [kg].

Cp: Calor específico [ $J/g\text{°C}$ ].

T: Delta de temperatura [ $\text{°C}$ ].

Ql: Calor latente [kJ].

$\lambda$ : Calor de vaporización [kJ/kg].

Una serie de datos y supuestos son considerados para los cálculos. A continuación, se enlistan:

- El calor específico de los residuos de alga es igual al calor específico del alga Sargazo (*Sargassum natans*), que corresponde a 1,54 [J/g°C] [57].
- Se considera que todos los flujos tienen un calor específico igual al del agua.
- Se considera una temperatura ambiente de 20°C.
- Las esterilizaciones ocurren a 120°C por 20 minutos.
- Tanto el medio depolimerizado como el líquido depolimerizado se dejan temperar hasta la temperatura ambiente antes de la centrifugación y la prealimentación, respectivamente.
- En el crecimiento microbiano, se producen 13 [kJ] de calor por cada gramo de masa celular [34].
- La filtración se realiza a la misma temperatura que viene el flujo.
- Por convención, el signo positivo denota que se debe agregar calor al proceso, y el signo negativo que se debe remover calor.

En la Tabla 29 se muestran los resultados, donde se puede notar que los procesos de depolimerización, prealimentación y secado necesitan que se les agregue calor, la centrifugación y ambos cultivos microbianos requieren que se les remueva calor, y la filtración, al ocurrir a temperatura ambiente, no necesita remoción ni adición.

*Tabla 29: Resultados de balance de energía en cada etapa del proceso.*

Etapa	Q total [kJ/lote]
Neutralización	0
Depolimerización	68.435
Centrifugación I	-35.540
Precultivo	-352
Centrifugación II	-853
Prealimentación	9.675
Cultivo de adaptación	-3.229
Fermentación	-262.600
Filtración	0
Secado	39.059

#### 4.5 Servicios y equipos auxiliares

Una vez obtenido el calor total que debe ser removido o agregado en cada etapa, se procede a calcular las dimensiones de los intercambiadores de calor que se utilizarán en cada equipo, y la masa de fluido frío o caliente necesarios, con las siguientes ecuaciones. El delta de temperatura dependerá de la configuración que se tenga, como se ve en la Figura 10.

$$Q_{TOTAL} = U \cdot A \cdot \Delta T_{ML} \quad (21)$$



$$\Delta T_{ML} = \frac{\Delta T_1 - \Delta T_2}{\ln \left( \frac{\Delta T_1}{\Delta T_2} \right)} \quad (22)$$

$$Q_{TOTAL} = m \cdot c_P \cdot \Delta T \quad (23)$$

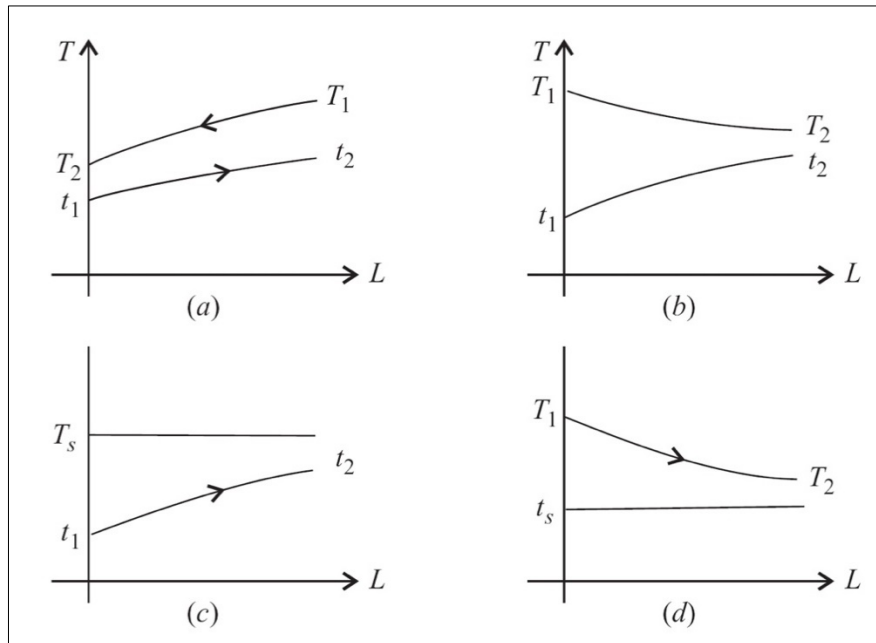


Figura 10: Arreglos básicos: (a) Contraflujo; (b) flujo paralelo; (c) fuente con temperatura constante y receptor con incremento de temperatura; (d) temperatura constante en el receptor y fuente con temperatura en decremento [58].

Los datos y supuestos considerados en el cálculo son los siguientes:

- El calor específico del vapor (steam) es de 1,89 [J/g°C] [59].
- El calor específico del refrigerante es de 1,42 [J/g°C].
- El coeficiente global de transferencia de calor (U) de un serpentín para fluidos de vapor y solución acuosa está entre 500 y 1000 [W/m<sup>2</sup>°C] [56].
- El valor de U de una chaqueta para fluidos de vapor y solución acuosa está entre 500 y 700 [W/m<sup>2</sup>°C] [56].
- El valor de U de una chaqueta para fluidos de vapor y orgánicos livianos está entre 250 y 500 [W/m<sup>2</sup>°C] [56].
- El valor de U de una chaqueta para fluidos de agua y solución acuosa está entre 200 y 500 [W/m<sup>2</sup>°C] [56].
- El valor de U de una chaqueta para fluidos de agua y orgánicos livianos está entre 200 y 300 [W/m<sup>2</sup>°C] [56].

En las Tablas 30 y 31 se muestran los resultados obtenidos. Cabe mencionar, que en el caso de la centrifugación se considera que el equipo de fábrica viene con un sistema para intercambiar calor en su interior.

Tabla 30: Masa total de servicios.

Servicio	Cantidad	Unidad
Masa total de agua de servicio	7.211	[kg/lote]
Masa total de vapor de agua	4.852	[kg/lote]
Masa total de refrigerante	1.281	[kg]

Tabla 31: Dimensionamiento equipos auxiliares.

Proceso	Equipo auxiliar	Área [m2]
Neutralización	-	-
Depolimerización	Serpentín	0,054
Centrifugación I	-	-
Precultivo	Chaqueta	0,14
Centrifugación II	-	-
Prealimentación	Chaqueta	6,55
Cultivo de adaptación	Chaqueta	0,007
Fermentación	Chaqueta	1,12
Filtración	-	-
Secado	-	0,18

#### 4.6 Layout

El diseño preliminar del *layout* se realiza en el programa LucidChart y se presenta en la Figura 11.

Algunas consideraciones para el diseño del layout son que la distancia entre equipos debe ser mayor a 1,5 metros, y la distancia a las paredes del recinto de 2 metros. La distribución de los equipos intenta minimizar el espacio al mismo tiempo que permite el flujo de materia en un orden lógico. Además, se considera una zona alejada donde estará la caldera para producir el vapor necesario para el funcionamiento de los equipos, y una zona de bodegas para almacenar los insumos, y el producto terminado. Por otra parte, se contempla un área de laboratorio dentro de la planta para conservar inóculos de *Trichoderma reesei* en placas o matraces, y llevar a cabo análisis de control de calidad; y una oficina para llevar a cabo todas las funciones administrativas de la empresa.

De acuerdo al Decreto Supremo N° 594 de 1999 [60], se establece que el recinto debe contar con al menos 2 excusados, 2 lavatorios y 2 duchas. Asimismo, se determina que es necesario habilitar un comedor en el lugar de trabajo. Por último, se disponen dos zonas de seguridad, de fácil acceso desde cualquiera de las áreas de la planta.

Con lo anterior, la planta tendría un área aproximada de 425 [m<sup>2</sup>].

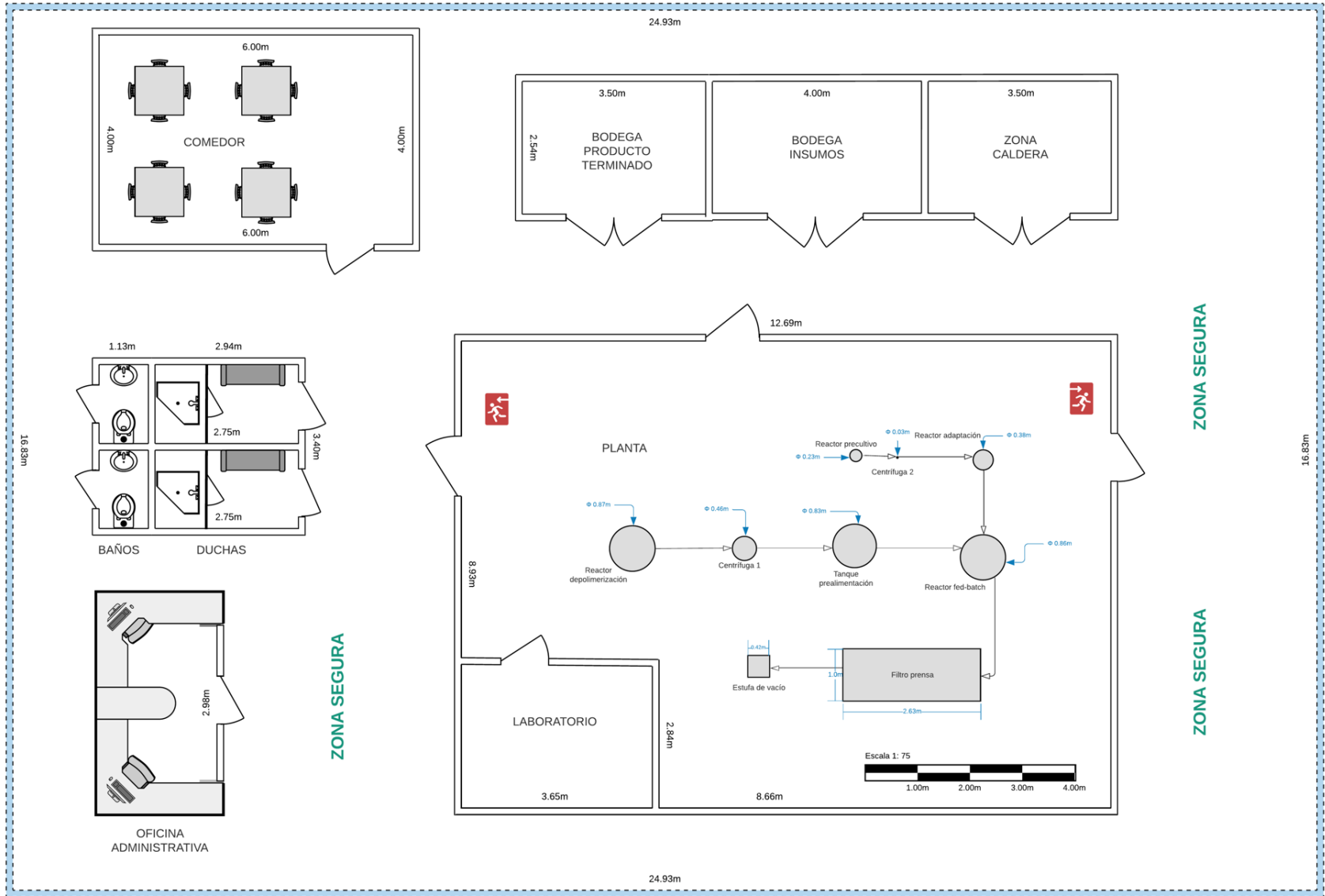


Figura 11: Layout preliminar de la planta piloto de producción de SCP.

## 5. Discusiones

### 5.1 Proceso productivo

#### Pretratamiento

La etapa de neutralización se diseña con el objetivo de subir el pH del residuo de alga y llevarlo al rango de pH óptimo de funcionamiento de las celulasas (5,0 - 5,5) [61]. En este sentido, la elección del buffer acetato de sodio/ácido acético se basa en que el pKa del ácido (4,76) sea cercano al pH de operación. Además, los tampones de acetato son baratos y sencillos de preparar, pueden almacenarse a temperatura ambiente, y hay evidencia que soluciones con este buffer muestran una mayor estabilidad [64].

La etapa de depolimerización sigue los lineamientos de (Camus, 2016), donde los autores buscaban diseñar una etapa que permitiera hidrolizar la celulosa presente en *Macrocystis pyrifera* para obtener glucosa fermentable. En base a ello, se utilizan las mismas proporciones de materia prima, agua y enzimas, y tiempo de reacción en aras de obtener resultados similares. Si bien, como se estableció previamente, el residuo de alga y *Macrocystis pyrifera* tienen una composición similar, es necesario verificar de forma experimental si estos parámetros son óptimos para el proceso.

En cuanto a la primera etapa de centrifugación, se considera que el G y el tiempo de operación son adecuados para los requerimientos del proceso, esto es, un tamaño de partícula menor a 0,5  $\mu\text{m}$  y un volumen de 500 L.

La etapa de prealimentación se agrega al proceso productivo con la finalidad de obtener y almacenar el flujo de alimentación, y también para que este sea esterilizado antes de entrar en contacto con el inóculo en la fermentación.

#### Preparación del inóculo

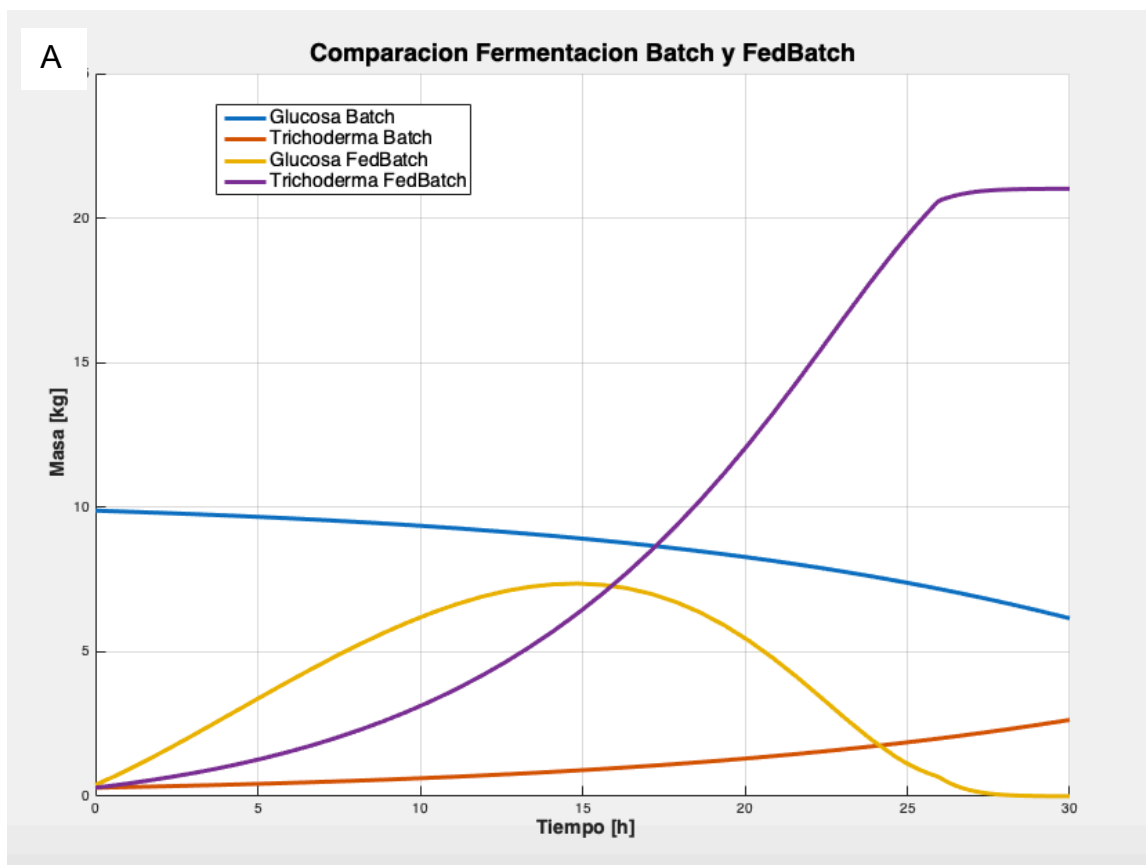
El precultivo en medio YPD permite concentrar biomasa con metabolismo activo para que el microorganismo exprese las enzimas necesarias para degradar los azúcares del medio depolimerizado. En este sentido, el tiempo de operación se escoge en un punto intermedio de la fase exponencial de crecimiento.

La segunda centrifugación tiene el objeto de separar la biomasa del medio YPD, puesto que si queda dextrosa y peptona en el cultivo, la adaptación al nuevo medio tomará más tiempo. Esta etapa tiene un G y tiempo de operación menor que la primera centrifugación ya que el tamaño de la partícula, y su velocidad de sedimentación son mayores, es decir, que necesita una fuerza centrífuga menor para su separación.

El cultivo de adaptación es una etapa que se agrega al proceso con el propósito de que el microorganismo se adapte a las nuevas condiciones de cultivo, es decir, el medio conformado por líquido depolimerizado y medio mínimo. Al igual que en el precultivo, el microorganismo debe ser colectado mientras se encuentre en la fase exponencial, por ello se estima que a las 25 horas es adecuado.

## Fermentación

Respecto a la fermentación, se decide hacer una fermentación fed batch ya que de acuerdo a las simulaciones, para obtener resultados similares en una fermentación batch es necesario hacer varios lotes en forma consecutiva y el tiempo de procesamiento aumenta considerablemente. Como se puede ver en la Figura 12, al simular una fermentación batch, con las mismas condiciones iniciales de la operación fed batch (masa inicial de *Trichoderma reesei*, concentración inicial de glucosa y volumen), a las 30 horas se obtienen 2,6 kg de biomasa (recta naranja), mientras que, en el mismo número de horas, la fermentación fed batch produce 20,5 kg (recta morada), es decir, casi 8 veces esa cantidad.



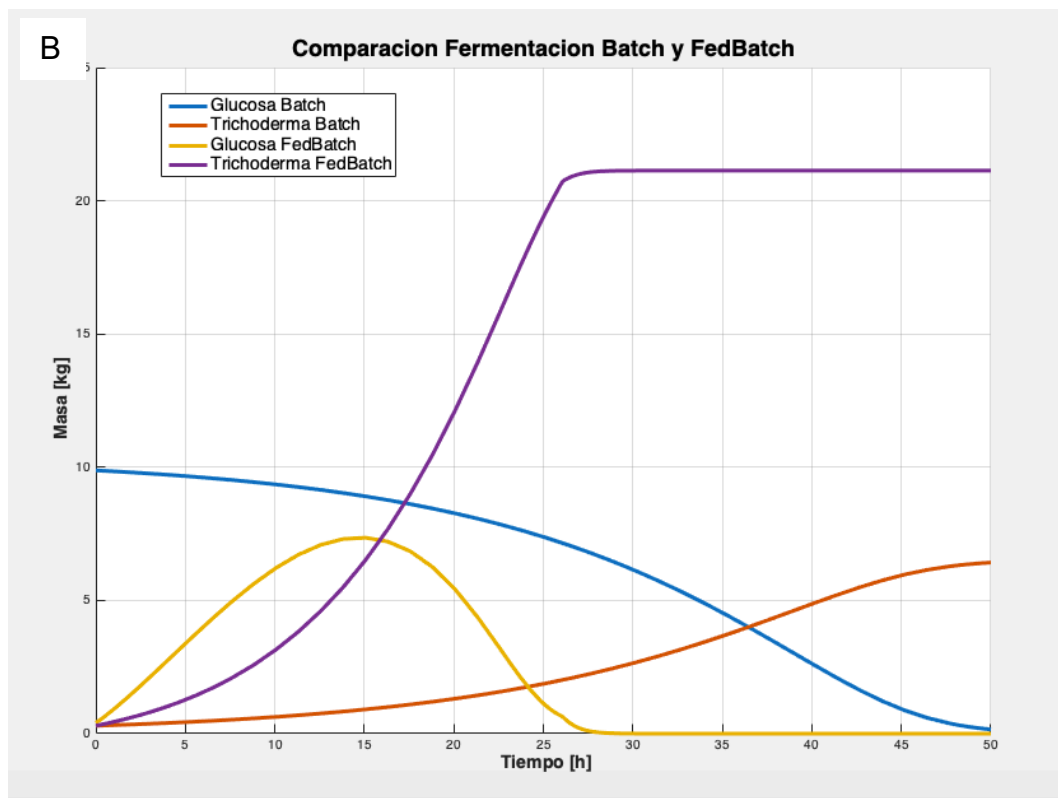


Figura 12: Modelo de crecimiento de *Trichoderma reesei* en fermentación batch y fedbatch. (A) A las 30 horas de cultivo. (B) A las 50 horas de cultivo.

### Recuperación SCP

Se escoge una etapa de filtración, para obtener la biomasa post fermentación, por sobre una centrifugación dado que el caldo de fermentación tiene una alta concentración de sólidos, cercana a 40 [g/L]. Asimismo, se elige un filtro prensa, ya que los resultados de dimensionamiento indican que el área de filtrado es considerable (52 m<sup>2</sup>) y mediante este equipo se puede optimizar el espacio, además que tienen una eficiencia de separación mayor que otros tipos de filtro.

La etapa de secado es importante para disminuir el porcentaje de ácidos nucleicos en la biomasa, asegurando su inocuidad, así como también para su correcto almacenamiento. La selección de una estufa de vacío se debe a que el producto es sensible a las altas temperaturas, y este equipo permite reducir la humedad a bajas temperaturas, mediante el uso del vacío.

### Proceso global

Respecto a la operación de la planta, para que el tiempo de obtención de producto sea de 2 días, es necesario que se cumplan dos condiciones: en primer lugar, la planta debe operar siete días a la semana y en un turnos de día y noche, y en segundo lugar, las etapas de precultivo se deben realizar en forma aproximadamente continua, es decir, la

holgura para descarga y lavado del reactor de precultivo entre lotes, es pequeña, y el margen de error también lo es. En este sentido, la etapa y el equipo de precultivo deben tener un control exhaustivo. Considerando todo lo anterior, la producción anual podría estar sobreestimada, ya que no toma en cuentas estas exigencias, sin embargo, también se podría considerar tener dos reactores de precultivo para evitar atrasos.

## 5.2 Balance de masa

En la etapa de neutralización, el supuesto más fuerte utilizado es considerar que el buffer tenga una concentración molar de 0,5 M. Esta elección se basa en que el buffer debe estar lo suficientemente concentrado para resistir el cambio de pH por la adición del residuo ácido, en otras palabras, necesita tener una gran capacidad de amortiguación. Para mejorar esta estimación, se podrían hacer pruebas en laboratorio, midiendo el pH resultante con distintas concentraciones de buffer.

En la depolimerización, utilizar la proporción de enzimas por kilogramo de materia prima indicada en bibliografía es un supuesto fuerte ya que la dosis usada afecta directamente la eficiencia de conversión de las enzimas, y esta dosis depende del porcentaje de celulosa en la materia prima. Tomando esto en consideración, la masa de enzimas calculada está subestimada, ya que el residuo posee un porcentaje de celulosa mayor que *Macrocystis pyrifera*. De igual forma, el tiempo de incubación podría estar subestimado, ya que sin un ensayo no se sabe a ciencia cierta si este tiempo será suficiente para proveer una depolimerización efectiva del residuo.

En concordancia con lo mencionado anteriormente, en la primera etapa de centrifugación, también es un supuesto fuerte considerar que el complejo enzimático tiene un 90% de conversión, porque esta depende de la proporción de enzimas utilizada, sin embargo, de acuerdo a la información del fabricante [43], este valor se puede alcanzar con la dosis adecuada. Por otra parte, es igualmente un supuesto fuerte asumir la composición de carbohidratos del residuo de alga, ya que la composición del alga presenta variabilidad dependiendo de la localización y estación del año en que es cosechada, así como de la edad fisiológica de la especie. En este sentido, es complejo decir si el supuesto sobre o subestima el flujo de medio depolimerizado y de glucosa en él.

En cuanto al precultivo, los supuestos más fuertes son los parámetros cinéticos utilizados, ya que fueron obtenidos a partir de distintas referencias. La constante de saturación corresponde al promedio de 5 simulaciones matemáticas de (Velkovska, 1997), donde se utiliza celulosa como sustrato. Similarmente, la velocidad de crecimiento máxima fue determinada por (Ma et al, 2013) mediante una simulación y el sustrato correspondía a celulosa microcristalina. El rendimiento de 0,63 g de biomasa por gramo de glucosa, fue reportado por (Seidl et al, 2008), usando glucosa como sustrato. Lo anterior indica que las estimaciones son débiles ya que se combinan distintas metodologías con distintos sustratos. Por lo tanto, se hace necesario determinar experimentalmente los datos cinéticos para dimensionar con mayor precisión los flujos de biomasa.



En el cultivo de adaptación, utilizar los mismos parámetros cinéticos de la etapa de precultivo es un supuesto fuerte, porque se presume que un microorganismo tendrá diferentes velocidades de crecimiento en diferentes sustratos, y además, al pasar a un medio de cultivo más complejo, la fase lag debería ser más prolongada. Por ello, el flujo de biomasa en esta etapa se encuentra sobredimensionado. Del mismo modo, la concentración de salida de biomasa y glucosa están sobreestimadas, repercutiendo en las estimaciones de la fermentación fed batch.

En la etapa de fermentación, al utilizar los mismos parámetros cinéticos de la etapa de precultivo, se tienen los mismos problemas de estimación. Pero además, es un supuesto fuerte fijar el flujo de alimentación en 16 [L/h], ya que este valor no optimiza la producción de biomasa, y su elección se basa en que todo el volumen de 'Feed' fuese alimentado en un tiempo razonable (26 horas) y que la curva de crecimiento se ajustara a lo esperado según la teoría. En este sentido, se hace importante que en la práctica se puedan optimizar estos parámetros de operación, para maximizar la producción de biomasa.

En el secado, es un supuesto fuerte asumir el contenido de humedad inicial de la proteína unicelular, ya que se considera como el promedio de dos referencias que utilizan microorganismos distintos a *Trichoderma reesei*. Sin embargo, no es posible determinar si este valor está sobre o subestimado, pero, en el primer caso, la masa de SCP seca estaría subestimada ya que se estaría evaporando más agua de la que realmente tiene, y en el segundo caso, la masa de SCP estaría sobreestimada ya que el producto quedaría con más agua (y por tanto más masa) de lo esperado.

### **5.3 Dimensionamiento**

Los tanques agitados se encuentran sobredimensionados ya que en sus cálculos se consideran criterios estándar de seguridad, incorporando un volumen extra para evitar derrames. Por esta razón, la potencia y dimensiones de los agitadores también están sobreestimadas.

Como se puede observar en la Tabla 19, el radio calculado de la centrífuga es incongruente ya que es varias órdenes de magnitud menor a 1 [cm]. Esto se puede deber a que el volumen a tratar es muy pequeño (10 litros), lo que hace que el caudal y a la vez el sigma de la centrífuga sean pequeños. En este sentido, sería razonable considerar que esta etapa de separación se realice en una centrífuga de laboratorio (de botellas), en vez de una tubular.

En cuanto al filtro prensa, se estima que el área total de filtrado es de gran magnitud, lo que se debe principalmente a la compresibilidad de la torta. Cabe mencionar que la sensibilidad del dimensionamiento es alta con respecto a este parámetro, ya que por ejemplo, si la torta fuese incompresible ( $s = 0$ ), el área tendría un valor de 9,7 m<sup>2</sup>, en cambio, si esta fuese totalmente compresible ( $s = 1$ ), el área sería de 3984 m<sup>2</sup>. Por lo

tanto, este es un parámetro que debiese ser determinado experimentalmente para tener una mejor aproximación, y así evitar incurrir en gastos innecesarios.

#### **5.4 Balance de energía**

Respecto al balance de energía, se considera que los supuestos utilizados son razonables y que los flujos se encuentran adecuadamente estimados. Así se obtiene que el consumo energético asociado a adición o remoción de calor es de 116 [kWh] por lote, y que anualmente sería cercano a 18 [MWh]. De acuerdo a bibliografía [65], el consumo energético anual promedio de un proceso de fermentación industrial es de 66,4 [MWh]. En comparación, los resultados obtenidos tienen el mismo orden de magnitud, y la diferencia se puede deber a que se trata de una planta a escala piloto, y que en los cálculos, no consideran el gasto energético relacionado con agitación y aireación de equipos, luminaria, entre otros.

#### **5.5 Servicios y equipos auxiliares**

En cuanto a la masa de agua de servicio, vale mencionar que se encuentra subdimensionada ya que no se considera el agua de lavado de los equipos. Aun así, su valor es alto si se compara con los flujos de materia prima y producto, 1 y 3 órdenes de magnitud mayor, respectivamente. Tomando esto en cuenta, a futuro se podría considerar la integración energética entre algunos flujos e incorporar una etapa de tratamiento de aguas, para recuperar parte del agua utilizada.

La masa de vapor de agua, por su parte, también es 1 y 3 órdenes de magnitud mayor que los flujos de materia prima y producto, sin embargo, se estima que su cálculo está bien dimensionado, a pesar que no se encontraron datos bibliográficos para su comparación.

Respecto al refrigerante, se considera que este viene incorporado en los equipos de centrifugación, los cuales poseen un sistema para su reciclaje. Por esta razón, en la Tabla 31 no se presentan las dimensiones de sus intercambiadores de calor. Análogamente, los equipos en los que no ocurre un intercambio de calor, tampoco presentan dimensiones.

Sobre las chaquetas térmicas se puede mencionar que sus dimensiones son congruentes con las dimensiones de los equipos que temperan, es decir, que el área de intercambio es menor al área del manto del tanque, a excepción, de la prealimentación, donde el área es más de 2 veces mayor al área del manto del equipo, por lo que los requerimientos energéticos se consideran altos y en la realidad no se podrían suministrar correctamente mediante el uso de una chaqueta térmica. En este último caso, se puede considerar

agregar un intercambiador de calor externo que permita proporcionar parte del calor necesario.

## **5.6 Layout**

Respecto al *layout* de la planta, es importante recordar que se trata de un diseño preliminar, que busca plasmar a grandes rasgos la disposición de los equipos y las áreas mínimas que requiere la planta para su correcto funcionamiento. En este contexto, para realizar un diseño más cercano a la realidad, sería necesario estimar el número de trabajadores que necesita la planta, así como la estructura organizacional de ella. Asimismo, sería conveniente conocer la posible localización para que la orientación de la planta permita evitar incendios, y se consideren los accesos de vehículos.

## 6. Conclusiones

En conclusión, la planta piloto para producir 608 kg anuales de SCP a partir de 15,6 ton de residuos algales contaría con 9 equipos, los que serían 2 reactores, 3 bioreactores, 2 centrifugas, un filtro prensa y una estufa de vacío, y el proceso productivo estaría separado en 10 operaciones unitarias, para la obtención de proteína unicelular seca de *Trichoderma reesei*. Los principales insumos serían agua, buffer, medio mínimo y medio YPD, y los principales residuos serían el filtrado post fermentación y el residuo depolimerizado. El área de esta sería cercana a los 425 m<sup>2</sup>, y tendría un consumo energético de 116 [kWh] por lote.

Los servicios necesarios serían 7.200 kg de agua y 4.800 kg de vapor de agua por lote, y este último se produciría en la planta con una caldera.

En cuanto al balance de masa, las etapas con supuestos más fuertes son los cultivos de *Trichoderma reesei*, ya que al utilizar los mismos parámetros cinéticos para los tres procesos, se sobreestima la biomasa obtenida. Para solucionar esto, sería necesario determinar los parámetros en forma experimental, y así obtener una estimación más robusta. Por otra parte, a partir del balance se determina que se obtendrían 38,95 g de SCP seca por cada kg de residuo de alga.

Con lo anterior, se establece que se cumplen los objetivos planteados, desarrollando con éxito el diseño conceptual de una planta piloto para la producción de proteína unicelular de *Trichoderma reesei*, usando residuos de la industria algal como fuente de carbono.

## 7. Recomendaciones y proyecciones

- Dado el carácter celulolítico de *Trichoderma reesei*, se recomienda considerar la posibilidad de una despolimerización y fermentación simultánea, tomando en cuenta que es necesario adicionar la  $\beta$ -glucosidasa al medio, para una conversión eficiente de la celulosa presente en el residuo. Asimismo, se puede considerar un cultivo mixto, con una cepa que produzca dicha enzima.
- De acuerdo con los datos cinéticos encontrados en bibliografía para *Trichoderma reesei*, se podría decir que la velocidad de crecimiento máxima y el rendimiento se encuentran acotados y tienen el mismo orden de magnitud, pero no existen demasiados datos sobre la constante de saturación. Por ello, se hace necesario determinar experimentalmente la cinética de crecimiento en el residuo algal, además de algunos parámetros que pueden mejorar las estimaciones tales como la viscosidad y compresibilidad del caldo de fermentación, y el tamaño de partícula del residuo post despolimerización y de *Trichoderma reesei* post fermentación.
- En cuanto a los servicios utilizados, se estima conveniente evaluar la posibilidad de integración energética, para enfriar o calentar algunos flujos, y disminuir en cierta medida el gasto energético del proceso.
- Igualmente se recomienda evaluar el tratamiento de residuos dentro de la planta, ya que, por una parte, estos podrían tener compuestos de interés (proteínas, alginato, etc.) y, por otra parte, se puede recuperar un porcentaje del agua de proceso, y darle uso como agua de servicio. En este contexto, también es interesante realizar una evaluación ambiental del proyecto.
- También, una estimación de costos es necesaria para determinar si el proyecto es rentable, y para replantear la elección de algunos equipos (por alternativas más económicas que cumplan la función deseada).
- Por último, a modo de proyección, se debe determinar la factibilidad comercial del producto, evaluando sus características organolépticas, el perfil aminoacídico y la formulación, y estudiar el marco regulatorio para este tipo de alimentos.

## 8. Bibliografía

- [1] Ritala, A., Hakkinen, S., Toivari, M. y Wiebe, M. (2017). Single Cell Protein-State of the Art, Industrial Landscape and Patents 2001-2016. *Front. Microbiol.*
- [2] Naciones Unidas. Una población en crecimiento. (2017). [En línea]. Disponible en: <https://www.un.org/es/sections/issues-depth/population/index.html>. [consulta: Enero 2020].
- [3] Anupama, P. (2000). Value-added food: Single cell protein. *Biotechnology Advances*, vol. 18.
- [4] Martin, A. (2012). Bioconversion of Waste Materials to Industrial Products, pp. 396-397.
- [5] Ministerio del Medio Ambiente. (2019). Cuarto Reporte del Estado del Medio Ambiente. Santiago.
- [6] Brisa. Valorización de los residuos. (2017). [En línea]. Disponible en: <http://www.brisa.cl/valorizacion-de-los-residuos/>. [consulta: Enero 2020].
- [7] Greenpeace. Carne. [En línea]. Disponible en: <https://es.greenpeace.org/es/trabajamos-en/consumismo/carne/>. [consulta: Enero 2020].
- [8] Greenpeace. (2018). El sistema de producción de carne y lácteos en 2050 según Greenpeace.
- [9] Chambergó, F., Valencia, E., Camilo, C. y Campana, P. (2012). Conformational stability of recombinant manganese superoxide dismutase from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 50, pp. 19-24.
- [10] FAO. (2019). FAO Aquaculture Newsletter No. 60.
- [11] Rodrigues, D., Freitas, A. y Pereira, L. (2015). Chemical composition of red, brown and green macroalgae from Buarcos bay in Central West Coast of Portugal,» *Food Chemistry*, vol. 183, pp. 197-207.
- [12] Uarac, Y. (2019). Evaluación de la producción de proteínas unicelulares utilizando *Ulva rigida* como fuente de carbono. Tesis Ingeniería Civil Química y en Biotecnología. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas.
- [13] Great Barrier Reef Marine Park Authority. (2008). Environmental Status of the Great Barrier Reef: Macroalgae (Seaweeds).
- [14] The Fish Site. Macroalgae: The Facts. (2011). [En línea]. Disponible en: <https://thefishsite.com/articles/macroalgae-the-facts>. [consulta: Enero 2020].

- [15] The Seaweed Site. Phaeophyceae: Brown Algae. [En línea]. Disponible en: <http://www.seaweed.ie/algae/phaeophyta.php>. [consulta: Enero 2020].
- [16] Sharma, O. (1986). Textbook of Algae, pp. 296-304.
- [17] Vásquez, J. (2008). Bases ecológicas y evaluación de usos alternativos para el manejo de praderas de algas pardas de la III y IV regiones.
- [18] Schuster, A. y Schmoll, M. (2010). Biology and biotechnology of Trichoderma. Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 87, pp. 787-799.
- [19] Seidl, V., Gamauf, C. y Kubicek, C. (2008). The Hypocrea jecorina (Trichoderma reesei) hypercellulolytic mutant RUT C30 lacks a 85 kb (29 gene-encoding) region of the wild-type genome. BMC Genomics.
- [20] Ortiz, G., Albertó, E. y Blasco, M. (2016). Functional evaluation of ToxA promoter in Trichoderma reesei Rut- C30. Bio Technology An Indian Journal, vol. 12, pp. 39-44.
- [21] Nakari-Setälä, T., Paloheimo, M. y Kallio, J. (2009). Genetic Modification of Carbon Catabolite Repression in Trichoderma reesei for Improved Protein Production,» Applied and Environmental Microbiology.
- [22] M. Zaki y S. Said, «Trichoderma Reesei single cell protein production from rice straw pulp in solid state fermentation,» 2018.
- [23] Said, S., Zaki, M., Novita, E. y Asnawi, T. (2019). Production of single cell protein by a local Trichoderma reesei in solid state fermentation: effects of process variables.
- [24] Muñoz, R. (2018). Cultivo de hongos marinos a partir de residuos de la industria algal rica en alginato. Tesis Ingeniería Civil Química y en Biotecnología. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas.
- [25] Ghanem, K. (1992). Single cell protein production from beet pulp by mixed culture.
- [26] Li, C., Lin, F., Li, Y. *et al.* (2016). A  $\beta$ -glucosidase hyper-production *Trichoderma reesei* mutant reveals a potential role of cel3D in cellulase production.
- [27] Moore, D. Fungal growth in liquid cultures. [En línea]. Disponible en: [http://www.davidmoore.org.uk/21st\\_Century\\_Guidebook\\_to\\_Fungi\\_PLATINUM/Ch17\\_05.htm](http://www.davidmoore.org.uk/21st_Century_Guidebook_to_Fungi_PLATINUM/Ch17_05.htm) [consulta: Enero 2021].
- [28] Martos, M. A. (2011). Modo de operación de bioreactores: Cátedra Biotecnología de los Alimentos. Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones (UNaM).

- [29] Ma, L., Li, C., Yang, Z., Jia, W., Zhang, D., y Chen, S. (2013). Kinetic studies on batch cultivation of *Trichoderma reesei* and application to enhance cellulase production by fed-batch fermentation. *Journal of Biotechnology*, 166(4), 192–197.
- [30] Velkovska, S., Marten, M. R., y Ollis, D. F. (1997). Kinetic model for batch cellulase production by *Trichoderma reesei* RUT C30. *Journal of Biotechnology*, 54(2), 83–94.
- [31] Pakula, T.M., Salonen, K., Uusitalo, J., Penttilä, M.E. (2005). The effect of specific growth rate on protein synthesis and secretion in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Microbiology* 151, 135–143.
- [32] Lo, C.-M., Zhang, Q., Callow, N. V., y Ju, L.-K. (2010). Cellulase production by continuous culture of *Trichoderma reesei* Rut C30 using acid hydrolysate prepared to retain more oligosaccharides for induction. *Bioresource Technology*, 101(2), 717–723.
- [33] Penttilä, M., Nevalainen, H., Rättö, M., Salminen, E., y Knowles, J. (1987). A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Gene*, 61(2), 155–164.
- [34] Ugalde, U. O., Castrillo, J. I. (2002). Single cell proteins from fungi and yeasts. *Applied Mycology and Biotechnology*, 123-149.
- [35] Camus, C., Ballerino, P., Delgado, R., Olivera-Nappa, Á., Leyton, C., y Buschmann, A. H. (2016). Scaling up bioethanol production from the farmed brown macroalga *Macrocystis pyrifera* in Chile. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 10(6), 673–685.
- [36] Satpati, G., Pal, R. (2011). Biochemical composition and lipid characterization of marine green alga *Ulva rigida*- a nutritional approach. *Journal of Algal Biomass Utilization* 2(4): 10-13
- [37] Camus, C., Hernández-González, M. del C., y Buschmann, A. H. (2018). The seaweed resources of Chile over the period 2006–2016: moving from gatherers to cultivators. *Botanica Marina*, 0(0).
- [38] Landeta, C., Muñoz, R., Blanco, A., y Lienqueo, M. E. (2020). Valorization and upgrading of the nutritional value of seaweed and seaweed waste using the marine fungi *Paradendryphiella salina* to produce mycoprotein. *Algal Research*.
- [39] Uju, Wijayanta, A. T., Goto, M., y Kamiya, N. (2015). Great potency of seaweed waste biomass from the carrageenan industry for bioethanol production by peracetic acid–ionic liquid pretreatment. *Biomass and Bioenergy*, 81, 63–69.
- [40] Cellulase, enzyme blend SAE0020. Cellic CTec2. [En línea] Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/sae0020?lang=es@ion=CL>. [consulta: Marzo 2021].
- [41] Kumar, A., Subramanian, V., K. Velaga, S., Kodandaraman, J., Sujatha, P. N., Baskaran, R., Kumar, S., y Ananda Rao, B. (2019). Performance evaluation of a



- tubular bowl centrifuge by using laser obscuration method as an online measurement tool. *Separation Science and Technology*, 55(10), 1839–1851.
- [42] Wahlström, N. (2020). Cellulose from the green macroalgae *Ulva lactuca*: isolation, characterization, optotracing, and production of cellulose nanofibrils. *Cellulose*.
- [43] Novozymes. (2017). Novozymes Cellic CTec3 HS - secure your plant's lowest cost. [En línea] Disponible en: [https://www.novozymes.com/-/media/Project/Novozymes/Website/website/advance-your-business/05\\_L2\\_Bioenergy/Benefit-sheets/Cellic-CTec3-HS-application-sheet-NA](https://www.novozymes.com/-/media/Project/Novozymes/Website/website/advance-your-business/05_L2_Bioenergy/Benefit-sheets/Cellic-CTec3-HS-application-sheet-NA) [consulta: Marzo 2021].
- [44] YPD liquid medium and plates with drugs. (2021). Cold Spring Harbor Laboratory. [En línea] Disponible en: [http://cshprotocols.cshlp.org/content/2017/4/pdb.rec089516.full?text\\_only=true](http://cshprotocols.cshlp.org/content/2017/4/pdb.rec089516.full?text_only=true) [consulta: Marzo 2021].
- [45] Lecault, V., Patel, N., y Thibault, J. (2009). An image analysis technique to estimate the cell density and biomass concentration of *Trichoderma reesei*. *Letters in Applied Microbiology*, 48(4), 402–407.
- [46] Twin Filter. (2010). Comparison of filter press and VPL/DE filters. [En línea] Disponible en: [https://www.twinfiler.com/App\\_Files/FileInstances/Download/439/en-GB/Published/ComparisonOfFilterPressAndVPLDEFilters.pdf](https://www.twinfiler.com/App_Files/FileInstances/Download/439/en-GB/Published/ComparisonOfFilterPressAndVPLDEFilters.pdf) [consulta: Marzo 2021].
- [47] Denny, A., Aisbitt, B., y Lunn, J. (2008). Mycoprotein and health. *Nutrition Bulletin*, 33(4), 298–310.
- [48] Ziadi, Saba. (2018). Preparation of culture media for growth *Trichoderma Harizanum* from residues of black tea (Waste Tea). 18. 197-200.
- [49] S. Ghorai, S.P. Banik, D. Verma, S. Chowdhury, S. Mukherjee, S. Khowala, 3.51 - Fungal Biotechnology in Food and Feed Processing, Editor: Murray Moo-Young, *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*, Academic Press, 2011, Pages 603-615.
- [50] Castillo, V. (2013). Diseño y cálculo de un agitador de fluidos. Universidad Del Bío Bío.
- [51] Goudar, C. T., Strevett, K. A., y Shah, S. N. (1999). Influence of microbial concentration on the rheology of non-Newtonian fermentation broths. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(3), 310–315.
- [52] Lienqueo, M. E. (2018). Separación sólido-líquido: Centrifugación [Diapositivas]. Universidad de Chile.

- [53] Novy, V., Schmid, M., Eibinger, M., Petrasek, Z., y Nidetzky, B. (2016). The micromorphology of *Trichoderma reesei* analyzed in cultivations on lactose and solid lignocellulosic substrate, and its relationship with cellulase production. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1).
- [54] Liu, T., y Yu, D. (1993). Morphological measurements on *Penicillium chrysogenum* broths by rheology and filtration methods. *Biotechnology and Bioengineering*, 42(6), 777–784.
- [55] Katagiri, N., Tomimatsu, K., Date, K., y Iritani, E. (2021). Yeast cell cake characterization in alcohol solution for efficient microfiltration. *Membranes*, 11(2), 89.
- [56] Heat Exchangers: Typical Overall Heat Transfer Coefficients. (n.d.). Engineering Page. [En línea] Disponible en: <http://www.engineeringpage.com/technology/thermal/transfer.html> [consulta: Marzo 2021].
- [57] Wang, S., Jiang, X. M., Wang, Q., Ji, H. S., Wu, L. F., Wang, J. F., y Xu, S. N. (2013). Research of specific heat capacities of three large seaweed biomass. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 115(3), 2071–2077.
- [58] Jaramillo, O. A. (2007). Intercambiadores de calor. Centro de Investigación en Energía. Universidad Nacional Autónoma de México.
- [59] Engineering ToolBox, (2005). Water Vapor - Specific Heat. [En línea] Disponible en: [https://www.engineeringtoolbox.com/water-vapor-d\\_979.html](https://www.engineeringtoolbox.com/water-vapor-d_979.html) [consulta: Marzo 2021].
- [60] Decreto 594 de 1999. Aprueba reglamento sobre condiciones sanitarias y ambientales básicas en los lugares de trabajo. 15 de Septiembre de 1999.
- [61] Novozymes. (2010). Novozymes Cellic CTec2 and HTec2 – Enzymes for hydrolysis of lignocellulosic. Application sheet. [En línea] Disponible en: <https://www.yumpu.com/en/document/read/35286682/novozymes-cellicar-ctec2-and-htec2-enzymes-for-hydrolysis-of-> [consulta: Marzo 2021].
- [62] Acetic acid. (2018). PubChem. [En línea] Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acetic-acid#section=Information-Sources> [consulta: Marzo 2021].
- [63] Martinez, P. (2019). La curva del crecimiento bacteriano. [En línea] Disponible en: <https://pompiliomartinez.wordpress.com/2014/07/02/la-curva-del-crecimiento-bacteriano/> [consulta: Marzo 2021].
- [64] *Acetate buffer (pH 3.6 to 5.6) preparation and recipe*. (2019). AAT Bioquest. [En línea] Disponible en: <https://www.aatbio.com/resources/buffer-preparations-and-recipes/acetate-buffer-ph-3-6-to-5-6> [consulta: Abril 2021].
- [65] Curran, J. S., Smith, J., & Holms, W. (1989). *Heat-and-power in industrial fermentation processes*. *Applied Energy*, 34(1), 9–20.

## 9. Anexos

### 9.1 Anexo 1: Crecimiento microbiano

Como se muestra en la Figura 2, en el crecimiento microbiano se pueden diferenciar 6 fases, las que se explican a continuación.

1.Fase lag: Periodo de adaptación a las condiciones de cultivo. Durante esta etapa no hay división celular pero sí aumento de la masa individual de los microorganismos. La duración de esta etapa depende de la cantidad inicial de inóculo, edad y estado fisiológico de las células [28].

2.Fase de aceleración: Finalizada la fase lag, la concentración de biomasa ( $X$ ) comienza a aumentar en forma lenta y luego más rápidamente. Esta curva es causada por el hecho de que no todas las células del inóculo empiezan a crecer al mismo tiempo [28].

3.Fase exponencial: En esta etapa las células crecen a una velocidad específica máxima y constante ( $\mu_{max}$ ), y representa el mayor potencial reproductivo de la célula. Al final de esta se alcanza la máxima concentración microbiana ( $X_f = X_{max}$ ) [28].

4.Fase de desaceleración: Rápido período de desaceleración causada por una disminución de la concentración de la fuente de carbono (sustrato limitante) en el medio, por debajo de lo necesario para mantener  $\mu_{max}$  o por acumulación de inhibidores [28].

5.Fase estacionaria: El estrés producido por la falta de nutrientes o por inhibidores generan un medio hostil e induce una reestructuración de las células para adaptarse a las nuevas condiciones. Las células pueden permanecer viables durante un período relativamente largo, y producir metabolitos secundarios (ej. antibióticos, hormonas) [28].

6.Fase de muerte: En esta última etapa, la concentración celular disminuye como resultado de la escasez de reservas de energía o por autólisis. Al igual que el crecimiento, la muerte de las células es constante y en un gráfico semilogarítmico se representa como una línea recta [28].

## 9.2 Anexo 2: Cálculo concentraciones buffer

Para calcular las concentraciones de ácido acético y acetato de sodio en el buffer, se utiliza la ecuación de Henderson-Hasselbalch que relaciona el pH con la concentración de base conjugada y ácido, considerando que se quiere llegar a un pH de 5,5. Como dato además se tiene que el pKa del ácido acético es 4,76 a 25°C [62]. Reemplazando en la ecuación 24:

$$pH = pKa + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \quad (24)$$

$$5,5 = 4,76 + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

$$\frac{[A^-]}{[HA]} = 10^{0,74} = 5,49$$

Se obtiene que por cada mol de ácido acético, se deben agregar 5,49 moles de acetato de sodio a la solución para tener un pH de 5,5.

## 9.3 Anexo 3: Código Matlab

A continuación se presente el código utilizado en la simulación del precultivo y fermentación de *Trichoderma reesei* en el software Matlab

```
function dy=odetr(t,y,P)
Sg=y(1); % Concentracion de Glucosa
X=y(2); % Concentracion de Celulas
dy=zeros(2,1);

%Sistema de ecuaciones
dy(1)=- (P.u*X)*(Sg/(P.ks+Sg))/(P.Y_xs); % Balance masa de Glucosa
dy(2)= (P.u*(Sg/(P.ks+Sg)))*X; % Balance de masa de Celulas
end

%% Programa Principal Precultivo de Trichoderma
close all
clear all
clc

%% Parametros cineticos
P.u=0.091; %[1/h] velocidad crecimiento maxima
P.Y_xs=0.63; % [g/g] rendimiento
P.ks=4.64; %[g/L] constante saturacion
```

```

%% Condiciones Iniciales
Sg0=19.9; % Concentracion Inicial de Glucosa
X0=0.167; % Concentracion Inicial de Celulas
tspan= [0 70];
CI=[Sg0 X0]; % vector de condiciones iniciales

[t, y] = ode45(@ (t,y) odetr(t,y,P), tspan, CI);
%% Grafico de concentraciones de biomasa y glucosa
hold on
plot(t,y(:,1),'linewidth',3)
plot(t,y(:,2),'linewidth',3)
xlabel('\bf Tiempo [h]','FontSize',14)
ylabel('\bf Concentracion [g/l]','FontSize',14)
title('Precultivo Trichoderma reesei RUTC30','FontSize',18)
grid on
l=legend('Glucosa','Trichoderma')
l.FontSize = 15;

function dy=odefedbatch(t,y,P)
SV=y(1); % Masa de Glucosa
XV=y(2); % Masa de Trichoderma
V=y(3); % Volumen de trabajo

dy=zeros(3,1);
Feed=16; %Flujo de alimentacion [L/h]
Sfeed=21.6; %Concentracion de glucosa en flujo de alimentacion [g/L]

if t<0 || t>26
    P.F=0;
else
    P.F=Feed;
end

P.Sf=Sfeed;

S=SV/V;
X=XV/V;
dSdt= ((P.F*P.Sf)/V)-(P.u*X)*(S/(P.ks+S))/(P.Y_xs); % Balance masa de
Glucosa
dXdT= (P.u*(S/(P.ks+S)))*X; % Balance de masa de Celulas
dVdt= P.F; %Variacion volumen

%Sistema de ecuaciones:
dy(1)= S*dVdt+V*dSdt;
dy(2)= X*dVdt+V*dXdT;
dy(3)= dVdt;
end

%% Programa Principal Cultivo de Trichoderma
close all
clear all
clc
%% Parametros cineticos
P.u=0.091; %[1/h] velocidad crecimiento maxima
P.Y_xs=0.63; % [g/g] rendimiento
P.ks=4.64; %[g/L] constante saturacion
%% Condiciones Iniciales
SV0=404; % Masa Inicial de Glucosa [g]
XV0=300; % Masa Inicial de Celulas [g]
V0=41.5; %Volumen Inicial Reactor [L]
tspan= [0 30];
CI=[SV0 XV0 V0]; % vector de condiciones iniciales

[t, y] = ode45(@ (t,y) odefedbatch(t,y,P), tspan, CI);

```

```

%% Grafico de masa de celulas y glucosa, y volumen
hold on
a=y(:,1)./1000; %Masa de glucosa [kg]
b=y(:,2)./1000; %Masa de trichoderma [kg]
c=y(:,3); %Volumen

ax1=subplot(2,1,1);
ax2=subplot(2,1,2);

plot(ax1,t,a,t,b)
title(ax1,'Cultivo Trichoderma reesei RUTC30','FontSize',16)
ylabel(ax1,'\bf Masa [kg]','FontSize',14)
xlabel(ax1,'\bf Tiempo [h]','FontSize',14)
%ylim(ax1,[0 1000])
legend(ax1,'Glucosa','Trichoderma')
grid(ax1,'on')

plot(ax2,t,c)
title(ax2,'Cultivo Trichoderma reesei RUTC30','FontSize',16)
xlabel(ax2,'\bf Tiempo [h]','FontSize',14)
ylabel(ax2,'\bf volumen [L]','FontSize',14)
legend(ax2,'Volumen')
grid(ax2,'on')

```