



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

**EVALUACIÓN TÉCNICA-ECONÓMICA DE LA PRODUCCIÓN DE UN
BIOFERTILIZANTE BACTERIANO**

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

CONSTANZA PAZ LIZAMA SÁNCHEZ

PROFESORA GUÍA:
IRENE MARTÍNEZ BASTERRECHEA

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
MARÍA ELENA LIENQUEO CONTRERAS
MARÍA ISABEL GUERRA HEVIA
MARÍA FERNANDA FLORES ECHEVERRÍA

SANTIAGO DE CHILE
2021

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR AL
TÍTULO DE INGENIERA CIVIL QUÍMICA E
INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA
POR: **CONSTANZA PAZ LIZAMA SÁNCHEZ**
FECHA: 2021
PROF. GUÍA: IRENE MARTÍNEZ

EVALUACIÓN TÉCNICA-ECONÓMICA DE LA PRODUCCIÓN DE UN BIOFERTILIZANTE BACTERIANO

En la agricultura, el abuso de la fertilización química ha ocasionado importantes repercusiones ambientales, lo que ha impulsado el mercado nacional y mundial de insumos agrícolas de origen biológico. Es por esto que el presente trabajo tiene como objetivo general, estudiar la pre factibilidad técnico-económica de instalar una línea de proceso para la producción de un biofertilizante basado en microorganismos, para su uso en la industria agrícola nacional.

A partir del estudio del mercado nacional, se constata que no existe claridad en cuanto al número de empresas y productos comercializados. A pesar de esto, se evidencia un gran volumen de importaciones de bioinsumos, 5 veces mayor que las exportaciones, lo que indica que la demanda nacional no está siendo cubierta localmente. Con el fin de generar un producto diferenciador para la industria chilena, se decide producir bacterias del género *Azotobacter* y *Azospirillum*, capaces de fijar nitrógeno y promover el crecimiento vegetal. Se considera una cobertura del 35 % de los suelos certificados orgánicos proyectados al 2025, más un 10 % de suelos no certificados, lo que se traduce en una producción anual de 48,2 [kg] de biomasa.

El proceso de producción seleccionado consta de tres etapas principales: (1) Propagación del microorganismo, realizada en cultivos *batch* en matraces y reactores de tanque agitado; (2) Producción, que corresponde a una fermentación llevada a cabo en un reactor *fed-batch*; (3) Formulación, que incluye la concentración y liofilización del producto, etapa donde se conserva una viabilidad del 80 %.

La implementación de este proyecto, en un escenario pesimista, considera una inversión inicial para la adquisición de bienes, equipos e instalaciones de 1,8 millones de dólares. Los costos de operación se estiman en 334 mil dólares anuales, mientras que los ingresos, considerando un precio de venta del producto al usuario de 50 [USD/ha], alcanzan los 14,4 millones de dólares. A partir del análisis económico, considerando un horizonte de evaluación de 10 años, se establece que el proyecto es altamente rentable.

El nivel de rentabilidad alcanzado (TIR mayor a 100 %) es puesto en duda, por lo que se realiza un análisis de sensibilidad para la viabilidad celular y en consecuencia, el número de hectáreas a cubrir. Considerando una viabilidad 8 veces menor a la supuesta, se determinan indicadores realistas y que denotan que el proyecto continua siendo rentable, con un VAN de más de 4 millones de dólares y una TIR de 46 %. Esto indica que es necesario investigar a cabalidad la viabilidad alcanzada, para tener resultados de rentabilidad realistas.

*A mi Meme y a mis tatas: Tomás y Orlando
que siempre anhelaron acompañarme presencialmente en esta etapa.*

Agradecimientos

Estando la borde de culminar esta etapa formativa, revivo y analizo un millar de acontecimientos que marcaron mi experiencia universitaria. Puedo visualizar el camino recorrido, mis huellas... algunas firmes, definidas y otras a la mitad, borrosas e irregulares. Veo la ruta, a veces recta y en ocasiones con oscilaciones y recovecos que parecían modificar drásticamente el rumbo de mis pasos. Pero por sobre todo, veo otras huellas que acompañan a las mías, con una distancia suficiente para permitirme marcar mi propio camino de manera autónoma, pero a la vez cercanas, para retenerme en esos momentos en que, como una pérdida de equilibrio, los pasos tambaleaban y la ruta se volvía difusa.

Esas huellas tras de mi son las de mi familia, mis padres y mi hermana, a quienes agradezco profunda y sinceramente por permitirme forjar mi propio camino y dejar mis propias huellas. Por apoyarme en cada curva, en cada cambio de dirección, pero especialmente por confiar en mi sentido de orientación. Agradezco sinceramente a mis viejitos por haber destinado parte de su vejez a trabajar, para resguardar cada uno de mis pasos.

En los senderos más empinados y con más irregularidades, recuerdo claramente haber tenido a mi lado a compañeros de ruta. Muchas veces nuestras huellas fueron desordenadas, a destiempo, y otras perfectamente alineadas. A veces eran vestigios de tardes de estudios, otras veces eran tambaleantes, rastros de fiestas y conversaciones eternas. Gracias a mis amigas y amigos, por hacer este último tramo más alegre, llevadero y valioso.

Finalmente agradezco a mi comisión, llena de mujeres poderosas que se han ganado mi admiración. A mi profesora guía Irene Martínez, por ayudarme y orientarme en la elaboración de este trabajo, siempre con sabiduría y buena disposición. A las profesoras María Elena Lienqueo y María Isabel Guerra, por brindarme un apoyo incondicional y orientación no sólo en la elaboración de este documento, si no también en mis proyectos personales, paralelos a esto. A M. Fernanda Flores, por su amabilidad y disposición al invitarme a conocer su lugar de trabajo, compartirme datos y material que aportara a mi trabajo.

Tabla de Contenido

1. Introducción	1
1.1. Contexto	1
1.2. Motivación	2
2. Objetivos	3
3. Marco teórico	4
3.1. Caracterización de biofertilizantes	4
3.2. Microorganismos utilizados como biofertilizantes	5
3.3. Proceso de producción	7
3.3.1. Pretratamiento y propagación	8
3.3.2. Producción	8
3.3.3. Formulación del producto final	9
4. Estudio de mercado	11
4.1. Mercado de bioinoculantes	12
4.2. Mercado de bioinoculantes en Chile	12
4.2.1. Oferta nacional	12
4.2.2. Importaciones	15
5. Selección de bacterias	19
5.1. Características de las bacterias seleccionadas	20
5.2. Co-inoculación	21
5.3. Experiencia en Chile	21
6. Capacidad de la línea de proceso	22
7. Selección del proceso de producción	25
7.1. Medio de cultivo	25
7.1.1. Fuente de Carbono	25
7.1.2. Fuente de Nitrógeno	27
7.1.3. Fuente de Fósforo y Azufre	27
7.1.4. Micronutrientes y vitaminas	27
7.1.5. Factores fisicoquímicos	27
7.1.6. Selección del medio de cultivo	28
7.2. Fermentación	30

7.3.	Concentración de la biomasa	30
7.4.	Formulación	31
8.	Balance de masa	32
8.1.	Etapas de fermentación	34
8.1.1.	Cultivo de <i>Azotobacter chroococcum</i>	34
8.1.2.	Cultivo de <i>Azospirillum lipoferum</i>	45
8.1.3.	Esterilización	46
8.2.	Etapas de concentración del cultivo celular	48
8.2.1.	Centrífuga tubular	48
8.3.	Etapas de Formulación	51
8.3.1.	Liofilizador	51
9.	Diseño y selección de equipos	53
9.1.	Equipos principales	53
9.1.1.	Fermentadores	53
9.1.2.	Centrífuga tubular	60
9.1.3.	Liofilizador	63
9.2.	Equipos adicionales	68
9.2.1.	Dosificadora y envasadora de polvos	68
9.2.2.	Autoclave	68
9.2.3.	Caldera	68
9.2.4.	Compresor	69
9.2.5.	Bombas	69
10.	Programación de operaciones	71
10.1.	Planificación y organización del proceso	71
11.	Evaluación económica	73
11.1.	Costos de inversión	73
11.1.1.	Costos directos	73
11.1.2.	Costos indirectos	75
11.1.3.	Costo total de inversión	76
11.2.	Costos de capital de trabajo	76
11.3.	Costos de operación	76
11.3.1.	Costos fijos	76
11.3.2.	Costos Variables	77
11.3.3.	Costos totales de operación	79
11.4.	Ingresos	80
11.5.	Flujo de caja	80
11.5.1.	Indicadores económicos	82
12.	Discusión y Conclusiones	84
12.1.	Discusión	84
12.2.	Conclusiones	86
12.3.	Recomendaciones	87

Bibliografía

87

Anexos

100

A.	Proyectos financiados por la Fundación para la Innovación Agraria (FIA) . . .	100
B.	Resumen balance de masa	106
C.	Tablas de vapor	109
D.	Calor a retirar del producto	110
E.	Diseño alternativo de liofilizador.	113
E.1.	Esquema del proceso	113
E.2.	Datos	113
E.3.	Justificación de elección de parámetros	113
E.3.1.	Diseño de la cámara de liofilización	114
E.3.1.1.	Tamaño de la cámara de vacío	114
E.3.1.2.	Forma y espesor de las tapas del liofilizador	117
E.3.1.3.	Espesor de la lámina al interior de la cámara de vacío . . .	119
E.3.1.4.	Espesor de las bandejas	120
E.3.2.	Selección de la bomba de vacío	121
E.4.	Cálculo Sistema de Refrigeración	125
E.5.	Cálculo Sistema de Calefacción	129
F.	Evaluación económica	130

Índice de Tablas

4.1.	Inoculantes formulados a partir de microorganismos benéficos en Chile.	13
4.2.	Resumen de patentes chilenas de bioinoculantes.	14
7.1.	Fuentes de carbono utilizadas por diferentes especies del género <i>Azospirillum</i> . .	26
7.2.	Fuentes de carbono utilizadas por diferentes especies de <i>Azotobacter</i>	26
7.3.	Composición medio utilizado para el crecimiento de <i>Azotobacter chroococcum</i> [101].	29
7.4.	Composición medio utilizado para el crecimiento de <i>Azospirillum lipoferum</i> [98].	29
8.1.	Datos utilizados para el balance de masa en el Matraz.	35
8.2.	Descripción y volúmenes al inicio y término de la operación en el matraz. . . .	35
8.3.	Composición másica y caracterización al inicio y término de la operación. . . .	38
8.4.	Concentración final en reactor de 3 litros.	38
8.5.	Descripción y volúmenes al inicio y término de la operación en el reactor de 3 [L].	39
8.6.	Composición másica y caracterización al inicio y término de la operación en el reactor de 3 litros.	39
8.7.	Concentración final en reactor de 30 litros.	40
8.8.	Descripción de entradas al inicio de la operación <i>batch</i> en el reactor de 30 litros.	40
8.9.	Composición másica y caracterización al inicio y término de la operación <i>batch</i> en el reactor de 30 litros.	41
8.10.	Datos utilizados para el balance de masa en operación <i>fed-batch</i> en el reactor de 30 litros.	41
8.11.	Composición y caracterización de las corrientes al inicio y término de la operación <i>fed-batch</i> en el reactor de 30 litros.	44
8.12.	Parámetros cinéticos de <i>Azospirillum lipoferum</i>	45
8.13.	Concentraciones finales alcanzadas en las etapas de fermentación por <i>Azospirillum lipoferum</i>	45
8.14.	Composición y caracterización de las corrientes al inicio y término de cada una de las fermentaciones de <i>Azospirillum lipoferum</i>	46
8.15.	Características del vapor de caldera.	46
8.16.	Características de fluidos a calentar.	47
8.17.	Cantidades de vapor requeridas para la esterilización.	47
8.18.	Datos utilizados para el balance de masa de la centrífuga	48
8.19.	Descripción de entradas y salidas de la centrífuga tubular.	49
8.20.	Composición y caracterización de las corrientes de la operación de la centrífuga tubular para <i>Azotobacter chroococcum</i>	50

8.21.	Composición y caracterización de las corrientes de la centrífuga tubular para <i>Azospirillum lipoferum</i>	50
8.22.	Datos utilizados para el balance en la etapa de liofilización.	51
8.23.	Descripción de corrientes en la operación del liofilizador.	51
8.24.	Composición de las corrientes del liofilizador.	52
9.1.	Parámetros de diseño para los fermentadores.	53
9.2.	Tiempos de fermentación <i>batch</i> en reactores de 3 y 30 litros.	54
9.3.	Tiempo total de fermentación en reactores de 3 y 30 litros.	55
9.4.	Dimensiones principales de fermentadores.	56
9.5.	Potencia de agitación requerida por los fermentadores.	57
9.6.	Demanda de oxígeno de los microorganismos.	58
9.7.	Datos biorreactores cotizados.	59
9.8.	Datos software requerido.	59
9.9.	Datos a utilizar para el dimensionamiento de la centrífuga.	60
9.10.	Datos centrífuga tubular modelo Gq105 cotizada.	62
9.11.	Parámetros de diseño para el liofilizador.	63
9.12.	Parámetros para el diseño de la cámara de vacío.	65
9.13.	Datos liofilizador modelo LABC700401030 cotizado.	65
9.14.	Especificaciones bombas de vacío.	67
9.15.	Especificaciones del autoclave seleccionado.	68
9.16.	Especificaciones del autoclave seleccionado.	68
9.17.	Especificaciones de la caldera seleccionada.	68
9.18.	Requerimientos de aire comprimido.	69
9.19.	Especificaciones del compresor seleccionado.	69
9.20.	Etapas que requieren de bombeo.	69
9.21.	Especificaciones bombas peristálticas para flujo exponencial.	70
9.22.	Especificaciones de bomba para alimentación de centrífuga.	70
11.1.	Costos de equipos.	74
11.2.	Porcentajes para estimación de costos directos.	74
11.3.	Valor asociado a los costos directos adicionales.	75
11.4.	Costos totales directos.	75
11.5.	Costos totales indirectos.	75
11.6.	Resumen costos de inversión.	76
11.7.	Costo anual de mano de obra.	77
11.8.	Costos fijos de producción.	77
11.9.	Costo de materias primas.	78
11.10.	Costo asociado a suministros básicos.	78
11.11.	Costos adicionales de producción variable.	79
11.12.	Costos variables de producción.	79
11.13.	Resumen costos de operación.	79
11.14.	Ingresos por venta.	80
11.15.	Flujo de caja del proyecto.	81
11.16.	Flujo de caja del proyecto, considerando pérdida de viabilidad.	83
A.1.	Proyectos ligados a biofertilizantes, financiados por la FIA.	100
B.1.	Operación en matraz - cultivo de <i>Azotobacter chroococcum</i>	106

B.2.	Operación en matraz - cultivo de <i>Azospirillum lipoferum</i>	106
B.3.	Reactor de 3 litros - cultivo de <i>Azotobacter chroococcum</i>	106
B.4.	Reactor de 3 litros - cultivo de <i>Azospirillum lipoferum</i>	107
B.5.	Operación <i>batch</i> en Reactor 30L - <i>Azotobacter chroococcum</i>	107
B.6.	Operación <i>fed-batch</i> Reactor 30L - <i>Azotobacter chroococcum</i>	107
B.7.	Operación <i>batch</i> en Reactor 30L - <i>Azospirillum lipoferum</i>	108
B.8.	Operación <i>fed-batch</i> Reactor 30L - <i>Azospirillum lipoferum</i>	108
C.1.	Presión de vapor del hielo [148].	109
D.2.	Capacidades caloríficas atómicas [135].	110
E.3.	Parámetros de diseño para el liofilizador.	113
E.4.	Parámetros para determinar el tamaño de la cámara.	115
E.5.	Cálculos asociados al espesor de las tapas y de la cámara.	120
E.6.	Especificaciones bombas de vacío. Proveedor: Cole Parmer, Empresa distribuidora de instrumentación industrial y científica.	122
F.1.	Descripción de categoría “otro”, en costos de equipos.	130
F.2.	Consumo de agua en el proceso.	130
F.3.	Consumo energético de equipos.	131
F.4.	Consumo energético de la caldera por lote.	131
F.5.	Consumo energético por lote para el compresor.	131
F.6.	Detalle de depreciación de activos.	132

Índice de Ilustraciones

3.1.	Etapas principales para la producción de un biofertilizante. Elaboración propia.	7
4.1.	Importaciones de productos incluidos en el código arancelario 31010000. Elaboración propia a partir de los datos proporcionado por el registro nacional de aduanas.	16
4.2.	Importación de bioinsumos según su nombre de entrada a Chile. Elaboración propia a partir de la información recopilada y publicada en Redagrícola [9]. . .	17
4.3.	Nombre comercial de bioinsumos presentes en Chile. Elaboración propia a partir de la información recopilada y publicada en Redagrícola [9].	17
4.4.	Países de origen de las mayores importaciones de bioproductos a Chile. Elaboración propia a partir de la información recopilada y publicada en Redagrícola [9].	18
6.1.	Evolución de la superficie orgánica. Elaboración propia a partir de datos publicados por el SAG.	23
6.2.	Evolución de la superficie orgánica proyectada a 2025.	23
7.1.	Centrífuga sedimentadora de tipo tubular [116].	31
8.1.	Diagrama del proceso productivo. Los Flujos F hacen alusión a <i>Azotobacter chroococcum</i> , mientras que los flujos F' a <i>Azospirillum lipoferum</i> . La descripción de cada corriente se incluye en detalle en las secciones 8.1 a la 8.3.	33
8.2.	Diagrama de las etapas de fermentación	34
8.3.	Diagrama del cultivo en matraz.	35
8.4.	Diagrama del cultivo en el reactor de 3 litros.	38
8.5.	Diagrama reactor de 30 litros. F5 corresponde al ingreso de medio de cultivo para la operación <i>batch</i> , y F6 es el flujo de fuente de carbono adicionado durante la operación <i>fed-batch</i>	40
8.6.	Variación del flujo de alimentación de sustrato en el tiempo.	44
8.7.	Diagrama de la etapa de centrifugado.	48
8.8.	Diagrama etapa de liofilización.	51
9.1.	Nomenclatura para dimensiones del fermentador.	55
9.2.	Correlación entre el número de Reynolds y de Potencia para (1) Turbina Rushton, (2) Canaleta y (3) Hélice marina [127].	57
9.3.	Notación de radios en una centrifuga tubular.	62
10.1.	Diagrama con distribución temporal de actividades asociadas a la producción.	72
E.1.	Diagrama liofilizador.	113
E.2.	Determinación de ancho de placas intercambiadoras de calor.	116
E.3.	Representación de la profundidad de la cámara, h [137].	118

E.4.	Diagrama de un recipiente cilíndrico [138].	119
E.5.	Cálculo espesor de las tapas. Valores del factor B que se emplean en las fórmulas para recipientes sujetos a presión externa.	123
E.6.	Cálculo espesor de lámina. Valores del factor B que se emplean en las fórmulas para recipientes sujetos a presión externa.	124

Capítulo 1

Introducción

1.1. Contexto

La agricultura es el producto de un conjunto de actividades y conocimientos desarrollados por el hombre, destinados a cultivar la tierra, y cuya finalidad es obtener productos vegetales (como verduras, frutos, granos y pastos) para la alimentación del ser humano y del ganado, además de proveer un ingreso satisfactorio para el agricultor [1].

En la agricultura moderna, la irrigación, el drenaje, la conservación y la sanidad son fundamentales para una agricultura exitosa. Además, se destaca por la continua búsqueda de mejoras en el rendimiento y la productividad de los cultivos, con el fin de responder a las necesidades del mercado. Para esto, se ha profundizado en técnicas ligadas a la aplicación de fertilizantes, insecticidas y fungicidas, además de la reparación de suelos, entre otros.

Los fertilizantes, incluidos los de origen mineral, sintético y orgánico, son insumos importantes y muy utilizados en la agricultura, pues aumentan considerablemente la nutrición disponible para los cultivos, lo que repercute en que su rendimiento se duplique o triplique inclusive [1]. Es por esto, que su aplicación se ha vuelto imprescindible para conseguir la producción de alimentos en la cantidad y calidad que la población mundial demanda y continuará demandando en el futuro, contribuyendo de este modo, a la seguridad alimentaria global [2].

Sin embargo, el abuso del uso de fertilizantes químicos trae consigo repercusiones ambientales, pues su fácil lixiviación favorece la contaminación de cuerpos acuáticos [3], ocasionando eutrofización de las aguas, el crecimiento excesivo de algas y la acidificación del suelo [4]. Además, el exceso de nutrientes también puede ser liberado desde el suelo a la atmósfera a través de la volatilización de amoníaco o como emisiones de gases de efecto invernadero de óxido nitroso [5], donde se establece, que la producción de fertilizantes, sumados a la industria ganadera, posicionan a la agricultura como responsable de un séptimo de las emisiones totales de gases de efecto invernadero en el mundo [6].

Estos impactos tienen cada vez mayor relevancia a nivel mundial, lo que ha llevado a la sociedad a buscar alternativas de producción más cuidadosas desde el punto de vista ambiental, encontrándose alternativas sustentables y ecológicas como lo es la agricultura orgánica, que presenta un desarrollo creciente, tanto en el ámbito nacional como mundial [7]. Esta agricultura busca eliminar el uso de insumos de origen químico que generen un daño al medio ambiente o que afecten la salud humana, por lo que se basa en la realización de prácticas silvoagropecuarias que no mermen la producción de los cultivos y que a su vez, restablezcan los equilibrios naturales [7].

1.2. Motivación

Los sistemas convencionales de producción agrícola basados en la adición de químicos, han creado fuentes de contaminación que, directa o indirectamente, pueden contribuir a la degradación del suelo, del medio ambiente y la destrucción de recursos naturales [7]. Es por esto que surge la necesidad de buscar insumos agrícolas amigables con el medio ambiente y compatibles con el ecosistema en general, pero que mantengan un nivel de eficiencia y efectividad. Como solución a esto, se propone el uso de insumos biológicos a base de microorganismos benéficos, que desde el punto de vista de una agricultura sostenible, el empleo de productos elaborados a partir de microorganismos con potencial biofertilizante, bioestimulante o biocontrolador, podría ser fundamental para limitar el uso de abonos químicos [8].

El mercado mundial de bioinsumos está en aumento, con tasas de crecimiento mayores a un 15% anual (bioestimulantes) y ventas anuales proyectadas para el 2020 cercanas a los USD 1.8 billones (biofertilizantes). Chile tiene una gran oportunidad, pues posee una buena base científica y una fuerza productiva y de mercado que puede favorecer el desarrollo de la industria de los bioproductos a nivel nacional [9].

El problema a resolver es que en Chile, si bien existe investigación sobre biofertilizantes, esta no se ha traducido en una actividad productiva importante, existiendo una tasa muy baja de producción nacional de estos bioinsumos a base de microorganismos. Acorde a lo señalado por expertos, esto se debe principalmente a la falta de normativa, capacidad técnica y financiamiento, lo que se traduce en que la demanda nacional sea suplida básicamente por importaciones [10]. Ante esto surge la relevancia de estudiar la factibilidad de producir biofertilizantes a nivel nacional, con el fin de suplir en parte, la demanda por estos bioinsumos.

Capítulo 2

Objetivos

Considerando los antecedentes mencionados anteriormente es que se estudiará la pre factibilidad técnico-económica de instalar una línea de proceso para la producción de microorganismos para su uso como biofertilizante en la industria agrícola nacional. Para esto se proponen los siguientes objetivos específicos:

- Seleccionar microorganismos para su uso como biofertilizante.
- Seleccionar el proceso requerido para su producción.
- Obtener el balance de masa del proceso.
- Dimensionar los equipos de la línea de producción y estimar requerimientos energéticos.
- Realizar una evaluación económica de la línea de proceso.

Capítulo 3

Marco teórico

3.1. Caracterización de biofertilizantes

Los insumos biológicos de uso agropecuario se pueden dividir en diferentes categorías, entre las cuales destacan biofertilizantes, bioestimulantes y biocontroladores.

Los biofertilizantes son insumos formulados con uno o varios microorganismos, los cuales, de una forma u otra, proveen o mejoran la disponibilidad de nutrientes cuando se aplican a los cultivos [11]. Como bioestimulante se entiende a microorganismos productores de sustancias o metabolitos como vitaminas o fitohormonas que estimulen el crecimiento de la planta [11] y, finalmente, los biocontroladores controlan las poblaciones de otros organismos no deseados como insectos, ácaros, etc [12].

El término “biofertilizante” a menudo es utilizado erróneamente como sinónimo de una amplia gama de productos como abonos vegetales o animales, o fertilizantes químicos con suplementos orgánicos [13]. Una definición para “biofertilizante” que ha sido ampliamente utilizada corresponde a: “sustancia que contiene microorganismos vivos que, cuando se aplica a las semillas, las superficies de las plantas o el suelo, coloniza la rizósfera o la planta y promueve el crecimiento, al aumentar el suministro o la disponibilidad de nutrientes primarios para la planta huésped” [14]. Como dentro de esta definición se interpreta como consecuencia del uso de biofertilizantes, la promoción del crecimiento en plantas, es decir bioestimulación, existe confusión en la literatura respecto a los aspectos que diferencian a estos dos bioinsumos, por lo que generalmente son englobados bajo el nombre de bioinoculantes.

Teniendo en consideración la definición anterior, los microorganismos que se utilizan como bioinoculantes se caracterizan por ser eficientes fijadores de nitrógeno atmosférico, solubilizadores de fósforo, potenciadores de diversos nutrientes o promotores del crecimiento y desarrollo de plantas. Estos microorganismos son aplicados en el suelo, follaje o directamente en la semilla, de manera independiente o en conjunto con otros fertilizantes, con el fin de aumentar su concentración, acelerando los procesos microbianos y, en consecuencia, incrementando la cantidad de nutrientes que pueden ser asimilados por las plantas, impactando en el desarrollo y rendimiento de los cultivos [15].

3.2. Microorganismos utilizados como biofertilizantes

Actualmente, existe una gran variedad de biofertilizantes con diversas funciones, donde lo más difundidos se componen principalmente de hongos micorrícicos y bacterias [16] [17]. A continuación, se presentan los diferentes tipos de biofertilizantes y algunos de los principales microorganismos utilizados para la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfato, la estimulación del crecimiento y por último, la asociación de micorrizas [18] [19].

Fijación de nitrógeno

El nitrógeno es uno de los nutrientes más vitales para el crecimiento y la productividad de las plantas. A pesar de que el 78 % del aire presente en la atmósfera corresponde a nitrógeno molecular (N_2), esta es una forma no asimilable, es decir, no está disponible para su uso por las plantas. Para utilizar el nitrógeno atmosférico, este debe convertirse a amonio o nitratos, que las plantas pueden asimilar fácilmente. Este proceso es llevado a cabo por algunos microorganismos mediante el proceso de fijación biológica de nitrógeno (FBN) [20], destacando los miembros de *Rhizobium spp.*, asociados a plantas leguminosas [21], además de *Azospirillum spp.*, *Azotobacter spp.*, entre otros [22]. Para realizar esto, utilizan un complejo enzimático conocido como nitrogenasas [23] [24], cuyo mecanismo permite a estas bacterias suplir entre un 25 % y 50 % los requerimientos de nitrógeno en los cultivos tradicionales [25], y entre el 80 % y 100 % para el caso de leguminosas [15] [26].

Solubilización de fosfato

Al igual que el nitrógeno, el fósforo es fundamental para el desarrollo de cultivos. A pesar de la presencia de fósforo en cantidades considerables en el suelo, la mayor parte de este se encuentra como fósforo inorgánico, insoluble para las plantas. Entre los microorganismos que poseen la capacidad de solubilizar el fósforo inorgánico, destacan las cepas de *Pseudomonas spp.*, *Bacillus spp.*, *Rhizobium spp.*, *Achromobacter spp.*, *Agrobacterium spp.*, *Acetobacter spp.*, entre otras [22]. Estos microorganismos, a través de la acción de sus enzimas fosfatasas, pueden aportar a las plantas entre el 30 % y el 60 % de su necesidades de este nutriente [27] [28].

Estimulación del crecimiento

Los microorganismos que cumplen un rol bioestimulante al sintetizar fitohormonas, aminoácidos, péptidos y vitaminas, juegan un papel crucial en el crecimiento y desarrollo de las plantas [29], estimulando la germinación de semillas y tubérculos, aumentando la tasa de desarrollo de xilemas y raíces, controlando los procesos de crecimiento vegetativo, entre otros [30] [31]. Dentro de los microorganismos que destacan por su carácter estimulante, se encuentran bacterias como *Rhizobium spp.*, *Azotobacter spp.*, *Azospirillum spp.*, *Pseudomonas spp.*, entre otras [32].

Asociación de micorrizas

Por último, otros de los microorganismos que han sido vastamente estudiados son las micorrizas, las cuales corresponden a una asociación simbiótica entre las raíces de una planta huésped y un hongo. Tanto los hongos como la planta huésped comparten una relación mutua en la que la planta proporciona carbohidratos a los hongos, y los hongos proporcionan agua y micronutrientes a la planta huésped, resultando una asociación simbiótica beneficiosa para ambos [33]. La simbiosis micorrícica juega un papel importante en la promoción del crecimiento de las plantas y en la biorremediación del suelo [34], lo que es avalado por estudios que han demostrado que los suelos contaminados con metales pesados como As, Cu, Cd, Pb y Zn pueden remediarse a través de las micorrizas [35]. Adicionalmente, existe evidencia de que las micorrizas pueden aumentar el rendimiento de cultivos hasta en un 40 % [36] [37], donde las más estudiadas corresponden a *Glomus spp.*, *Scutelospora spp.*, *Acaulospora spp.* y *Gigaspora spp.* [38].

3.3. Proceso de producción

Para lograr el uso extensivo de biofertilizantes, los microorganismos deben ser susceptibles a una multiplicación masiva y económicamente rentable con el fin de garantizar la disponibilidad a gran escala. Además, los biofertilizantes deben tener estabilidad a largo plazo y una eficacia constante en condiciones ambientales [39], donde la eficiencia de la aplicación de estos productos en la agricultura dependerá de su diseño y desempeño [40].

En general, las operaciones que comprenden los bioprocesos a escala comercial se han dividido en operaciones previas a la etapa de fermentación (“*upstream*”) y en operaciones posteriores (“*downstream*”). Dentro de las primeras se considera la preparación del medio, la esterilización y la definición del funcionamiento del fermentador, y en las segundas, se incluyen todas aquellas operaciones que permiten la recuperación y purificación del producto proveniente del fermentador para su posterior formulación, las cuales pueden representar hasta 60 % del costo total de producción [41] [42].

Teniendo esto en consideración, el proceso de producción de biofertilizantes se basa principalmente en tres etapas, las cuales se presentan a continuación en la Figura 3.1.

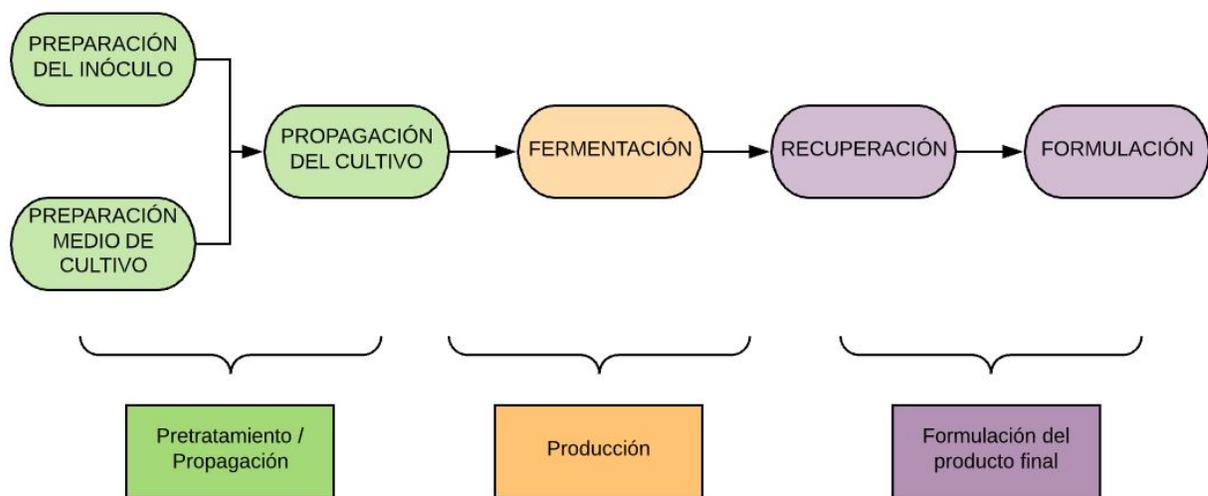


Figura 3.1: Etapas principales para la producción de un biofertilizante. Elaboración propia.

3.3.1. Pretratamiento y propagación

El proceso requiere preparar y propagar el inóculo antes de realizar la fermentación, para esto es necesario determinar el medio de cultivo y las condiciones de producción aptas para el crecimiento de él o los microorganismos seleccionados.

Medio de cultivo y factores fisicoquímicos

El medio de cultivo debe incluir fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo, azufre, magnesio, potasio, micronutrientes y vitaminas. Adicionalmente, es importante considerar factores fisicoquímicos como lo son el pH, la temperatura y la aireación.

La elección de un medio de cultivo y de los factores fisicoquímicos se debe basar en aquellos que presenten una mejor tasa de crecimiento de los microorganismos, con el fin de asegurar una alta concentración de biomasa, pero teniendo presente los costos asociados a los componentes del medio y a la mantención de los parámetros.

Preparación del inóculo

Debido a que el proceso consta básicamente en la fermentación y posterior formulación del biofertilizante, es necesario poseer un banco de células con el fin de disponer de microorganismos cada vez que se inicie la línea de producción. Para su elaboración, se deben sembrar las especies seleccionadas en un medio de cultivo acorde para su crecimiento e incubación. Estos cultivos puros y de reciente crecimiento son considerados como pre-inóculos, que posteriormente inocularán el fermentador.

3.3.2. Producción

La etapa de fermentación es la fase en la que los microorganismos se producen masivamente, es decir, tiene como objetivo aumentar la biomasa inicial. Las fermentaciones pueden ser realizadas en tres modos de operación: *batch*, *fed-batch* o continua, acorde a las condiciones de crecimiento del microorganismo y las características de volumen y concentración que se deseen alcanzar.

Cultivo *batch*

Una fermentación *batch* o discontinua puede ser considerada como un “sistema cerrado”. Al inicio de la operación se añade el medio de cultivo esterilizado y el inóculo, permitiendo que se lleve a cabo la incubación en las condiciones óptimas de crecimiento de los microorganismos. A lo largo de toda la fermentación no se adiciona ni sustrato ni células, sino únicamente oxígeno (en forma de aire), agentes antiespumantes y ácidos o bases para controlar el pH.

La composición del medio de cultivo, la concentración de la biomasa y la concentración de metabolitos cambia generalmente como resultado del metabolismo de las células, observándose las cuatro fases típicas de crecimiento: fase de latencia, fase logarítmica, fase estacionaria y fase de muerte [43].

Cultivo *fed-batch*

En un proceso de fermentación *fed-batch* o semi-continuo, el medio de cultivo es alimentado constantemente a medida que progresa la fermentación, lo que trae consigo una variación del volumen del caldo de cultivo dentro del fermentador [43].

En el diseño de plantas de fermentación *batch* o *fed-batch*, se enfrenta el problema de descifrar la combinación adecuada del número y tamaño de los fermentadores a usar, para lograr el esquema de producción deseado [44] [45] [46].

Cultivo continuo

En la fermentación continua se establece un “sistema abierto”, donde el medio de cultivo estéril se añade continuamente al fermentador y una cantidad equivalente que incluye medio de cultivo utilizado y microorganismos, es retirada simultáneamente del sistema. Este tipo de fermentación suele ser más productiva que el cultivo *batch*, y es utilizada cuando se requiere un producto de calidad constante. Como desventaja presenta un incompleto aprovechamiento de sustratos, y un mayor riesgo de contaminación y mutaciones debido a los prolongados tiempos de residencia de los microorganismos en el cultivo [47].

Una vez incrementado el número de microorganismos, estos deben ser procesados aguas abajo para su recuperación y purificación. Durante este procesamiento, es importante que el rendimiento sea alto, pues es la base de la formulación y dará lugar al biofertilizante final.

3.3.3. Formulación del producto final

La formulación de un biofertilizante es un proceso de varios pasos que da como resultado cepas de microorganismos contenidos en un soporte particular [48]. Un biofertilizante correctamente formulado permite un fácil manejo, almacenamiento a largo plazo y puede radicar en su eficacia [49]. Una formulación puede diferir según el uso del biofertilizante, el tipo de suelo, el tipo de planta, la naturaleza de la aplicación, la disponibilidad de recursos, etc. Por lo tanto, la comprensión de la formulación es necesaria, ya que afecta la cantidad y el rendimiento de los biofertilizantes producidos.

Dado que el suelo natural proporciona un ambiente hostil a las células inoculantes [50], se han probado una serie de formulaciones, las cuales se dividen principalmente en cinco categorías básicas:

1. Suelos

En esta categoría se incluye: turba, carbón, arcillas y suelos inorgánicos. Este tipo de formulación es adecuada para una amplia gama de microorganismos, además es posible ajustar el contenido de humedad para optimizar el crecimiento y sobrevivencia de las células durante el almacenamiento y la inoculación. Sin embargo, existe gran variabilidad en la composición y calidad dependiendo del origen del suelo utilizado [51].

2. Materiales inertes

Entre estos se encuentran: vermiculita, perlita, geles de poliacrilamida y perlas de alginato. Este tipo de soporte permite un fácil almacenamiento y manipulación y es altamente eficiente en condiciones de estrés ambiental. A pesar de esto, el producto es voluminoso, incrementando los costos de transporte y almacenamiento [51].

3. Cultivos microbianos liofilizados

Estas preparaciones pueden incorporarse posteriormente en un soporte sólido o pueden usarse como tales. Permite lograr altos índices de supervivencia y un almacenamiento por largos períodos a temperatura ambiente. No obstante, durante el proceso es necesario agregar algún crioprotector, el cual es esencial para proteger la membrana celular y el citoplasma en contra de la deshidratación [52].

4. Formulación líquida

Corresponde al caldo de cultivo con o sin la adición de agentes estabilizantes. Este modo de aplicación es de bajo costo, de fácil uso por el agricultor y compatible con las prácticas agrícolas. No obstante, es un producto voluminoso, y en consecuencia de difícil transporte y exportación, incrementando los costos asociados a su manipulación y despacho. Además, se ha estudiado que muchos microorganismos pierden rápidamente viabilidad tanto en el formulado, como en el suelo, y son más susceptibles a la contaminación con otros microorganismos [51].

5. Células encapsuladas

En este tipo de formulación, los microorganismos son encapsulados en una gran variedad de polímeros. Como ventaja, este tipo de formulación es apta para todo tipo de células, otorgándoles protección mecánica y en consecuencia una mejor respuesta al estrés ambiental, caracterizándose además, por una liberación lenta y controlada de los microorganismos. Sin embargo, este mecanismo conlleva altos costos de producción y mano de obra especializada [51].

Capítulo 4

Estudio de mercado

En esta sección se revisa el estado de los productos basados en microorganismo benéficos para la agricultura chilena, considerando su participación en el mercado. A partir de esto, se determina la oportunidad de producción de un biofertilizante bacteriano, para posteriormente estimar la demanda potencial de este.

A modo de antecedente, es importante considerar que dentro de los microorganismos que tienen interacción con el suelo, existen aquellos que son benéficos, los cuales mejoran la disponibilidad de nutrientes, promueven el desarrollo y crecimiento de la planta, además de protegerla ante la acción de patógenos y otros microorganismos dañinos, que pueden inducir la aparición de enfermedades o plagas en la planta [53].

Dentro de los microorganismos benéficos se encuentran innumerables especies, cuyas interacciones con las plantas son sumamente variadas. Estos microorganismos se caracterizan por realizar funciones como: fijación de nitrógeno atmosférico, solubilización de fósforo insoluble, descomposición de residuos orgánicos, estimulación del crecimiento vegetativo, desintoxicación del suelo y control de patógenos o microorganismos dañinos. Todas estas funciones radican en una mejora de la calidad del suelo, conservación de los recursos naturales, incrementos en la producción y protección de los cultivos y, además, aportan a una agricultura más sostenible y con un menor impacto sobre el medio ambiente [53].

Como se mencionó en el Capítulo 3, para caracterizar a los microorganismos benéficos utilizados en la agricultura, es posible encontrar diversas clasificaciones en literatura, dependiendo de la función que ejerzan sobre los cultivos, destacando biofertilizantes, biocontroladores y bioestimulantes.

La clasificación mencionada anteriormente no es excluyente, pues existen microorganismos que pueden cumplir más de un rol, ya sea de manera directa o indirecta. Ejemplo de esto son aquellos microorganismos considerados como bioestimulantes, es decir, promotores del crecimiento de las plantas. Estos, generan un fortalecimiento de las plantas y, en consecuencia, las vuelven más resistentes contra el ataque de plagas y diferentes patógenos, actuando de manera indirecta como biocontroladores [54].

4.1. Mercado de bioinoculantes

A finales del siglo XIX se registró la primera patente para inocular plantas con bacterias del género *Rhizobium*. Luego, en los años 1930's y 1940's, la inoculación con bacterias rizosféricas asociativas con cepas de los géneros *Azotobacter* y *Bacillus* fue utilizada a gran escala en Rusia y Europa del Este [55] [56].

A pesar de que por casi 100 años se han producido comercialmente inoculantes a base de *Rhizobium spp.*, durante la década del 70, el estudio de los biofertilizantes avanzó rápidamente en países de Europa y Asia; sin embargo, el avance fue menor en países latinoamericanos [57].

Actualmente, existe una gran variedad de bioinoculantes con diversas funciones, donde lo más difundidos se componen principalmente de hongos micorrícicos y bacterias [16] [17]. A continuación se presenta una caracterización somera del mercado actual de bioinoculantes en Chile, considerando tanto la oferta nacional como internacional.

4.2. Mercado de bioinoculantes en Chile

Diversos estudios han revelado que además de que en Chile existe muy poca información sistematizada, no se conoce el número preciso de empresas existentes o el número de productos comercializados, su nivel de ventas o quiénes son sus usuarios. Esto hace que, en el ámbito legal, los bioinsumos tengan el mismo trato que productos de origen sintético, lo que aplica también para los bioinsumos importados, que suelen ingresar al país bajo los mismos registros que los productos químicos y muchas veces sin una identificación correcta [9]. A continuación, se analizan estos aspectos y se realiza una recopilación tanto de la oferta nacional de bioinoculantes como de sus importaciones.

4.2.1. Oferta nacional

A partir de la información presentada por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) respecto a los insumos visados para su uso en la agricultura orgánica nacional, se realiza una selección de los productos que son fabricados en el país, los cuales se presentan en la Tabla 4.1, donde se incluyen 10 empresas nacionales como productoras de bioinoculantes, ya sean biofertilizantes o bioestimulantes. Dentro de este grupo, la empresa Bio Insumos Nativa SpA. lidera la producción nacional con 10 insumos diferentes, basados principalmente en los microorganismos *Bacillus spp.* y *Trichoderma spp.* Como se mencionó anteriormente, especies del género *Bacillus* poseen más de una función, por lo que muchos de estos productos pueden ser comercializados también por su rol como biocontroladores.

Si se analizan los productos fabricados por las demás empresas nacionales, se evidencia que la mayoría basa su producción en estos mismos dos microorganismos (*Bacillus spp.* y *Trichoderma spp.*), por lo que la oferta nacional no es muy variada, exceptuando algunos productos formulados a partir de otros microorganismos como *Rhizobium spp.*, *Micorrizas*, *Pinicillium spp.*, entre otros. Es importante destacar que a pesar de que los microorganismos

mos activos son comunes en gran parte de los insumos nacionales visados, la composición y formulación de estos varía, otorgándoles características específicas a cada uno de ellos.

Tabla 4.1: Inoculantes formulados a partir de microorganismos benéficos en Chile.

Nombre comercial	Principio activo	Empresa
Centeon Max®	<i>Trichoderma virens, Bacillus subtilis</i>	Bio Insumos Nativa SpA
Coraza®	<i>Hypocrea spp, Bacillus spp, Bionectria spp</i>	
Nacillus Hort Pro	<i>Bacillus spp</i>	
Nacillus® 3.01		
Nacillus® PRO		
Hefesto-L®		
Mamull®	<i>Bionectria spp, Trichoderma spp, Hypocrea spp</i>	
Aegis®- P	<i>Trichoderma spp</i>	
Biomongen		
Puelche-VTO	<i>Trichoderma spp, Bacillus spp</i>	
BioLife Expert	<i>Metharizium spp, Lecanicillium spp, Beauveria spp</i>	
BioLife Foliar	<i>Bacillus subtilis, Trichoderma atroviride</i>	
BioLife Rhizo	<i>Bacillus spp, Trichoderma spp</i>	
BioLife Soil	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	
Rhizo Bacter	<i>Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus subtilis</i>	
BioLife Phos	<i>Penicillium spp, Benicillium spp, Bacillus spp</i>	
BioLife Psychro	<i>Bacillus subtilis, Trichoderma atroviride</i>	
Biopacific Seed	<i>Trichoderma spp, Bacillus spp</i>	Biopacific SpA
Biopacific Seed		
Baciflex		
Foliflex		
Bacinpost		
Tribac - Bio	Cepas de <i>Trichoderma spp</i> y cepas de <i>Bacillus spp</i>	AGRO Q - TRAL SpA
Tribac bacillus	<i>Bacillus subtilis, Bacillus licheniformis</i>	
CONSORCIO SL	Cepas de <i>Bacillus spp, Pseudomonas spp, Trichoderma spp</i>	
Aquam	<i>Bacillus spp</i>	
Rizofix-Gel	<i>Rhizobium spp</i>	Biogram
BioRoot	<i>Trichoderma spp, Bacillus spp, Pseudomonas spp, algas</i>	
Raizfort-M	Micorrizas arbusculares	IONA Chile
RV-2	Bacterias y actinomicetos	Sociedad Agrícola Terragénesis
Bio Bac Humic	<i>Bacillus spp</i>	Rymasa SpA
ASO71827	Bacterias rizosféricas PGPR	Agriservice SpA
Tri-Pantu	<i>Trichoderma spp</i>	Agrobiológicos Biotawen SpA

Fuente: Elaboración propia a partir de la información presentada por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), respecto a los insumos visados para su uso en la agricultura orgánica nacional, actualizada al 2020, y la información disponible en las páginas web de cada empresa y etiquetas de cada producto.

Adicionalmente, existen otras empresas que fabrican bioinsumos, sin embargo estos no necesariamente están visados para su uso en la agricultura orgánica nacional, no obstante, podrían estar aplicándose en suelos destinados a la agricultura tradicional. Dentro de estas empresas destaca Bayer, con su línea de biológicos, que incluye gran variedad de herbicidas, insecticidas y fungicidas [58]. Agroadvance con bioestimulantes y biofertilizantes basados en el alga marina *Durvillaea antarctica*, además productos formulados a partir de la bacteria *Agrobacterium radiobacter* o con cepas activas de *Trichoderma spp* [59]. Con menor participación se encuentran empresas como UPL, con bioproductos de origen biológico formulados a partir de aminoácidos, proteínas, factores de crecimiento, entre otros [60]; luego, empresas como Symborg, Anasac, Sumitomo y otras.

Al analizar el registro de patentes con país solicitante Chile, bajo la búsqueda de “biofertilizante” e “inoculante”, se registran cinco patentes (no se incluyen aquellas en estado “por resolver”), donde sólo una de estas está asociada a un empresa, mientras que las cuatro restantes son solicitadas por universidades (Luigi Ciampi es profesor de la Universidad Austral de Chile). El contenido de las patentes se basa principalmente en el estudio de la composición y el proceso de producción de biofertilizantes basados en microorganismos, donde sólo una de ellas hace alusión al proceso de formulación. El detalle de las patentes mencionadas se muestra a continuación en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2: Resumen de patentes chilenas de bioinoculantes.

N° Patente	Título	Solicitante	Rubro	Año de solicitud
54809	CEPA FUNGICA DE BJERKANDERA ADUSTA DENOMINADA BJAD1-FUB (RGM2142); COMPOSICION BIOFERTILIZANTE QUE LA COMPRENDE; METODO DE PRODUCCION; METODO PARA PELETIZAR SEMILLAS CON LA COMPOSICIÓN BIOFERTILIZANTE; Y USO PARA MEJORAR LA SOLUBILIZACION DEL FOSFORO EN EL SUELO.	Universidad Austral de Chile	Biofertilizante	2014
54809	CEPA FUNGICA DE BJERKANDERA ADUSTA DENOMINADA BJAD1-FUB, (RGM2142); COMPOSICION BIOFERTILIZANTE QUE LA COMPRENDE; METODO DE PRODUCCION; METODO PARA PELETIZAR SEMILLAS CON LA COMPOSICIÓN BIOFERTILIZANTE; Y USO PARA MEJORAR LA SOLUBILIZACION DEL FOSFORO EN EL SUELO.	Universidad Austral de Chile	Biofertilizante	2014
54342	BIOFERTILIZANTE Y SU PROCESO DE ELABORACIÓN.	Universidad de Concepción; Universidad de Talca	Biofertilizante	2013
51474	PROCEDIMIENTO PARA OBTENER FERTILIZANTE ORGÁNICO BIOESTIMULANTE Y/O BIOCONTROLADOR, QUE COMPRENDE CULTIVAR UN MICROORGANISMO EN UNA CÁPSULA DE CULTIVO CON UN SUSTRATO, PARA PRODUCIR PROPÁGULOS EN FORMA DE POLVO MOJABLE Y MEZCLAR CON FERTILIZANTES ORGANICOS.	Biopacific SpA	Bioestimulante Biocontrolador	2010
44776	FORMULACION CAPSULAR GRANULADA, QUE COMPRENDE MICROORGANISMOS, TIERRA DE DIATOMEAS, OSMOPROTECTANTE, PRECURSORES DE ANTAGONISTAS A PATOGENOS VEGETALES, Y UNA CUBIERTA DE ALGINATO COAGULADO; METODOS DE PREPARACION; Y SU USO COMO BIOCIDA PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE PATOGENOS VEGETALES O PARA AUMENTAR LA FIJACION DE NITROGENO.	Luigi Ciampi Panno	Biofertilizante Biocontrolador	2000

A partir de esto, se evidencia que la fase investigativa o inventiva es llevada a cabo en gran parte por entidades educativas, y en menor medida por empresas. Sin embargo, durante los últimos años han existido una serie de proyectos ligados al desarrollo de biofertilizantes,

que no necesariamente se han traducido en la generación de patentes. En la base de datos de la Fundación para la Innovación Agraria (FIA) existen 18 proyectos de investigación relacionados con biofertilizantes, de los cuales 14 son en base a bacterias y hongos, mientras que los restantes son formulados en base a microalgas o enzimas (Tabla A.1, Anexo A).

La mayoría de los proyectos basados en microorganismos ha sido respecto a hongos micorrízicos y bacterias solubilizadoras de fósforo, para los cuales no se revelan la cepas exactas de los microorganismos utilizados. Además, destaca la existencia de un sólo proyecto ligado a la fijación de nitrógeno, el cual considera microalgas para llevar a cabo esta función.

Al profundizar en la base de datos, es posible notar que desde el año 2015 se inició la mayor parte de los proyectos (10 proyectos de un total de 18), existiendo aún algunos en ejecución. A partir de esto, es posible determinar que ha existido investigación respecto al desarrollo de biofertilizantes en base a microorganismos, sin embargo, al no existir una gran cantidad de proyectos iniciados durante los dos últimos años (2019-2020), es difícil determinar cómo será su alcance en el futuro.

A pesar de lo anterior, el hecho de que se destinen fondos públicos al desarrollo de proyectos de investigación en este rubro, indica que es un tema que se ha vuelto relevante, lo que supone que el mercado nacional de este tipo de bioinsumos debería ampliarse en los próximos años.

4.2.2. Importaciones

Al analizar las importaciones de biofertilizantes al país, aparecen una serie de dificultades, pues en primer lugar no existe un código arancelario específico para este tipo de productos, si no más bien son englobados dentro de la categoría: “Abonos de origen animal o vegetal, incluso mezclados entre sí o tratados químicamente”, por lo que es sumamente difícil caracterizar el mercado específico de biofertilizantes formulados a partir de microorganismos, puesto que se confunden con grupos de abonos de origen vegetal (restos de poda, algas, etc.) o de origen animal (guano, estiércol de animales, entre otros).

Independiente de lo anterior, la importación de este tipo de abonos, entre los que se incluyen los biofertilizantes, ha tenido cambios considerables dentro de los últimos años. En la Figura 4.1 es posible apreciar que el monto CIF (*Cost Insurance and Freight*, en español costo, seguro y flete) en dólares ha aumentado notoriamente desde el año 2002 al año 2019, en particular, se observa que a partir del año 2015 el crecimiento de las importaciones de este tipo de productos ha sido, en promedio, de un 20 % anual. Ahora bien, las cifras correspondientes a la exportación de abonos registrados bajo el código arancelario mencionado anteriormente (no se presentan gráficamente), denotan que esta es considerablemente menor respecto de la importación, representando entre un 10 % y un 40 % de los movimientos arancelarios de estos productos, a pesar de esto, existe una tendencia incremental de la exportación. Esto se condice con el incremento que ha tenido a nivel nacional y mundial la agricultura orgánica, la que se sustenta en el creciente interés por el consumo de productos orgánicos.

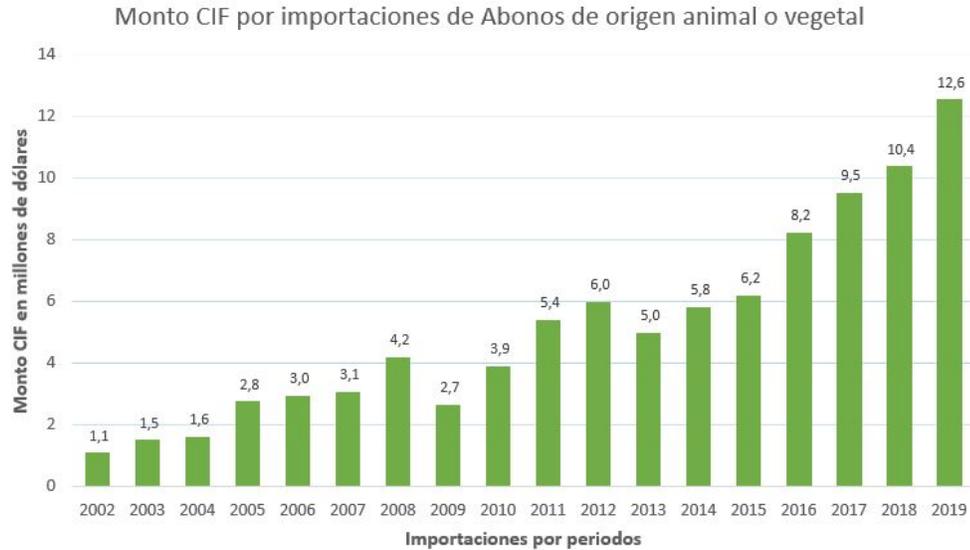


Figura 4.1: Importaciones de productos incluidos en el código arancelario 31010000. Elaboración propia a partir de los datos proporcionado por el registro nacional de aduanas.

En cuanto al mercado particular de bioinsumos, se determina que de las empresas que existen en Chile, un 34 % se declara productora, un 50 % netamente importadoras y un 16 % se dedica a ambos rubros, según se evidencia en el levantamiento de información guiado por la Universidad Federico Santa María, en colaboración con la Red de Chilena de Bioinsumos, ODEPA y empresas productoras y comercializadoras de bioinsumos [9].

Cuando los bioproductos ingresan al país, lo hacen bajo nombres distintos a los que aparecen en sus fichas de venta en Chile. Lo anterior se atribuye a que actualmente no existe normativa que regule las importaciones de bioinsumos, por lo que estos ingresan al país bajo nombres generales o inclusive, en la misma categoría que aquellos de origen químico, lo que favorece el desconocimiento de su composición y función. Lo anterior se evidencia en la Figura 4.2, donde un 75 % de los Bioinsumos que ingresan al país, lo hacen bajo el nombre de fertilizantes o abono.



Figura 4.2: Importación de bioinsumos según su nombre de entrada a Chile. Elaboración propia a partir de la información recopilada y publicada en Redagrícola [9].

A pesar de lo anterior, dentro del mercado nacional tanto los productos importados como los fabricados, son comercializados con nombres que evidencian su origen biológico y su objetivo de uso, es decir como biofertilizantes, bioestimulantes, biocontroladores, bioaceleradores, biorremediadores, y otros, tal como se presenta en la Figura 4.3.



Figura 4.3: Nombre comercial de bioinsumos presentes en Chile. Elaboración propia a partir de la información recopilada y publicada en Redagrícola [9].

Al caracterizar los productos importados, es importante notar que estos provienen de diferentes países, donde destacan España, USA, Italia, Nueva Zelanda y otros como Alemania, Dinamarca, India, China y Australia. A pesar de esto, existen países latinoamericanos con importante presencia, como lo es Colombia con un 14 %, seguido de México con un 8 %, tal como se aprecia en el gráfico presentado en la Figura 4.4.

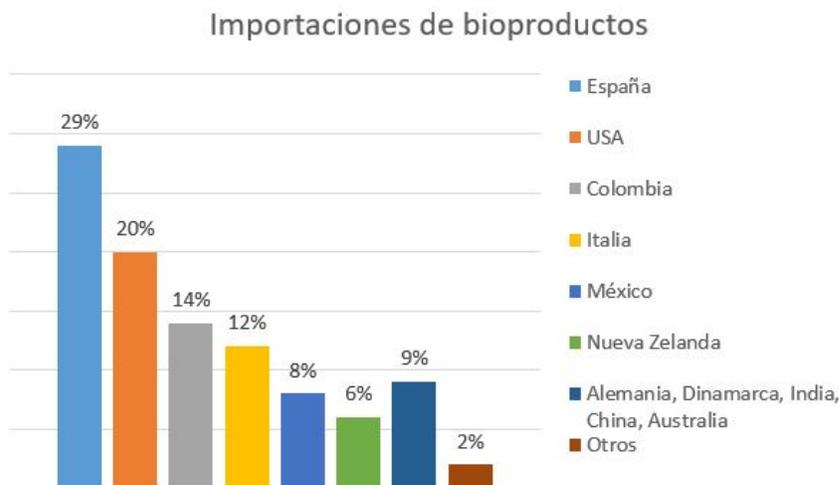


Figura 4.4: Países de origen de las mayores importaciones de bioproductos a Chile. Elaboración propia a partir de la información recopilada y publicada en Redagrícola [9].

El análisis anterior permite concluir que en la actualidad no existen números claros y representativos respecto a la comercialización de biofertilizantes en el país, sin embargo, debido al los incrementos en el consumo de productos orgánicos y a las exigencias en cuanto a calidad y sanidad de los productos exportados, el uso de insumos que tengan asociados un menor impacto tanto en su producción como en su aplicación a cultivos, ha incrementado considerable durante los últimos años, duplicándose las importaciones al país durante los últimos cinco años y considerando los últimos diez años, esta cifra ha aumentado casi cinco veces.

Por otro lado, la mayor cantidad de los productos comercializados y visados para su uso en la agricultura orgánica nacional son importados, correspondiendo a un 60 % del total (cifra obtenida a partir del registro de insumos visados para su uso en la agricultura orgánica nacional, SAG). Esto se relaciona con la limitada oferta nacional, la cual se basa principalmente en biofertilizantes formulados a partir de *Trichoderma spp.* y *Bacillus spp.* Es por esto que el estudio y desarrollo de procesos que permitan la producción de biofertilizantes con nuevas características a nivel nacional, permitiría reducir en parte, las importaciones de bioinsumos y cubrir una fracción importante de la demanda nacional, evitando y reduciendo los costos aduaneros y de transporte.

Capítulo 5

Selección de bacterias

El diseño del proceso productivo va a depender del tipo de microorganismos a producir, de sus condiciones de cultivo y de sus características de crecimiento, por lo tanto, es necesario definir las cepas de microorganismos a utilizar. En particular, se seleccionan microorganismos que actualmente estén teniendo una participación importante en el mercado de las importaciones a nivel nacional, con el fin de asegurar la existencia de una demanda insatisfecha por las empresas productoras de biofertilizantes en Chile. Por otro lado, se considerarán cepas de microorganismos que hayan sido probados y validada su eficiencia en el territorio chileno, y así, garantizar su eficacia de aplicación en el país.

Considerando lo anterior, se seleccionan dos especies caracterizadas por su capacidad de fijar nitrógeno, además de producir fitohormonas que estimulan el crecimiento de plantas. Las cepas seleccionadas corresponden a *Azospirillum lipoferum* y *Azotobacter chroococcum*, las cuales no son producidas actualmente por la industria nacional, si no que estos géneros (*Azospirillum* y *Azotobacter*) son importados y utilizados como biofertilizantes principalmente a través del producto TwinN, el cual ha sido probado y validado de manera exitosa en el territorio nacional.

Ambas bacterias son diazótrofes, lo que indica que son capaces de fijar nitrógeno atmosférico sin la necesidad de formar una simbiosis con plantas. Además, la utilización de insumos formulados a partir de estos microorganismos, al ser aplicados en combinación con fertilizantes tradicionales, trae consigo importantes beneficios, entre los cuales destaca la reducción de las tasas de lixiviación de nitratos, tal como se demostró en un estudio realizado en California, donde se evidenció una reducción del 35 % en nitratos en lixiviados de plantas tratadas con el producto TwinN (*Azotobacter spp.* y *Azospirillum spp.*), en comparación con plantas no tratadas con este bioinsumo [61].

5.1. Características de las bacterias seleccionadas

Azospirillum spp.

Las bacterias del género *Azospirillum* se caracterizan por ser Gram-negativas y facultativas de vida libre. Destacan por poseer gran flexibilidad para metabolizar carbono y nitrógeno, lo que las hace altamente competitivas en el suelo [62], pues pueden hacer uso de diversas fuentes de nitrógeno como amoníaco, nitrato, nitrito, nitrógeno molecular y aminoácidos, y fuentes de carbono como ácidos orgánicos (malato, piruvato, succinato y fructosa) [63]. Son capaces de colonizar tanto el interior como la superficie de las raíces, asegurando disponibilidad de nutrientes en la región radicular de la planta [64].

Este género se encuentra presente en diversas zonas geográficas, por lo que es ampliamente conocido y estudiado, destacando las siguientes especies de *Azospirillum*: *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. halopraeferens*, entre otras. No obstante, las especies que han sido estudiadas en mayor profundidad corresponden a *A. lipoferum* y *A. brasilense*, las cuales se encuentran generalmente colonizando regiones adyacente a gramíneas y forrajeras [65] [66]. Diversos estudios y ensayos en campo, han demostrado que el uso de *A. lipoferum* promueve el crecimiento vegetal, incrementando la productividad de los cultivos [67], principalmente cuando se asocia a plantas como tubérculos y cereales (maíz, avena y arroz) [68].

Azotobacter spp.

Azotobacter spp. corresponden a bacterias aeróbicas estrictas. Al igual que *Azospirillum spp.* son Gram-negativas de vida libre, capaces de realizar fijación biológica de nitrógeno y, producto de su metabolismo, generar sustancias promotoras del crecimiento vegetal [69]. Adicionalmente, *Azotobacter spp.* son capaces de solubilizar fosfatos, permitiendo incrementar la concentración de fósforo soluble en el suelo [70].

Esta bacteria es regularmente encontrada en diferentes tipos de suelos asociada a la rizósfera, o en las hojas de múltiples plantas. Las especies que más se destacan corresponden a *A. chroococcum*, *A. vinelandii* y *A. beijerinckii*. Se ha demostrado que la utilización de *Azotobacter spp.* ha permitido reducir hasta en un 40 % la fertilización nitrogenada tradicional, generando además, rendimientos de entre 25 % a 50 % en hortalizas, 44 % en maíz e incrementos menores en zanahoria, arroz y cebada [71]. Además, tiene la capacidad de fijar al menos 10 [mg] de N_2 por gramo de carbohidrato, sin embargo, su presencia en el suelo está fuertemente ligada a la existencia de materia orgánica, humedad y condiciones específicas de pH [71].

5.2. Co-inoculación

La técnica de inoculación mixta está basada en el uso de diferentes microorganismos, los que en conjunto producen un efecto sinérgico, siendo capaces de superar el nivel de productividad de cultivos comparado al caso de aplicación individual [72]. En bacterias se generan interacciones a través del suministro de nutrientes, remoción de productos o por estímulos a través de mecanismos físicos o bioquímicos, presentando mayores tasas de éxito, mejorando la absorción de nitrógeno, fósforo y otros minerales y, en consecuencia, aumentando la productividad de los cultivos [73].

Estudios de co-inoculación de *Azotobacter spp.* y *Azospirillum spp.* en cultivos de trigo, demostraron el efecto sinérgico de ambos géneros, verificándose una absorción de nitrógeno significativamente mayor que las mismas bacterias inoculadas de manera independiente [74].

5.3. Experiencia en Chile

Hasta el momento, en Chile no existen pruebas en campo de la efectividad de inoculación con estos microorganismos de manera independiente o conjunta, excepto por las pruebas de aplicación del producto TwinN. En la temporada 2015-2016 se realizaron siete ensayos comerciales desde la VII a la IX región del país, donde se evaluó la aplicación de este biofertilizante en remplazo de 100 [kg] de urea por hectárea y su efecto sobre el rendimiento en cultivos de trigo. En este estudio se obtuvo que el tamaño y peso de las espigas aumentó considerablemente, demostrando que la aplicación comercial de TwinN, es una herramienta eficaz y medioambientalmente sustentable, para reducir las aplicaciones de fertilizantes nitrogenados, manteniendo y/o aumentando los rendimientos [75].

Estos estudios han sido realizados principalmente por la empresa AM ecological (distribuidor del producto TwinN en Chile), mediante investigaciones conjuntas con diversas universidades (UDEDEC, UFRO, UST, UCV, UCT). En estos se demostró que el producto ayuda considerablemente al desarrollo radicular, y que en cultivos exigentes en nitrógeno puede ayudar a aportar un 30 % del requerimiento de este nutriente, mientras que en cultivos con bajos requerimientos de nitrógeno, este valor puede llegar al 50 % [76].

Adicionalmente, investigadores independientes realizaron estudios de efectividad del producto durante la temporada 2013-2014 en cultivos de papas de la Región de La Araucanía, en los cuales se evidenció un incremento significativo en el rendimiento de los tubérculos, disminuyendo la incidencia de enfermedades. Ante esto se concluye que la adición del biofertilizante TwinN a un cultivo de papa podría reemplazar en parte la fertilización química nitrogenada, disminuyendo los problemas de toxicidad en el suelo [77].

Capítulo 6

Capacidad de la línea de proceso

Durante los últimos años se ha presentado un creciente interés por el consumo de productos orgánicos, de hecho, la demanda global de este tipo de alimentos ha aumentado considerablemente, donde el mercado de estos pasó de USD 21.000 millones en 2001 a los USD 89.700 millones en 2016, lo que representa un crecimiento de 327% para el periodo [78]. Los principales consumidores de alimentos orgánicos son los europeos, quienes a pesar de producir localmente sus productos, existen épocas del año y frutas específicas que no son cultivables en sus tierras, por lo que esa falta de suministro es un mercado potencial tanto para Chile como para otros productores orgánicos. Prueba de esto es el incremento en las exportaciones de ese tipo de productos que sólo en el 2018 fue de un 16% respecto al año anterior.

Dentro de las repercusiones que ha tenido esta nueva forma de fertilización destaca la aparición de nuevas regulaciones y exigencias respecto a su uso. En particular, la Unión Europea (UE) aprobó el Reglamento 2019/1009, el cual comenzará aplicar en 2022, donde se explicita la necesidad de utilizar productos orgánicos para fertilizar [79]. Chile no se ve exento a esta nueva normativa, ya que como país exportador, debe estar al tanto en lo que respecta a normas de importación tanto de la UE como de EEUU, China, Japón y Corea, que son los principales importadores (cerca del 50% de las importaciones del rubro) [80].

Considerando lo anterior, se espera que el producto se certifique orgánicamente, por lo que para determinar la capacidad de producción, se consideran aquellos suelos orgánicos nacionales que se encuentran certificados. Según datos del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), la superficie nacional certificada orgánica corresponde a la mostrada en la Figura 6.1 [81]. En esta sólo se incluyen superficies asociadas a: recolección silvestre; frutales mayores; frutales menores; uva vinífera; plantas medicinales y aromáticas; hortalizas y leguminosas y, cereales y viveros, excluyendo superficies clasificadas como praderas o sin uso productivo, puesto que en estas no se realizan procesos de fertilización.

A partir de los datos informados por el SAG, es posible analizar de manera general el comportamiento del sector. Se observa que, entre el año 2017 y 2018, la superficie orgánica bajó un 62%, es decir de 171.479 [ha] disminuyó a 65.971 [ha].



Figura 6.1: Evolución de la superficie orgánica. Elaboración propia a partir de datos publicados por el SAG.

Esta disminución se refleja en superficies destinadas a hortalizas, plantas medicinales y aromáticas, y, cereales y viveros, debido a que el SAG cambió la manera de entregar las estadísticas de superficies certificadas. Esto consistió en que desde el año 2018, sólo se declara la superficie física certificada como “policultivo”, que anteriormente consideraba la suma de la superficie cultivada de todo el año. Por ejemplo, si antes en 1 [ha] se cultivaban dos rotaciones por año, la superficie orgánica certificada era 2 [ha], pero desde el año 2018 está fue de sólo 1 [ha] [81]. A pesar de esta modificación, se aprecia una tendencia de crecimiento evidente y constante.

Con el fin de estimar la superficie orgánica que se desea cubrir con el biofertilizante, se proyecta la superficie orgánica nacional para el año 2025. Para esto, se consideran los datos actuales del SAG (color verde en la Figura 6.2), es decir con la nueva forma de contar la superficie orgánica certificada, pero incluyendo la tendencia histórica, es decir, se supone que la superficie orgánica se incrementará en la misma razón en que aumentó durante los años 2014 a 2017. Esta proyección se presenta en rojo, a continuación en la Figura 6.2.



Figura 6.2: Evolución de la superficie orgánica proyectada a 2025.

De esta manera, se proyecta que para el 2025 la superficie orgánica certificada (excluyendo praderas y suelos sin uso productivo) será 306.711,8 [ha], lo que corresponde a casi un 15 % de la superficie nacional cultivable, equivalente a 2.123.943 [ha] [82].

Se considera cubrir en un 35 % la superficie orgánica proyectada para el 2025, es decir 107.349 [ha]. Adicionalmente, acorde a información proporcionada por expertos del área comercial¹, se sugiere ofrecer el producto a agricultores que no estén certificados como orgánicos, puesto que muchos no han iniciado este trámite debido al costo monetario y a las constantes renovaciones. Es por esto que se determina cubrir además un 10 % de los suelos cultivables no certificados, equivalente a 181.723 [ha]. En resumen, se propone abarcar 289.072 [ha] de suelos cultivables.

Considerando que 1 hectárea debe ser inoculada con $6 \cdot 10^{10}$ [UFC], acorde a la proporción indicada para biofertilizantes fijadores de nitrógeno, y que además, se obtiene una mayor efectividad si esta inoculación se repite en una segunda aplicación [83] [84], entonces la producción total de microorganismos para el año 2025 debe ser de $3,47 \cdot 10^{16}$ [UFC]. Como el peso seco de las bacterias es igual a $1 \cdot 10^{-12}$ [g], entonces se requiere una producción anual de 34,7 [kg] (peso seco).

Ahora bien, si se considera que la efectividad de separación en el proceso de centrifugado es igual a un 90 % [85] y que la viabilidad celular de los microorganismos luego de la etapa de liofilización es de un 80 % [86], se determina que la masa anual de bacterias a producir es de 48,17 [kg] (peso seco). De esta forma se asegura que la cantidad de producto final generado permite inocular el número de hectáreas definido.

¹ Reunión sostenida con María Isabel Guerra, *Ingeniera Civil Industrial, Máster en Gestión y Economía de la Innovación*, diciembre 2020.

Capítulo 7

Selección del proceso de producción

El diseño es una parte fundamental del desarrollo de cualquier proceso, así como también, la elección de las operaciones y tipos de equipos a utilizar. Esto permitirá, posteriormente, realizar los balances de masa y establecer los requerimientos energéticos de cada equipo en particular. Considerando los objetivos del trabajo y la información presentada en los capítulos anteriores, en esta sección se establecerán los criterios de diseño del proceso de producción de las bacterias *Azotobacter chroococcum* y *Azospirillum lipoferum*, junto con sus requerimientos nutricionales y condiciones de fermentación. Finalmente, se definirán las etapas posteriores a la fermentación, que determinarán el formato del producto final.

7.1. Medio de cultivo

A continuación, se analizan los diferentes medios de cultivos que pueden ser utilizados para cada microorganismo, tomando en consideración las fuentes de carbono, nitrógeno, sales y otras soluciones nutritivas. La elección se basará en el medio diseñado que presente mejores rendimientos y tasas de crecimiento para cada microorganismo.

7.1.1. Fuente de Carbono

Algunas de las especies del género *Azospirillum* usan para su crecimiento fuentes de carbono específicas, como algunos monosacáridos y disacáridos, además de ácidos orgánicos como el ácido málico y el succínico [87]. Especies como *A. lipoferum* y *A. brasilense* tienen todas las enzimas de la vía *Embden-Meyerhof-Parnas* (vía de glucólisis anaerobia) y de la vía *Entner-Doudoroff* (vía no tradicional que cataboliza glucosa a piruvato), además de las del ciclo de los ácidos tricarbónicos, por lo que tienen la capacidad de utilizar diferentes fuentes de carbono [88]. Esto hace que estas especies tengan un metabolismo carbonado y nitrogenado muy versátil, permitiendo que se adapten y se establezcan de manera competitiva en el entorno de las plantas, pudiendo utilizar una amplia gama de sustratos. Además, en condiciones ambientales desfavorables, tales como desecación y carencia de nutrientes, estas bacterias pueden enquistarse, recubriéndose con una capa de polisacáridos y además, acumulando gránulos de β -hidroxibutirato, que cumplen un rol de reserva de carbono [89] [90].

A partir de una recopilación bibliográfica, se determinan las fuentes de carbono que pueden ser metabolizadas por las principales especies del género *Azospirillum*, las cuales se presentan a continuación en la Tabla 7.1.

Tabla 7.1: Fuentes de carbono utilizadas por diferentes especies del género *Azospirillum*.

Especies\ Fuentes de Carbono	<i>A. doebereineriae</i>	<i>A. lipoferum</i>	<i>A. brasilense</i>	<i>A. halopraeferens</i>	<i>A. amazonense</i>
Glucosa	+/-	+	+	-	+
Glicerol	+	+	+	+	-
Manitol	+	+	-	+	-
Ribosa	-	+	-	+	+
Sorbitol	+	+	-	-	-
Sacarosa	-	+	+	-	+
N-acetil glucosamina	-	+	-	ND	+/-

Nota: -, Al menos el 90% de las muestras no puede metabolizar la fuente de carbono; +, Más del 90% de las muestras pueden metabolizar la fuente de carbono; +/-, Algunas muestras (10 y 90%) pueden metabolizar la fuente de carbono; ND, Información no disponible. Elaboración propia a partir de una recopilación de diversos autores [87] [88] [89] [91].

El género *Azotobacter* es similar al género *Azospirillum*, tanto en su funcionamiento como en sus requerimientos nutricionales y ambientales. Como se mencionó en secciones anteriores, ambas bacterias son diazotróficas y capaces de metabolizar diferentes sustratos como fuentes de carbono. Particularmente, *A. chroococcum* es capaz de metabolizar fructosa, glucosa, sacarosa, manitol, succinato, entre otros [92] [93] [94]. Un resumen de las fuentes de carbono utilizadas por las principales cepas del género *Azotobacter* se muestra en la Tabla 7.2.

Tabla 7.2: Fuentes de carbono utilizadas por diferentes especies de *Azotobacter*.

Especies\ Fuentes de Carbono	<i>A. vinelandii</i>	<i>A. beijerinckii</i>	<i>A. paspali</i>	<i>A. chroococcum</i>
Glucosa	+/-	+	+	+
Glicerol	+/-	+/-	-	+/-
Manitol	+	+/-	-	+
Sorbitol	+	+/-	-	+
Sacarosa	+	+/-	+	+
Fructosa	+	+	+	+

Nota: -, Al menos el 90% de las muestras no puede metabolizar la fuente de carbono; +, Más del 90% de las muestras pueden metabolizar la fuente de carbono; +/-, Algunas muestras (10 y 90%) pueden metabolizar la fuente de carbono. Elaboración propia a partir de una recopilación de diversos autores [92] [93] [94].

7.1.2. Fuente de Nitrógeno

Azotobacter spp. y *Azospirillum spp.* son capaces de metabolizar diferentes fuentes de nitrógeno como amonio, nitrato, nitrito y aminoácidos. Cuando estos se presentan en bajas concentraciones, las bacterias expresan la actividad nitrogenasa, pudiendo captar y metabolizar el nitrógeno molecular atmosférico [22], el cual se utiliza principalmente para la biosíntesis de sus proteínas, ácidos nucleicos y polímeros de la pared celular [87].

7.1.3. Fuente de Fósforo y Azufre

El fósforo es un elemento esencial para el desarrollo de *Azotobacter spp.* y *Azospirillum spp.*, puesto que estimula el metabolismo de carbono y la fijación de nitrógeno. Es por esto que, la carencia de este micronutriente puede llegar a inhibir el desarrollo de estos microorganismos [95]. La forma más común de adicionar fósforo a medios de cultivo es en forma de ácidos nucleicos y fosfatos (PO_4^{-3}).

El azufre es utilizado para la síntesis de aminoácidos como metionina y cisteína, y suele ser incorporado al medio de cultivo en forma de sulfato (SO_4^{-2}), siendo los más comunes $MgSO_4$ y K_2SO_4 .

7.1.4. Micronutrientes y vitaminas

Las bacterias diazotróficas requieren de otros elementos para llevar a cabo la fijación de nitrógeno molecular, entre ellos el Mg y el K. Ambos suelen ser incorporados en conjunto con los sulfatos y fosfatos [96].

Adicionalmente, se requiere la incorporación de otros micronutrientes, los cuales contribuyen al funcionamiento estructural de enzimas. Entre estos se encuentran aquellos utilizados para el crecimiento, como Ca, Mn, Fe, Co, Cu y Zn y otros escasamente utilizados por el metabolismo: Na, Al, Si, Cl, Cr, Ni, Se, As, Mo, Sn e I. Por lo general es complejo demostrar el requerimiento exacto de estos micronutrientes, puesto que suelen estar asociados a impurezas de los componentes principales [96].

Las vitaminas suelen actuar como coenzimas y en su mayoría, son sintetizadas por los microorganismos, particularmente, *Azotobacter spp.* y *Azospirillum spp.* tienen la capacidad de producirlas por lo que no se requiere su adición artificial en los medios de cultivo [97].

7.1.5. Factores fisicoquímicos

- pH

Azospirillum spp. presenta un rango óptimo de pH entre 6,5 y 7,5, por lo que valores fuera de este rango podrían desencadenar la inhibición del crecimiento y desarrollo del microorganismo. Particularmente para *A. lipoferum*, suelen utilizarse valores entre 7,0 y 7,5 [98], mientras que para *A. brasilense* suelen considerarse pH entre 6,0 a 7,8 [99]. Por otro lado, *Azotobacter spp.* pueden crecer desde pH cercanos a 5,5, como *A.*

chroococcum y *A. vinelandii* [100], no obstante, su crecimiento óptimo se encuentra en un pH entre 7,0 y 7,5 [101].

■ **Temperatura**

Especies del género *Azospirillum* presentan condiciones óptimas de crecimiento a temperaturas entre 30 y 37 °C, siendo las más comunes entre 30 y 35 °C [98]. Para el caso de *Azotobacter spp.* la temperatura óptima se encuentra entre 30 a 32 °C [102], en específico, *Azotobacter chroococcum* alcanza un crecimiento óptimo a 30 °C [101].

■ **Aireación**

Para *Azotobacter chroococcum*, al igual que para otras especies del género *Azotobacter*, la aireación y la agitación son parámetros que influyen positivamente la producción de biomasa en sistemas de fermentación líquida en tanque agitado [103, 104]. Esto se debe a que *A. chroococcum* requiere de oxígeno para su óptimo crecimiento y desarrollo celular [105]. Considerando lo anterior, resultados reportados por Peña et al. [105], aseguran que la aireación necesaria para bacterias del género *Azotobacter* en sistemas de fermentación de tanque agitado es de 1 vvm (volumen de aire/volumen de medio · minuto), mientras que otros estudios indican que a partir de 0,4 vvm se logra una aireación suficiente, obteniendo rendimientos similares [106].

Para *Azospirillum spp.* la aireación y la agitación también son fundamentales para el crecimiento del microorganismo, donde la aireación reportada varía desde los 0,5 vvm [98] hasta 1,5 vvm (España, 1997. Patente N° 2093559).

7.1.6. Selección del medio de cultivo

Para *Azotobacter chroococcum*, la velocidad específica de crecimiento (μ) varía entre 0,09 [h^{-1}] y 0,12 [h^{-1}], dependiendo de la fuente de carbono y las condiciones de operación [107]. Para este estudio, se considera un medio de cultivo que utiliza melaza (47,6 % peso/peso de sacarosa) como principal sustrato, donde el microorganismo alcanza una velocidad específica de crecimiento de 0,11 [h^{-1}]. La elección de este medio, se sustenta en que tanto de la velocidad (μ) como el rendimiento de sustrato en células ($Y_{x/y}$) son conocidos, por otro lado, a pesar de que la bacteria es diazotrófica, la presencia de nitrógeno en el medio (contenido en la melaza) permite alcanzar la tasa de crecimiento mencionada anteriormente, sin la necesidad de agregar compuestos nitrogenados adicionales al medio [101].

En este caso, se consideran 40 [g/L] de melaza (19 [g/L] de sacarosa), puesto que concentraciones mayores (sobre 30 [g/L] de sacarosa), sumado a un aireación excesiva, inducen la producción de alginato, tal como ocurre con *Azotobacter vinelandii* [108] [109], lo que genera una barrera adicional a la transferencia de oxígeno dentro del sistema, teniendo que incrementar el suministro de este durante la operación [110]. Además, este desvío de nutrientes (hacia la producción de alginato) limita la generación de biomasa. Considerando lo anterior, el medio propuesto para el crecimiento de *Azotobacter chroococcum* se muestra en la Tabla 7.3.

Tabla 7.3: Composición medio utilizado para el crecimiento de *Azotobacter chroococcum* [101].

Componentes	Cantidad [g/L]
Melaza	40
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1
$Na_2MnO_4 \cdot 2H_2O$	0,005
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,1
KH_2PO_4	0,1
K_2HPO_4	0,9
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01

En el caso de *Azospirillum lipoferum*, la velocidad específica de crecimiento (μ) es similar a las obtenidas para *Azotobacter chroococcum* [111]. Para este microorganismo, se considera un medio de cultivo basado en glucosa como principal fuente de carbono, además de la adición de otros compuestos necesarios para el crecimiento del microorganismo [112]. Dentro de la composición del medio, se descarta la adición de extracto de levadura, puesto que durante su consumo no se observa crecimiento del microorganismo, sino sólo acumulación de PHB [98]. El medio propuesto, cuya composición se muestra en la Tabla 7.4 permite alcanzar una velocidad específica de crecimiento (μ) de $0,13 [h^{-1}]$, levemente mayor que para el caso de *Azotobacter chroococcum*.

Tabla 7.4: Composición medio utilizado para el crecimiento de *Azospirillum lipoferum* [98].

Componentes	Cantidad [g/L]
Glucosa	20
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2
$NaCl$	0,1
$Na_2MnO_4 \cdot 2H_2O$	0,002
$CaCl_2$	0,02
KH_2PO_4	0,4
K_2HPO_4	0,6
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01
$(NH_4)_2SO_4$	3

Preparación del medio de cultivo

Para elaborar los medios de cultivo, se deben realizar 2 soluciones. La primera debe contener la fuente de carbono principal (melaza para el caso de *Azotobacter chroococcum* y glucosa para *Azospirillum lipoferum*) y las sales de potasio, mientras que la segunda incluye las sales restantes. Lo anterior se realiza con el objetivo de evitar la precipitación de sales. Una vez esterilizadas ambas soluciones, se procede a la mezcla de estas, desarrollando así los medios de cultivo [113].

7.2. Fermentación

La fermentación tiene como objetivo aumentar la biomasa inicial, con el fin de que al terminar el proceso, se obtenga la cantidad de producto estimada semanalmente. Como se presentó en la sección 3.3.2, las fermentaciones pueden ser realizadas en tres modos de operación principales: *batch*, *fed-batch* o de manera continua, acorde a las condiciones de crecimiento del microorganismo y de la concentración que se desea alcanzar.

En este caso particular, se requiere llevar a cabo una fermentación simple, cuyo principal objetivo es el aumento de biomasa, por lo que se determina la utilización de cultivos *batch*, excepto por la última etapa de la fermentación, en la cual se incorporará la operación *fed-batch*, con el fin de prologar la fase exponencial del microorganismo, incrementando aún más la biomasa generada.

Considerando lo anterior, el proceso de fermentación se lleva a cabo en dos etapas principales: la primera de propagación en matraces de 0,3 litros y luego en fermentadores de 3 litros de capacidad, y la segunda, consistente en la fermentación principal realizada en reactores *fed-batch* de 30 litros (los valores antes mencionados hacen alusión al volumen de ocupación de los reactores con caldo de cultivo).

Como el biofertilizante formulado estará compuesto por ambos microorganismos en igual proporción, y como estos tienen requerimientos y características de crecimiento y cultivo diferentes, se opta por el diseño de dos líneas de proceso, una para cada microorganismo, la línea L1 (cultivo de *Azotobacter chroococcum*) y L1' (cultivo de *Azospirillum lipoferum*).

7.3. Concentración de la biomasa

Los tiempos de operación en etapas de posteriores de formulación pueden oscilar entre las 12 y 24 horas, en productos con una humedad de alrededor del 70 %, por lo que es fundamental la existencia de etapas de concentración de la biomasa con el fin de reducir los tiempos de operación y en consecuencia, los gastos energéticos asociados.

Como técnicas de concentración de células del caldo de cultivo, suelen utilizarse la filtración, microfiltración y centrifugación. Cuando el procedimiento requerido busca aumentar la concentración celular sin la necesidad de separar las células completamente del medio de cultivo (como es el caso), es preferible utilizar equipos de centrifugación [114, 115], donde destacan centrífugas tubulares y de disco.

La principal diferencia entre estas centrífugas se basa en el diseño de su tazón o tina, y en la forma como se descargan los sólidos sedimentados [116]. Las centrífugas de discos constan de un eje vertical sobre el cual se monta un conjunto de discos en forma de conos, uno sobre otro. Durante la operación, los sólidos se depositan en la cara interna de estos, resbalando hacia la cámara colectora debido al ángulo de los discos. En la mayoría de los casos se obtiene un sedimento de consistencia lodosa [116].

Las centrífugas tubulares son eficientes y sencillas, capaces de separar partículas hasta de $0,1 \text{ } [\mu\text{m}]$. Como se observa en la Figura 7.1, durante una operación típica, la suspensión es alimentada por la parte inferior de la centrífuga y los sólidos sedimentan en la pared del tubo, mientras que el líquido claro se colecta por rebosamiento en la parte superior. Sin embargo, la torta tiene que ser descargada manualmente, por lo que su operación es discontinua. Los modelos industriales típicos cuentan con un tubo de $11,5 \text{ } [\text{cm}]$ de diámetro por $76 \text{ } [\text{cm}]$ de longitud, el cual puede girar hasta $15.000 \text{ } [\text{rpm}]$, con capacidad entre $500 \text{ y } 3.500 \text{ } [\text{L/h}]$ y una retención de sólidos de hasta $4 \text{ } [\text{kg}]$ por lote [116].

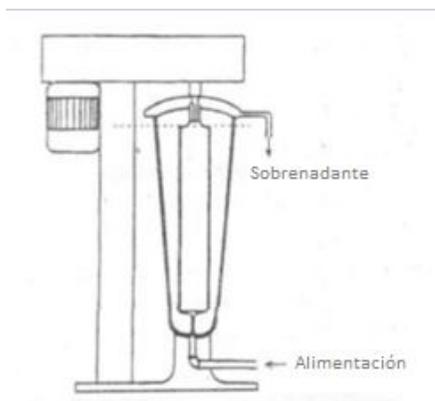


Figura 7.1: Centrífuga sedimentadora de tipo tubular [116].

Se determina utilizar una centrífuga tubular, pues requiere cortos tiempos de operación (asociado a las altas revoluciones alcanzadas) y se genera una torta firme (con baja concentración de agua), que favorece su depósito y posterior tratamiento en equipos de formulación.

7.4. Formulación

Existen diferentes formulaciones para los biofertilizantes, como soportados en suelos (arcillas, turba, carbón, etc.), en materiales inertes (perlita, vermiculita, alginato, etc.), encapsulados, formulaciones líquidas y cultivos liofilizados (Ver sección 3.3.3). Para determinar la formulación óptima para la producción de este biofertilizante, se considera la opinión de expertos en el rubro, quienes sugieren que es indispensable que el biofertilizante formulado permita un fácil manejo, un almacenamiento a largo plazo y que ocupe el menor volumen posible para reducir sus costos de transporte y exportación ¹. Considerando esto, se determina que el biofertilizante tendrá una presentación liofilizada, puesto que asegura altos índices de supervivencia (sobre el 80%) [117], además de permitir un almacenamiento reducido y por largos períodos a temperatura ambiente.

¹ Conversación sostenida con Pablo Nuñez y María Fernanda Flores, *Gerente técnico y Gerente de Proyectos en Agroadvance SpA, respectivamente*, noviembre 2020.

Capítulo 8

Balance de masa

En este capítulo se presentan los balances de masa correspondientes a cada operación unitaria del proceso de producción del biofertilizante, incluyendo los flujos involucrados con su correspondiente composición y magnitud.

Tal como se mencionó en el Capítulo 6, para el año 2025 se requiere una producción anual de 34,7 [kg] (peso seco) de biofertilizante. Sin embargo, al considerar las pérdidas de biomasa en las etapas de centrifugación y la pérdida de viabilidad luego de la liofilización, se determina una producción de 48,2 [kg], para asegurar que el producto final a aplicar pueda inocular el número de hectáreas definido.

Considerando que la elaboración de cada lote de producto tendrá una duración estimada de una semana, entonces la cantidad de microorganismos a producir por lote será de 926 gramos (peso seco). Como el biofertilizante estará compuesto en igual proporción por cada microorganismo, se determina una producción de 463 gramos (peso seco) a la semana de *Azotobacter chroococcum* y la misma magnitud para *Azospirillum lipoferum*.

El proceso de producción diseñado considera dos líneas independientes para cada microorganismo, debido a que estos poseen diferentes tasas de crecimiento y requerimientos nutricionales, por lo que los rendimientos y condiciones de fermentación varían. Para la etapa de concentración, se utilizará la misma centrífuga para ambos microorganismos, la cual incluirá el vaciado y limpieza del tazón antes de realizar el cambio de cepa. Una vez que se obtiene la biomasa concentrada, esta se posiciona en un liofilizador en bandejas diferenciadas para cada microorganismo, de esta forma el equipo opera sólo una vez con ambas bacterias en su interior, reduciendo costos energéticos. Una vez que culmina la liofilización, se mezclan ambos microorganismos en igual proporción para el desarrollo del biofertilizante. Un esquema de lo anterior se muestra a continuación en la Figura 8.1.

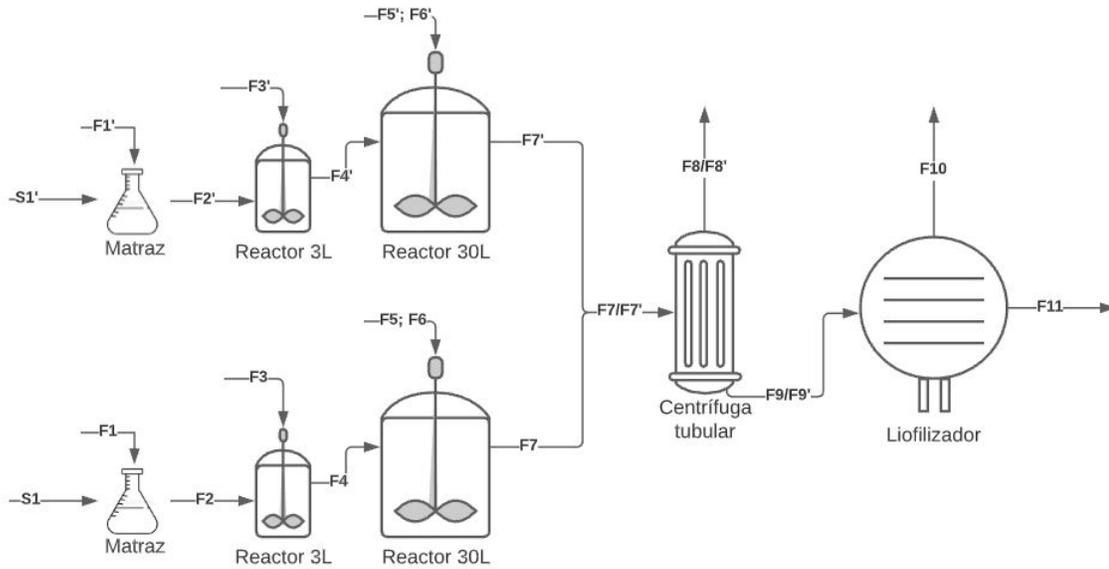


Figura 8.1: Diagrama del proceso productivo. Los Flujos F hacen alusión a *Azotobacter chroococcum*, mientras que los flujos F' a *Azospirillum lipoferum*. La descripción de cada corriente se incluye en detalle en las secciones 8.1 a la 8.3.

8.1. Etapas de fermentación

8.1.1. Cultivo de *Azotobacter chroococcum*

La finalidad del proceso de propagación es aumentar la cantidad de biomasa que se inoculará en el fermentador principal (30 litros). Estas etapas consisten en fermentaciones sucesivas dentro de las cuales están: cultivo en matraz de 300 [ml], cultivo en fermentador de 3 [L] y cultivo en un fermentador de 30 [L]. Cada uno de estos cultivos es inoculado con el cultivo anterior y alimentado con el medio de cultivo determinado en la sección 7.1.6. La Figura 8.2 ilustra el sistema de propagación en fermentadores.

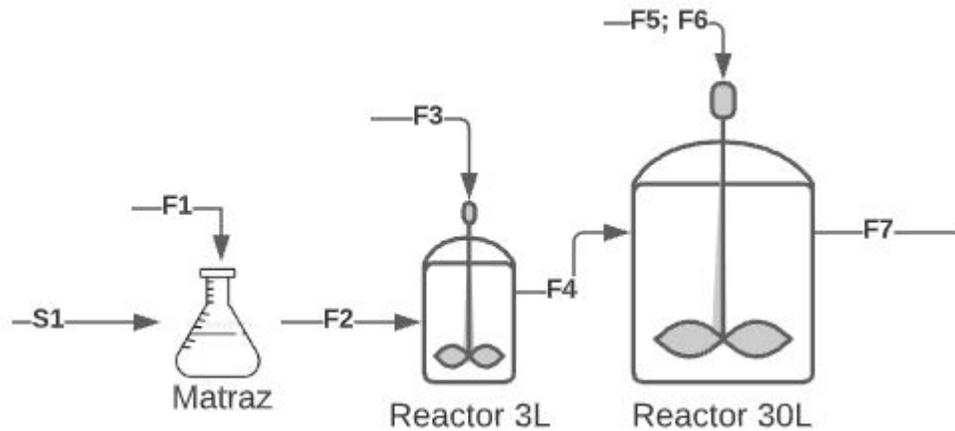


Figura 8.2: Diagrama de las etapas de fermentación

Como se mencionó previamente, existen dos líneas de producción, una para cada microorganismo, donde la notación varía con el uso de comillas, por ejemplo S1 corresponde al preinóculo de *Azotobacter chroococcum* y S1' corresponde al preinóculo de *Azospirillum lipoferum*. Para las siguientes secciones, se ilustrarán las imágenes representativas para un microorganismo (*Azotobacter chroococcum*), para no ser redundante con la presentación de la información.

a) Propagación en matraz

Se utiliza un matraz para la generación del inóculo de *Azotobacter chroococcum* a partir de un preinóculo (S1) y medio de cultivo (F1).

■ Esquema del proceso

En la Figura 8.3 se aprecia el diagrama asociado a la generación del inóculo en el matraz.

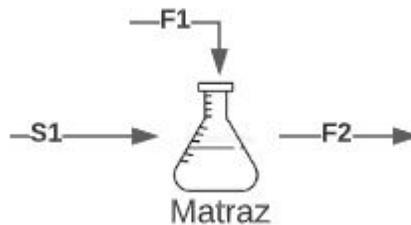


Figura 8.3: Diagrama del cultivo en matraz.

■ Datos

Para la realización del balance de masa, es necesario conocer el valor de los parámetros presentados a continuación en la Tabla 8.1.

Tabla 8.1: Datos utilizados para el balance de masa en el Matraz.

Parámetros	Valor	Unidad	Referencia
Velocidad específica de crecimiento (μ)	0,11	[1/h]	[101]
Concentración final de biomasa (x_f)	6	[g/L]	En este trabajo
Rendimiento de sustrato en células ($Y_{x/y}$)	0,413	[g/g]	[101]

Además, en la Tabla 8.2 se describen los volúmenes y su caracterización al inicio y término de la operación en el matraz.

Tabla 8.2: Descripción y volúmenes al inicio y término de la operación en el matraz.

Nombre	Descripción	Inicio [L]
S1	Preinóculo	0,03
F1	Medio de cultivo	0,27
F2	Inóculo	0,3

■ Ecuaciones y supuestos

Para la realización del balance de masa en el matraz, se consideraron los siguientes supuestos:

- La velocidad específica de crecimiento (μ) y el rendimiento de sustrato en células ($Y_{x/y}$) corresponden a datos específicos obtenidos para *Azotobacter chroococcum* en el medio de cultivo seleccionado, el cual utiliza melaza como fuente de carbono en una concentración de 40 [g/L], lo que corresponde a 19 [g/L] de sacarosa.
- Se asume que el preinóculo es un 10 % del volumen del inóculo final [101], es decir 30 [mL], y que la concentración inicial de células es de 0,6 [g/L], lo que corresponde a un 10 % de la concentración final que se desea alcanzar.
- Esta etapa se detiene cuando la concentración de microorganismos alcanza los 6 [g/L]. Es importante tener en cuenta que para conservar el crecimiento exponencial del microorganismo, no se debe agotar la sacarosa presente en el medio, pero se debe asegurar que el consumo de esta sea de al menos el 80 %, para minimizar el aprovechamiento incompleto del sustrato, y por ende, gastos innecesarios en la adquisición de este [101].
- El sistema considera una operación *batch*, esto indica que no existen flujos de entrada ni de salida. Además se asume una agitación constante, asegurando la homogeneidad en el caldo de cultivo.
- Se considera que la densidad al inicio y al final de la operación en el matraz es constante e igual a la del agua, debido a la alta concentración de esta última (sobre el 98 %).
- Por último, se supone el crecimiento del microorganismo en su fase exponencial, por lo tanto, la muerte celular se asume como despreciable ($\alpha = 0$).

El balance global en el equipo esta dado por la Ecuación 8.1.

$$F^{in} \cdot \rho^{in} - F^{out} \cdot \rho^{out} = \frac{d(\rho \cdot V)}{dt} \quad (8.1)$$

Considerado que no existen entradas ni salidas del sistema ($F^{in} = F^{out} = 0$), se obtiene:

$$\frac{d(\rho \cdot V)}{dt} = 0$$

Tomando en cuenta una densidad constante, se desprende que no existe variación de volumen, es decir $V = constante$.

Considerando esto, al final de la operación se tendrá el mismo volumen que al inicio, que correspondería a la suma del volumen del preinóculo más el medio de cultivo.

$$V_{S1} + V_{F1} = V_{F2}$$

Considerando los valores indicados en la Tabla 8.2, entonces $V_{F2} = 0,3 [L]$.

El sustrato es consumido acorde a la generación de biomasa obtenida, en este caso se conoce la concentración inicial y final de microorganismos, por lo que a partir de la Ecuación 8.2 es posible estimar la concentración de sacarosa al finalizar la operación.

$$Y_{x/y} = \frac{\Delta x}{-\Delta s} \quad (8.2)$$

Considerando los datos de la Tabla 8.1, se obtiene la concentración final de sacarosa.

$$Y_{x/y} = \frac{x_f - x_i}{-(s_f - s_i)}$$

$$s_f = \frac{19 \text{ [g/L]} \cdot 0,27 \text{ [L]}}{0,3 \text{ [L]}} - \frac{6 \text{ [g/L]} - 0,6 \text{ [g/L]}}{0,413 \text{ [g/g]}} = \approx 4 \text{ [g/L]}$$

La concentración de sacarosa remanente es de 4 [g/L], sin embargo, esta continuará consumiéndose en las siguientes fermentaciones.

Para los microorganismos, a pesar de que se conoce la concentración inicial y final, se realiza un balance de biomasa, con el fin de obtener su dependencia en el tiempo, tal como se muestra en la Ecuación 8.3.

$$Células_{in} - Células_{out} + Crecimiento_{celular} - Muerte_{celular} = Acumulación \quad (8.3)$$

Al reemplazar cada uno de estos términos por su expresión matemática, se obtiene:

$$F \cdot x_{in} - F \cdot x_{out} + \mu \cdot x \cdot V - \alpha \cdot x \cdot V = \frac{d(x \cdot V)}{dt}$$

Tomando en consideración que a partir del balance de masa global del equipo, se obtuvo que el volumen era constante, entonces $\frac{d(V)}{dt} = 0$. Además, tal como se menciona en los supuestos, al ser una operación *batch* no existen corrientes de entrada ni salida ($F=0$) y por último, se considera despreciable la muerte celular ($\alpha = 0$). De esta forma, la expresión se reduce a lo siguiente:

$$\mu \cdot x \cdot V = V \cdot \frac{d(x)}{dt}$$

Simplificando el volumen, reordenando términos e integrando, se obtiene la Ecuación 8.4 que relaciona la concentración de microorganismos con su tasa de crecimiento y el tiempo de cultivo. A partir de esta expresión, en el capítulo 9 se obtendrá el tiempo de fermentación.

$$x = x_0 \cdot e^{\mu \cdot t} \quad (8.4)$$

Considerando las concentraciones y volúmenes obtenidos previamente, se determinan las composiciones al inicio y final de la operación, las cuales se muestran a continuación en la Tabla 8.3. Además, en el Anexo B, se presentan los resultados del balance en masa, volumen y concentración, para los microorganismos, sustratos y medios de cultivo.

Tabla 8.3: Composición másica y caracterización al inicio y término de la operación.

Nombre	Biomasa [g]	Medio de cultivo [g]
S1	0,18	29,82
F1	-	270
F2	1,8	298,2

b) Propagación en Reactor de 3 litros

Se realiza una propagación en un reactor de 3 [L] para el crecimiento de los microorganismos, a partir de la biomasa generada en el matraz y la adición de medio de cultivo.

■ Esquema del proceso

La Figura 8.4 muestra el diagrama asociado a la propagación en el reactor de 3 litros.

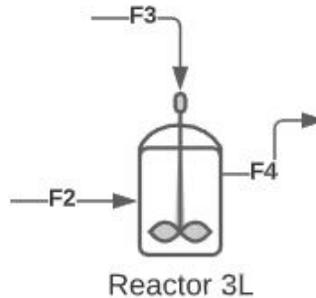


Figura 8.4: Diagrama del cultivo en el reactor de 3 litros.

■ Datos

Para la realización del balance de masa, se utilizan los parámetros cinéticos del microorganismo, presentados previamente en la Tabla 8.1. En este caso la concentración final que se desea alcanzar se presenta en la Tabla 8.4.

Tabla 8.4: Concentración final en reactor de 3 litros.

Parámetros	Valor	Unidad	Referencia
Concentración final de biomasa (x_f)	7,5	[g/L]	En este trabajo

En la Tabla 8.5 se muestran los volúmenes al inicio y término de la operación en el reactor de 3 litros.

Tabla 8.5: Descripción y volúmenes al inicio y término de la operación en el reactor de 3 [L].

Nombre	Descripción	Inicio [L]
F2	Inóculo	0,3
F3	Medio de cultivo	2,7
F4	Caldo de cultivo	3

■ Ecuaciones y supuestos

Para la realización del balance de masa en el reactor, se consideraron los mismos supuestos que para la preparación del inóculo en el matraz, salvo por la siguiente excepción:

- Se considera que la concentración de biomasa alcanzada en el reactor es de 7,5 [g/L] [118], pues de esta forma se conserva la fase exponencial del cultivo y la sacarosa remanente al término de la operación es baja (Ver Anexo B).

La metodología utilizada para la estimación de cálculos es análoga a la llevada a cabo para el matraz, obteniéndose las composiciones al inicio y final de la operación, las cuales se muestran a continuación en la Tabla 8.6.

Tabla 8.6: Composición másica y caracterización al inicio y término de la operación en el reactor de 3 litros.

Nombre	Biomasa [g]	Medio de cultivo [g]
F2	1,8	298,2
F3	-	2.700
F4	22,5	2.977,5

c) Producción en Reactor de 30 litros

Se realiza la etapa de producción en un reactor de 30 litros a partir de la biomasa generada en el reactor de 3 litros previo, más la adición de medio de cultivo. Esta propagación se realiza en dos etapas, una inicial *batch* en donde se alcanza cierta concentración de biomasa, y una posterior correspondiente a *fed-batch*, en la cual se adiciona la fuente de carbono con el fin incrementar aún más la masa de microorganismos.

■ Esquema del proceso

En la Figura 8.5 se aprecia el diagrama asociado a la etapa de producción en el reactor de 30 litros.

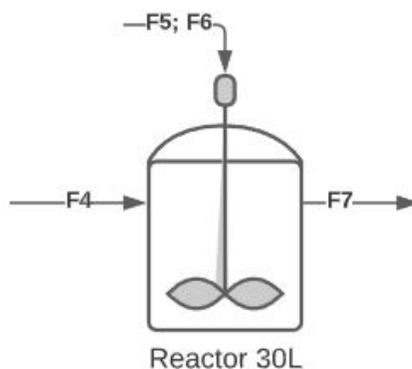


Figura 8.5: Diagrama reactor de 30 litros. F5 corresponde al ingreso de medio de cultivo para la operación *batch*, y F6 es el flujo de fuente de carbono adicionado durante la operación *fed-batch*.

■ Datos

La operación en el reactor de 30 litros consta de una etapa inicial de carácter *batch*, la cuál ocupa un volumen de 10 litros. En este caso la concentración final a alcanzar se presenta en la Tabla 8.7.

Tabla 8.7: Concentración final en reactor de 30 litros.

Parámetros	Valor	Unidad	Referencia
Concentración final de biomasa (x_f)	7,8	[g/L]	En este trabajo

En la Tabla 8.8 se muestran los volúmenes al inicio de la operación *batch* en el reactor de 30 litros.

Tabla 8.8: Descripción de entradas al inicio de la operación *batch* en el reactor de 30 litros.

Nombre	Descripción	Inicio [L]
F4	Inóculo (proveniente del reactor anterior)	3
F5	Medio de cultivo	7

■ Ecuaciones y supuestos

Para la realización del balance de masa en el reactor, se consideraron los mismos supuestos que para el reactor previo y el matraz, salvo por lo siguiente:

- La operación *batch* considera un volumen de 10 litros, donde la concentración de biomasa alcanzada en el reactor es de 7,8 [g/L], conservando la fase exponencial

del cultivo y además, asegurando que la sacarosa remanente en el equipo sea baja (Ver Anexo B), de modo que cuando se inicie la operación *fed-batch*, adicionando el sustrato concentrado, la concentración de este en el equipo no supere los 30 [g/L] para evitar inducir la generación de alginato.

Análogo a los equipos anteriores, se realizan los cálculos, obteniéndose las composiciones al inicio y final de la operación *batch*, las cuales se muestran en la Tabla 8.9.

Tabla 8.9: Composición másica y caracterización al inicio y término de la operación *batch* en el reactor de 30 litros.

Nombre	Biomasa [g]	Medio de cultivo [g]
F4	22,5	2.977,5
F5	-	7.000
<i>Batch</i>	78	9.922

Posterior a la operación *batch*, el equipo inicia una etapa *fed-batch* hasta alcanzar la biomasa requerida. Para la realización del balance de masa en esta etapa, se requieren los datos presentados en la Tabla 8.10.

Tabla 8.10: Datos utilizados para el balance de masa en operación *fed-batch* en el reactor de 30 litros.

Parámetros	Valor	Unidad	Referencia
Volumen inicial (V_0)	10	[L]	En este trabajo
Concentración inicial de biomasa (x_0)	7,8	[g/L]	Tabla 8.7
Masa final de microorganismos (X_f)	463	[g]	Base de cálculo

■ Ecuaciones y supuestos

Para la realización del balance de masa, se consideraron los siguientes supuestos:

- El sistema considera una operación *fed-batch*, esto indica que existe un flujo de entrada de fuente de carbono, pero que no existen salidas. Además, se supone una agitación constante, asegurando una mezcla homogénea.
- Se asume que la alimentación es estéril, por lo que no ingresa biomasa ($x_{in} = 0$). El ingreso de la fuente de carbono será exponencial, con el fin de mantener el valor de la tasa específica de crecimiento (μ) constante durante la operación. Además, la concentración de la fuente de carbono en la alimentación será de 45 [g/L] de sacarosa, con el fin de que el volumen adicionado más el volumen del equipo sean de alrededor de 30 [L] y de esta forma, se alcancen concentraciones de biomasa del orden de los 15 - 15,6 [g/L], que corresponden a los valores más altos reportados en bibliografía [101].

- Se supone que toda la fuente de carbono que se alimenta al fermentador es consumida para la producción de biomasa. Es decir, se desprecian los requerimientos para mantención de los microorganismos y se asume que no existe generación de productos. Esto último se sustenta en que se mantienen concentraciones de la fuente de carbono en el medio de cultivo bajas (igual o menor a 30 g/L), por lo que no se alcanza a inducir la generación de alginato [101].
- Se asume que la densidad al inicio y al final de la operación es constante e igual a la del agua, asociado a la alta concentración esta (sobre el 99 %).
- Por último, se considera el crecimiento de los microorganismos en su fase exponencial, por lo tanto se asume la muerte celular despreciable ($\alpha = 0$).

El balance global en el equipo esta dado por la Ecuación 8.5.

$$F^{in} \cdot \rho^{in} - F^{out} \cdot \rho^{out} = \frac{d(\rho \cdot V)}{dt} \quad (8.5)$$

Considerado que existe una entrada de fuente de carbono, pero no salidas del sistema ($F^{out} = 0$), se obtiene:

$$F^{in} \cdot \rho^{in} = \frac{d(\rho \cdot V)}{dt}$$

Se asume densidad constante en el equipo, obteniéndose que el volumen varía con el tiempo, como se muestra a continuación:

$$F^{in} = \frac{dV}{dt}$$

El balance para la biomasa en el equipo, se presenta en la Ecuación 8.6, donde la notación $x \cdot V$ equivale a X , con x igual a concentración y X igual a la masa de microorganismos.

$$F \cdot x_{in} + \mu \cdot x \cdot V - \alpha \cdot x \cdot V = \frac{d(x \cdot V)}{dt} = \frac{dX}{dt} \quad (8.6)$$

Considerando los supuestos mencionados anteriormente ($\alpha \ll \mu$ y $x_{in} = 0$), se simplifica la Ecuación 8.6.

$$\mu \cdot x \cdot V = \frac{d(x \cdot V)}{dt} = \frac{dX}{dt}$$

Considerando $X = x \cdot V$, se obtiene la siguiente expresión, que al ser integrada da origen a la Ecuación 8.7.

$$\mu \cdot X = \frac{dX}{dt}$$

$$\ln \frac{X_f}{X_o} = \mu \cdot t \quad (8.7)$$

Donde X_o es igual a la masa de bacterias al inicio de la operación *fed-batch*.

Como se conoce la cantidad de biomasa inicial y la final (la que se desea alcanzar), entonces es posible determinar la duración de esta etapa.

$$t = \ln\left(\frac{X_f}{X_o}\right) \cdot \frac{1}{\mu}$$

$$t = \ln\left(\frac{469,26 [g]}{78 [g]}\right) \cdot \frac{1}{0,11 [h]} = 15,67 [h]$$

Por otro lado, a partir de la Ecuación 8.7, es posible estimar la cantidad de biomasa que se genera (X_g), de acuerdo a la Ecuación 8.8.

$$X_f = X_o \cdot e^{\mu \cdot t} = X_o + X_g \quad (8.8)$$

La cantidad de biomasa final requerida (X_f) es conocida y determinada en la base de cálculo, mientras que previamente se obtuvieron las condiciones de término del *batch*. Con esto, es posible estimar la cantidad de de biomasa que debe generarse en la operación *fed-batch*.

$$X_g = X_f - X_o$$

$$X_g = 463,26 [g] - 78 [g] = 385,26 [g]$$

Si se considera que todo el sustrato adicionado es utilizado para la producción de biomasa, se obtiene la Ecuación 8.9.

$$X_g = V \cdot s_{in} \cdot Y_{x/y} \quad (8.9)$$

A partir de esta expresión es posible determinar el volumen adicionado durante la operación.

$$V = \frac{385,26 [g]}{45 [g/L] \cdot 0,413 [g/g]} = 20,7 [L]$$

De esta forma el volumen inicial más el volumen adicionado es igual a 30,7 [L]. Para determinar el flujo al que se debe alimentar el sustrato al equipo, se igualan las ecuaciones 8.8 y 8.9, obteniéndose la siguiente expresión:

$$V = \frac{X_o \cdot (e^{\mu \cdot t} - 1)}{s_i \cdot Y_{x/y}} = K_v \cdot (e^{\mu \cdot t} - 1)$$

Donde K_v es la constante de volumen, equivalente a $\frac{X_o}{s_i \cdot Y_{x/y}}$, cuyo valor es: 4,19 [L].

Como el flujo dentro del equipo corresponde a la variación de volumen en el tiempo, entonces es posible derivar la expresión anterior, obteniendo el flujo.

$$F = \frac{dV}{dt} = \mu \cdot \frac{X_o}{s_i \cdot Y_{x/y}}$$

$$F = \mu \cdot K_v \cdot e^{\mu \cdot t}$$

En este caso, la expresión que rige la alimentación de sustrato corresponde a:

$$F = 0,476 \cdot e^{0,11 \cdot t} \text{ [L/h]}$$

Graficando el flujo de alimentación de sustrato, se obtiene la curva de alimentación exponencial mostrada en la Figura 8.6.

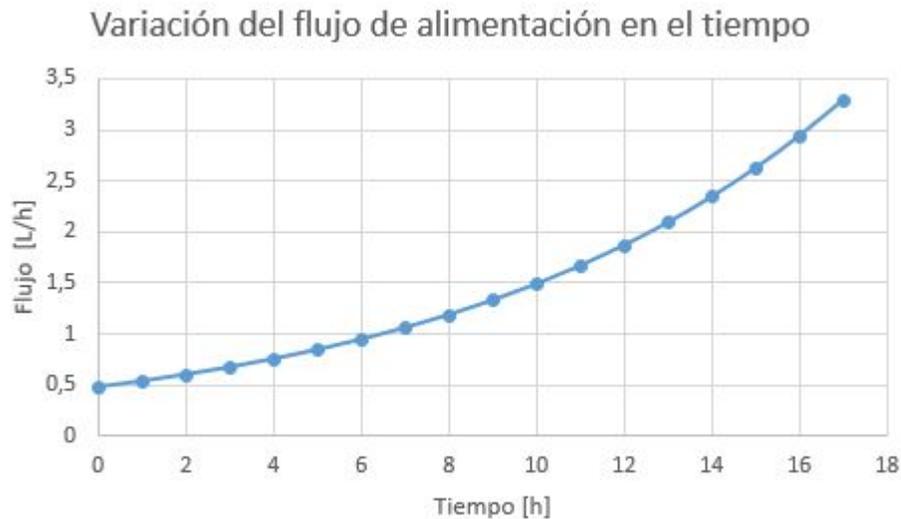


Figura 8.6: Variación del flujo de alimentación de sustrato en el tiempo.

Considerando todos los datos calculados previamente, se obtienen los valores al término de la operación *fed-batch* mostrados en la Tabla 8.11.

Tabla 8.11: Composición y caracterización de las corrientes al inicio y término de la operación *fed-batch* en el reactor de 30 litros.

Corriente	Biomasa [g]	Medio de cultivo [g]
<i>Batch</i>	78	9.922
F6	-	20.700
F7	463	30.237

8.1.2. Cultivo de *Azospirillum lipoferum*

Para el cultivo de *Azospirillum lipoferum* se considera un procedimiento análogo que para *Azotobacter chroococcum* pero con los parámetros de crecimiento específicos para esta bacteria, los cuales se presentan a continuación en la Tabla 8.12.

Tabla 8.12: Parámetros cinéticos de *Azospirillum lipoferum*.

Parámetros	Valor	Unidad	Referencia
Velocidad específica de crecimiento (μ)	0,13	[1/h]	[98]
Rendimiento de sustrato en células ($Y_{x/y}$)	0,504	[g/g]	[98]

A diferencia de *Azotobacter chroococcum*, *Azospirillum lipoferum* tiene un rendimiento mayor de sustrato en células, por lo que es posible alcanzar mayor masa de células por masa de sustrato. Es por esto que las concentraciones finales alcanzadas en cada etapa para este microorganismo, difieren de las anteriores. El valor de las concentraciones finales asumidas en este trabajo se presentan en la Tabla 8.13.

Tabla 8.13: Concentraciones finales alcanzadas en las etapas de fermentación por *Azospirillum lipoferum*.

Parámetro	Matraz 300 ml	Reactor 3L	Reactor 30L (<i>Batch</i>)
Concentración final de biomasa (x_f) [g/L]	6	9,7	10

Para la realización del balance de masa, se consideran los mismos supuestos que para *Azotobacter chroococcum*, salvo por la siguiente excepción para la operación *fed-batch*:

- Se determina que la alimentación de la fuente de carbono será exponencial, con el fin de mantener el valor de la tasa de crecimiento (μ) constante durante la operación. Además la concentración de la fuente de carbono en la alimentación será de 35 [g/L] de glucosa, con el fin de que el volumen adicionado más el volumen del equipo sea de alrededor de 30 [L] y de esta forma, se alcancen concentraciones de biomasa del orden de los 15 [g/L], que corresponden a los valores más altos reportados en bibliografía [98].

Análogo al caso de *Azotobacter chroococcum*, se realizan los balances para *Azospirillum lipoferum*. En este caso el volumen adicionado es de 20,7 [L], alcanzándose un volumen final de 30,7 [L] en un tiempo de 11,9 horas, donde el flujo de alimentación de la fuente de carbono es el que se muestra a continuación.

$$F = 0,73 \cdot e^{0,13 \cdot t} \text{ [L/h]}$$

En la Tabla 8.14 se muestra el resultado del balance de masa para las entradas y salidas de cada una de las etapas de fermentación.

Tabla 8.14: Composición y caracterización de las corrientes al inicio y término de cada una de las fermentaciones de *Azospirillum lipoferum*.

Corriente	Biomasa [g]	Medio de cultivo [g]
S1'	0,18	29,82
F1'	-	270
F2'	2,3	297,7
F3'	-	2.700
F4'	29,1	2.970,9
F5'	-	7.000
<i>Batch</i> '	100	9.900
F6'	-	20.600
F7'	463	30.137

8.1.3. Esterilización

Para el proceso de producción de bioinoculantes, se considera la esterilización de matraces, reactores de 3 litros con sus medios de cultivo, y fuentes de carbono en un autoclave, por lo que se determinarán los requerimientos de vapor sólo para la esterilización de los reactores de 30 litros con el medio de cultivo para la operación *batch* en su interior. Se considera una esterilización discontinua dentro de los equipos, para la cual se alimenta vapor con las características mostradas en la Tabla 8.15, procedente de una caldera.

Tabla 8.15: Características del vapor de caldera.

Parámetro	Valor	Unidad
L_{vap}	2.202	[kJ/kg]
Presión	2	bar
Temperatura	121	° C

Para determinar la cantidad de vapor necesaria, es necesario realizar un balance de energía al sistema, determinando el calor necesario para calentar el medio de cultivo a la temperatura de esterilización y luego el calor requerido para mantener la temperatura dentro del equipo. El calor necesario para calentar el medio de cultivo se determina con la Ecuación 8.10

$$Q = m \cdot C_p \cdot (T_f - T_i) \quad (8.10)$$

Donde:

- m : Masa de medio de cultivo a esterilizar [kg].
- C_p : Calor específico del medio de cultivo [kJ/kg · °C].
- T_f : Temperatura de esterilización [°C].
- T_i : Temperatura inicial del medio de cultivo [°C].

Los datos requeridos y el calor necesario para elevar la temperatura hasta los 121 °C se muestran a continuación en la Tabla 8.16. Es importante considerar que como el medio está compuesto en más de un 90 % por agua, se utiliza el calor específico de esta en estado líquido. Además, como la presión que se genera dentro del equipo es mayor a la atmosférica, el medio puede ser calentado sin cambiar su fase.

Tabla 8.16: Características de fluidos a calentar.

Parámetro	R30	R30'	Unidad
C_p medio de cultivo	4,18		[kJ/kg · °C]
T_i	15		°C
T_f	121		°C
Masa medio de cultivo	7	7	[kg]
$Q_{calentamiento}$	3.101,6	3.101,6	[kJ]

Para la etapa de mantención, se estima que la cantidad de vapor requerida es tres veces la indicada para la fase de calentamiento [119], para asegurar la esterilización no sólo del medio de cultivo, sino que del equipo completo. Una vez que los reactores están esterilizados se dejan enfriar a temperatura ambiente con el fin de ahorrar en consumo y gasto de agua.

Para estimar la masa de vapor requerida para el calentamiento y mantención de cultivos, se utiliza la ecuación 8.11.

$$Q = m \cdot L_{vap} \quad (8.11)$$

Reemplazado con los valores presentados en las Tablas 8.15 y 8.16, se obtienen el requerimiento de vapor, el cual se presenta en la Tabla 8.17.

Tabla 8.17: Cantidades de vapor requeridas para la esterilización.

Parámetro	R30	R30'	Unidad
Masa vapor calentamiento	1,4	1,4	[kg]
Masa vapor mantención	4,1	4,1	[kg]
Total	11		[kg]

8.2. Etapa de concentración del cultivo celular

8.2.1. Centrífuga tubular

A esta etapa ingresan de manera diferenciada los flujos que contienen el caldo de cultivo de cada una de las líneas de procesamiento, compuestos por los microorganismos y medios de cultivos usados. El objetivo de esta etapa es disminuir la cantidad de líquido, obteniendo un sedimento compuesto mayormente por microorganismos, además de una corriente de sobrenadante compuesta casi totalmente por el medio de cultivo usado, y una pequeña fracción microorganismos que no pudieron ser separados.

■ Esquema del proceso

Las corrientes que son parte del proceso se esquematizan en la Figura 8.7.

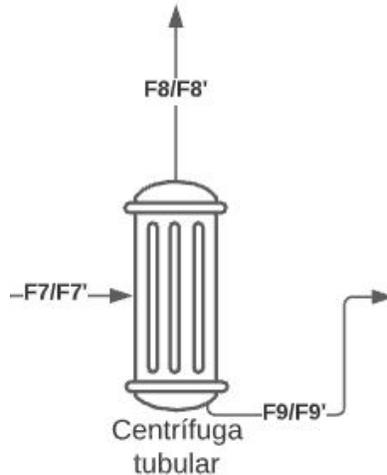


Figura 8.7: Diagrama de la etapa de centrifugado.

■ Datos

Para la realización del balance de masa en la centrífuga, se utilizan los datos presentados a continuación en la Tabla 8.18.

Tabla 8.18: Datos utilizados para el balance de masa de la centrífuga

Parámetro	Valor	Unidad	Referencia
Volumen a tratar ($V_i n$)	30,7/30,6	[L]	Sección 8.1
Humedad de lodo (w)	0,7	[-]	[120, 121]
Eficiencia de separación de microorganismos (η)	0,9	[-]	[85]

En la Tabla 8.19 se muestran las corrientes que ingresan y salen de la centrífuga tubular.

Tabla 8.19: Descripción de entradas y salidas de la centrífuga tubular.

Nombre	Descripción
F7/F7'	Caldo de cultivo
F8/F8'	Sobrenadante
F9/F9'	Sedimento

■ Ecuaciones y supuestos

Para el balance de masa en la centrífuga se consideraron los siguientes supuestos:

- Cada uno de los caldos de cultivo será centrifugado de manera independiente, incluyendo una etapa de descarga del sedimento y de limpieza del equipo, antes del cambio de microorganismo, con el fin de evitar la mezcla anticipada de estos.
- Se considera que la eficiencia de separación para las bacterias es análoga a la obtenida por centrífugas tubulares para la separación de *Lactobacillus rhamnosus*, es decir un 90%. Esto se fundamenta en que los tres géneros *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Lactobacillus* poseen densidades y tamaños similares, los cuales varían entre 1 y 2 $[\mu m]$ [122] [123] [124].
- Se asume que el lodo obtenido en la descarga de sólidos tiene una humedad del 70%, correspondiente al valor reportado para centrífugas tubulares tratando microorganismos, además es la humedad característica que se obtiene mediante centrifugación en levaduras panificadoras [120, 121].

En primer lugar, dado que se considera una separación de un 90% para los microorganismos, entonces la masa de estos que sedimenta $F_9 \cdot x_{Microorganismos,9}$ se calcula mediante la Ecuación 8.12.

$$F_9 \cdot x_{Microorganismos,9} = \eta \cdot F_7 \cdot x_{Microorganismos,7} \quad (8.12)$$

Reemplazando los valores de la Tabla 8.18, se obtiene lo siguiente:

$$F_9 \cdot x_{Microorganismos,9} = 0,9 \cdot 463 [g] = 416,7 [g]$$

Por otro lado, se considera una humedad del 70% para la torta (sedimento), por lo que la masa de agua en esta se calcula con la Ecuación 8.13.

$$F_9 \cdot x_{Medio,9} = \frac{w \cdot F_9 \cdot x_{Microorganismos,9}}{(1 - w)} \quad (8.13)$$

Reemplazando con los valores de la Tabla 8.18, se obtiene:

$$F_9 \cdot x_{Medio,9} = \frac{0,7 \cdot 416,7 [g]}{(1 - 0,7)} = 972,3 [g]$$

Para estimar la composición del sobrenadante, se realiza un balance para los microorganismos, donde:

$$F_7 \cdot x_{Microorganismos,7} = F_8 \cdot x_{Microorganismos,8} + F_9 \cdot x_{Microorganismos,9}$$

Reordenando y reemplazando con los valores conocidos, se obtiene la masa de microorganismos:

$$F_8 \cdot x_{Microorganismos,8} = 463 [g] - 416,7 [g] = 46,3 [g]$$

Se realiza análogamente para el medio, obteniéndose:

$$F_8 \cdot x_{Medio,8} = 30.237 [g] - 972,3 [g] = 29.264,7 [g]$$

En la Tabla 8.20 se muestra el resultado del balance de masa para *Azotobacter chroococcum*, incluyendo las corrientes de entrada, sobrenadante y sedimento de la centrífuga tubular.

Tabla 8.20: Composición y caracterización de las corrientes de la operación de la centrífuga tubular para *Azotobacter chroococcum*.

Corriente	Biomasa [g]	Medio de cultivo [g]
F7	463	30.237
F8	46	29.265
F9	417	972

Para el caso de *Azospirillum lipoferum*, el procedimiento es análogo, obteniéndose las corrientes presentadas a continuación en la Tabla 8.21.

Tabla 8.21: Composición y caracterización de las corrientes de la centrífuga tubular para *Azospirillum lipoferum*.

Corriente	Biomasa [g]	Medio de cultivo [g]
F7'	463	30.137
F8'	46	29.165
F9'	417	972

8.3. Etapa de Formulación

8.3.1. Liofilizador

A esta etapa ingresan los sedimentos obtenidos en las centrifugaciones de los caldos de cultivo de ambos microorganismos, los cuales pasan a un proceso de congelación y sublimación que busca eliminar gran parte del agua presente, con el fin de reducir el volumen, facilitar el almacenamiento y aumentar la viabilidad del producto [52]. Ambas tortas serán posicionadas en bandejas diferenciadas y una vez que el producto esté liofilizado, se procederá a la mezcla (en igual proporción) de los microorganismos, para dar origen al producto final.

- **Esquema del proceso**

Las corrientes que son parte del proceso se presentan en la Figura 8.8.

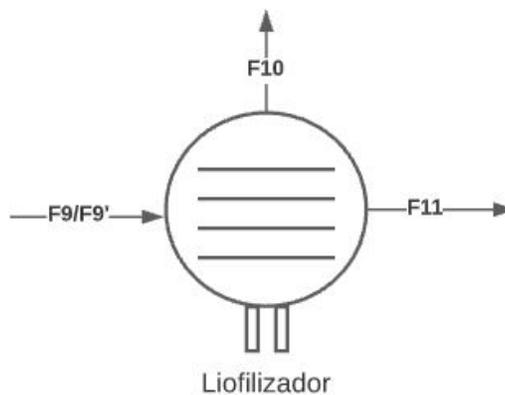


Figura 8.8: Diagrama etapa de liofilización.

- **Datos**

Para el balance de masa en el liofilizador, se utilizan los datos presentados en la Tabla 8.22, además de la caracterización de las corrientes mostrada en la Tabla 8.23.

Tabla 8.22: Datos utilizados para el balance en la etapa de liofilización.

Parámetro	Valor	Unidad	Referencia
Masa a tratar ($M_i n$)	2.778	[g]	Tablas 8.20 y 8.21
Humedad del producto liofilizado (w_l)	0,03	[-]	[125]

Tabla 8.23: Descripción de corrientes en la operación del liofilizador.

Nombre	Descripción
F9 + F9'	Tortas
F10	Agua retirada
F11	Producto liofilizado

■ **Ecuaciones y supuestos**

Para el balance de masa del liofilizador se considera el siguiente supuesto:

- Se asume que una vez realizada la etapa de liofilización, el producto generado tiene una humedad de un 3%. Esto se sustenta en las especificaciones declaradas en el documento “Manual de biofertilizantes”, en donde se especifica el contenido de humedad en bacterias fijadoras de nitrógeno liofilizadas [125].

En primer lugar, sólo el agua es removida desde la torta, por lo que la masa de microorganismos (peso seco) que permanece en la bandeja de liofilización no varía. Respecto a la cantidad de agua en el producto final, se considera una humedad del 3%, por lo que la masa de agua (medio), se calcula con la Ecuación 8.14.

$$F_{11} \cdot x_{Medio,11} = \frac{w_l \cdot F_{11} \cdot x_{Microorganismos,11}}{(1 - w_l)} \quad (8.14)$$

Reemplazando con los valores de la Tabla 8.22, se obtiene:

$$F_{11} \cdot x_{Medio,11} = \frac{0,03 \cdot 833,4 [g]}{(1 - 0,03)} = 25,8 [g]$$

Lo anterior significa que el resto del agua inicial fue retirada de la torta en la corriente de agua sublimada, es decir:

$$F_{9+9'} \cdot x_{Medio,9+9'} = F_{10} \cdot x_{Medio,10} + F_{11} \cdot x_{Medio,11}$$

Reordenando y reemplazando, se obtiene la masa de agua en la corriente F_{10} :

$$F_{10} \cdot x_{Medio,10} = 1.944,6[g] - 25,8 [g] = 1.918,8 [g]$$

Las composiciones al inicio y al finalizar la operación, se muestran en la Tabla 8.24.

Tabla 8.24: Composición de las corrientes del liofilizador.

Corriente	Biomasa [g]	Medio de cultivo [g]
F10	833,4	1944,6
F11	-	1918,8
F12	833,4	25,8

De esta forma, al considerar que la viabilidad de los microorganismos luego de esta etapa es de un 80%, entonces se tiene la masa de microorganismos viables requerida de acuerdo a la base de cálculo establecida.

Capítulo 9

Diseño y selección de equipos

En el presente capítulo se diseñan los equipos principales del proceso, determinando sus parámetros característicos para la posterior selección de equipos comerciales, determinando costos y requerimientos energéticos que serán considerados en la evaluación económica.

9.1. Equipos principales

9.1.1. Fermentadores

Para la generación del inóculo, se sugieren matraces de un litro de capacidad, donde el volumen de ocupación es del 30 %, evitando rebosamientos y facilitando su manipulación. Los fermentadores de 3 y 30 litros se dimensionan indicando altura, diámetro e impulsores, además, se establece la aireación, agitación y tiempo de operación de cada equipo.

▪ Datos

Para dimensionar los reactores se consideran los valores de la Tabla 9.1.

Tabla 9.1: Parámetros de diseño para los fermentadores.

Parámetro	Valor	Unidad	Referencia
Volumen	0,003 / 0,03	$[m^3]$	Balance de masa
Factor de Diseño	1,4	-	[126]
Velocidad específica de crecimiento (μ) (<i>Azotobacter chroococcum</i>)	0,11	$[1/h]$	[101]
Velocidad específica de crecimiento (μ) (<i>Azospirillum lipoferum</i>)	0,13	$[1/h]$	[98]
Relación altura: diámetro del reactor	1:1 / 2:1	Adimensional	[126]
Relación diámetro estanque/ diámetro impeler	3	Adimensional	[126]
Factor de conversión (gc)	9.8	$[kg \cdot m / kgf \cdot s^2]$	-

■ **Ecuaciones y supuestos**

Para el dimensionamiento de los fermentadores, se consideran los siguientes supuestos:

- Los equipos utilizados corresponden a reactores con agitación constante, para los cuales se considera un factor de diseño de 1,4 [126], con el fin de asegurar que con la agitación no se generen rebalses del caldo de cultivo.
- Para los fermentador de 3 litros, se considera una relación altura (H)/diámetro (D) igual a 1, mientras que para los fermentadores de 30 litros esta relación es de 2 [126]. Además, para todos los fermentadores se utiliza una relación diámetro del tanque (D)/diámetro del impeler (DI) igual a 3 [126].
- Para los reactores de 3 litros se consideran dos impulsores con paletas, mientras que para los de 30 litros, se definen tres impulsores equidistantes [127]. La distancia de los impulsores al final del recipiente (C) sigue una relación 1:3 con el diámetro del equipo (D), mientras que para la distancia superior (A), la razón es 1:1 con respecto a el diámetro del impeler (DI) [127].
- Para el cálculo del número de potencia en el diseño del agitador, se asume un régimen turbulento dentro del equipo, para asegurar una mezcla adecuada para la reacción (Reynolds del orden de 10^5). Además, se considera un agitador tipo Turbina Rushton, común en producciones biológicas [126].

■ **Tiempos de fermentación**

Para determinar los tiempos de fermentación durante las operaciones *batch*, se utiliza la Ecuación 8.4 (Capítulo 8), donde x_0 es igual a la concentración de biomasa al inicio de la operación y μ la velocidad específica de crecimiento de cada microorganismo.

$$x = x_0 \cdot e^{\mu \cdot t}$$

A partir de la expresión anterior, se obtiene la Ecuación 9.1 para determinar los tiempos de fermentación en los reactores de 3 [L], y los tiempos de operación *batch* en los reactores *fed-batch*. Los valores obtenidos (Tabla 9.2) coinciden con los reportados para medios de cultivo y condiciones de operación similares [101] [98]. De igual forma, se estiman los tiempos de operación en los matraces, siendo 20,3 y 19,7 [h], respectivamente.

$$t = \ln\left(\frac{x}{x_0}\right) \cdot \frac{1}{\mu} \tag{9.1}$$

Tabla 9.2: Tiempos de fermentación *batch* en reactores de 3 y 30 litros.

Microorganismos	Tiempo de operación <i>batch</i> [h]	
	Reactor de 3 Litros	Reactor de 30 Litros
<i>Azotobacter chroococcum</i>	22,2	10,9
<i>Azospirillum lipoferum</i>	19,8	9,6

Una vez que culminan las operaciones *batch*, se da inicio a las operaciones *fed-batch*, dónde el sustrato es alimentado de manera exponencial a los reactores. El tiempo de alimentación del sustrato se determinó previamente en el capítulo 8, y corresponde a 15,7 horas para el caso de *Azotobacter chroococcum* y 11,9 horas para *Azospirillum lipoferum*. Considerando esto, el tiempo total de operación en los fermentadores (operación *batch* más *fed-batch* en reactores de 30 [L]), se presenta a continuación en la Tabla 9.3.

Tabla 9.3: Tiempo total de fermentación en reactores de 3 y 30 litros.

Microorganismos	Tiempo de operación <i>batch</i> [h]	
	Reactor 3 Litros	Reactor de 30 litros
<i>Azotobacter chroococcum</i>	22,2	26,6
<i>Azospirillum lipoferum</i>	19,8	21,5

■ Dimensiones de fermentadores

Se determinan las dimensiones de los equipos asumiendo una geometría cilíndrica, con:

$$V_{reactor} = \pi \cdot r^2 \cdot h \quad (9.2)$$

Trabajando la expresión anterior y considerando las relaciones entre la altura y diámetro de los fermentadores (Ver Tabla 9.1), se obtiene la Ecuación 9.3 para los reactores de 3 litros y la Ecuación 9.4 para los reactores de 30 litros.

$$r = \sqrt[3]{\frac{V_{reactor}}{2 \cdot \pi}} \quad (9.3)$$

$$r = \sqrt[3]{\frac{V_{reactor}}{4 \cdot \pi}} \quad (9.4)$$

Para el dimensionamiento se considera el volumen de diseño, el que corresponde al volumen del caldo de cultivo, multiplicado por el factor de diseño, dando como resultado fermentadores con un volumen total de 4,2 litros y 43 litros. A partir las Ecuaciones 9.3 y 9.4, y las relaciones anteriores, se obtienen las dimensiones de la Tabla 9.4, cuya nomenclatura se explicita en la Figura 9.1.

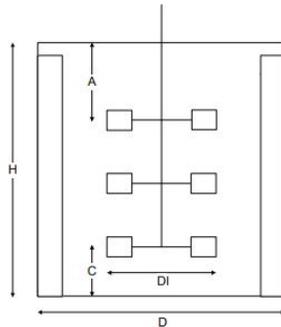


Figura 9.1: Nomenclatura para dimensiones del fermentador.

Tabla 9.4: Dimensiones principales de fermentadores.

Parámetro	Dimensiones [m]	
	Reactor 3 Litros	Reactor de 30 litros
Altura (H)	0,18	0,6
Diámetro (D)	0,18	0,3
Diámetro impeler (DI)	0,06	0,1
Distancia superior (A)	0,06	0,1
Distancia inferior (C)	0,06	0,1
Distancia superior tercer impeler	-	0,3

■ Agitación

Para determinar la potencia requerida para alcanzar una mezcla homogénea dentro de los fermentadores, se utiliza la Ecuación 9.5.

$$N_p = \frac{P_0 \cdot g_c}{N^3 \cdot D_a^5 \cdot \rho} \quad (9.5)$$

Donde:

- P_0 : Potencia externa entregada por el agitador [$\frac{kgf \cdot m}{s}$].
- g_c : Factor de conversión = $9.8[\frac{kg \cdot m}{kgf \cdot s^2}]$.
- N_p : Número de potencia (adimensional).
- N : Velocidad de rotación de las aspas [rps].
- D_a : Diámetro de las aspas [m].
- ρ : Densidad de la mezcla [$\frac{kg}{m^3}$].

El diámetro de las aspas se obtiene a partir de las correlaciones mostradas en la Tabla 9.1, el cual equivale a: $D_a = \frac{D_{equipo}}{3}$. La velocidad de rotación de las aspas sugerida por bibliografía, es de 205 [rpm] para los fermentadores de 3 litros y 130 [rpm] para los de 30 litros [126], lo que equivale a 3,4 y 2,2 [rps], respectivamente.

La densidad de la mezcla se asume igual a la del agua ($1.000 [\frac{kg}{m^3}]$), considerando que esta comprende casi el 99% del contenido (Ver capítulo 8). El número de potencia es igual a 5, asumiendo un agitador de tipo turbina Rushton y régimen turbulento (Reynolds del orden de 10^5), el cual es obtenido a partir del gráfico de la Figura 9.2.

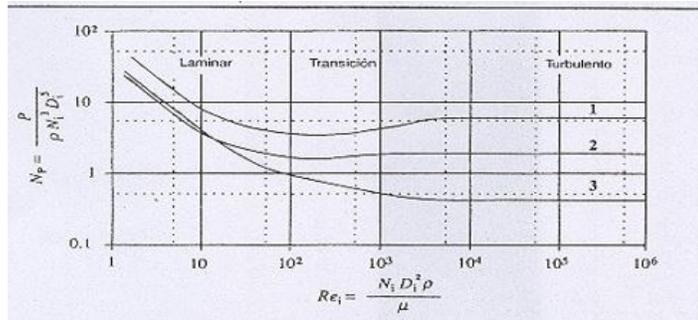


Figura 9.2: Correlación entre el número de Reynolds y de Potencia para (1) Turbina Rushton, (2) Canaleta y (3) Hélice marina [127].

Reemplazando en la Ecuación 9.5, se obtiene la potencia de agitación para los reactores.

Tabla 9.5: Potencia de agitación requerida por los fermentadores.

Equipo	Potencia requerida	
	Potencia [$kgf/m \cdot s$]	Potencia [kW]
Reactor 3 Litros	0,014	$1 \cdot 10^5$
Reactor 30 Litros	0,053	$5,3 \cdot 10^5$

■ Aireación

Para determinar la aireación requerida para la fermentación de los microorganismos, es necesario estimar las demandas de oxígeno y las tasas específicas de aireación.

Demanda de oxígeno

La demanda de oxígeno de los microorganismos se define por la Ecuación 9.6. Donde:

$$N_a = \frac{\mu \cdot x}{Y_{O_2}} = q_{O_2} \cdot x \quad (9.6)$$

- N_a : Velocidad de consumo de oxígeno [$mmol/L \cdot h$].
- x : Concentración de biomasa [g/L].
- q_{O_2} : Velocidad específica de consumo de oxígeno [$mmol/g \cdot h$].
- Y_{O_2} : Rendimiento de oxígeno en células [g/g].

Para el caso de ambos microorganismos, no se encuentran registradas sus fórmulas químicas, por lo que no es posible obtener de manera algebraica el valor de Y_{O_2} , además, tras una búsqueda bibliográfica no fue posible obtener un valor de q_{O_2} específico para las condiciones de cultivo. Sin embargo, como se menciona en la sección 7.1.5, tanto *Azotobacter spp.* como *Azospirillum spp.* tienen requerimientos de aireación similares, los cuales suelen ser satisfechos con tasas de aireación de 1 vvm para volúmenes cercanos a 3 litros y 0,5 vvm para volúmenes del orden de los 30 litros [106] [98].

Tasa específica de aireación

La tasa específica de aireación, expresada en volumen de aire por volumen de medio de cultivo por minuto (vvm), se determina a partir de las Ecuaciones 9.7 y 9.8.

$$vvm = \frac{Fa}{V} \quad (9.7)$$

$$vvm = \frac{Na \cdot T \cdot 22,4}{1000 \cdot N_{O_2} \cdot E \cdot \pi \cdot 273 \cdot 60} \quad (9.8)$$

Donde:

- T: Temperatura de la fermentación, [K].
- π : Presión atmosférica, igual a 1 [atm].
- N_{O_2} : Porcentaje de oxígeno en el aire alimentado, igual a 21 %.
- E: Eficiencia de absorción de oxígeno (rango establecido 3 % - 30 % [127]).

Como se mencionó previamente, no se dispone de valores que permitan su estimación directa, por lo que la demanda de oxígeno será obtenida a partir de las tasas de aireación utilizadas para estos cultivos. Se considera la temperatura de fermentación igual a 30 °C (303,15 K) y la eficiencia, para el caso del reactor de 3 litros, igual a 17 %, considerando el promedio entre el rango establecido; y para el reactor de 30 litros, al ser de carácter industrial y tener un mayor control de las variables, se considera del 30 %.

Utilizando la Ecuación 9.8, se obtiene la demanda de oxígeno para los cultivos, además, a partir de las tasas de aireación y de los volúmenes de cultivo, se determinan los flujos de aire a alimentar. Lo anterior se muestra a continuación en la Tabla 9.6, con valores similares a los esperados. La demanda de oxígeno debería estar en el rango de 60 a 120 [$mmol/L \cdot h$] para el reactor de 3 [L] y de 70 a 100 [$mmol/L \cdot h$] para el de 30 [L] [127].

Tabla 9.6: Demanda de oxígeno de los microorganismos.

Equipo	Demanda de oxígeno (Na) [$mmol/L \cdot h$]	Tasa específica de aireación (vvm) [1/min]	Flujo de aire (Fa) [L/min]
Reactor 3L	86	1	3
Reactor 30L	76	0,5	15

A partir de todos los resultados obtenidos anteriormente, se procede a la cotización de los fermentadores, la que se realizó por medio de la empresa DILACO, quien ofreció orientación respecto al equipo más conveniente para el proceso diseñado. Los biorreactores considerados tienen incorporado un sistema de control de temperatura, pH y espuma, además de un controlador para la adición de aire. Los fermentadores de 3 litros consideran un vaso de vidrio de 6,6 litros autoclavable, mientras que, para los reactores de 30 litros se incluyó un sistema de

esterilización por vapor, para realizar este proceso *in situ*, tal como se estableció previamente.

Para hacer efectivos los sistemas de control, es necesario incorporar a la cotización procesadores de datos. Particularmente se determinó la adquisición de dos procesadores, cada uno con dos licencias, para monitorear en cada línea productiva, tanto el reactor de 3 [L] como el de 30 [L] en un mismo computador, conservando la independencia de las línea de producción.

Los resultados de la cotización se muestran a continuación en las Tablas 9.7 y 9.8.

Tabla 9.7: Datos biorreactores cotizados.

Modelo	Precio [USD]	Volumen máx. de cultivo [L]	Volumen total [L]	Potencia motor [kW]
Biostat B MO 5 [L]	78.216	5	6,6	0,8
Biostat Cplus MO 30 [L] + Sist. esterilización	198.548	30	42	7,2

Tabla 9.8: Datos software requerido.

Modelo	Precio [USD]
BIOPAT MFCS4 + Segunda licencia	12.034

Para el volumen de fermentación de 3 litros, se consideró un biorreactor con capacidad de hasta 5 litros de caldo de cultivo, esta decisión se sustenta en que el equipo que precedía tenía una capacidad máxima de cultivo de 2 litros, valor que sería insuficiente para la fermentación diseñada. Por otro lado, este equipo da un margen de incremento en el volumen del caldo de cultivo, en caso de ser necesario. Para el caso específico de la fermentación de 30 litros, las dimensiones comerciales del equipo coinciden con las estimadas previamente (43 litros). Para la estimación de la potencia, se considera la calefacción del fluido (6 [kW]), más la potencia intrínseca requerida para la operación del equipo (1,2 [kW]).

Los valores indicados en ambas tablas, corresponden al precio por equipo y por software, por lo que para el caso propuesto, estos valores deben multiplicarse por dos, considerando las líneas de procesamiento de cada microorganismo.

9.1.2. Centrífuga tubular

Esta etapa busca disminuir la cantidad de líquido presente en los caldos de cultivo provenientes de los fermentadores, obteniéndose como salidas: un sedimento compuesto mayormente por las bacterias con cierta humedad, y un clarificado compuesto casi totalmente por el medio de cultivo usado, más una pequeña fracción de bacterias.

■ Datos

Para el dimensionamiento de la centrífuga tubular se utilizan los datos de la Tabla 9.9.

Tabla 9.9: Datos a utilizar para el dimensionamiento de la centrífuga.

Parámetro	Valor	Unidad	Referencia
Volumen a tratar	0,03	$[m^3]$	Balance de Masa
Densidad medio de cultivo	1.000	$[kg/m^3]$	[128]
Densidad bacterias	1.050	$[kg/m^3]$	[122]
Diámetro medio bacterias	$1,75 \cdot 10^{-6}$	$[m]$	[123]
Revoluciones por minuto (rpm)	15.000	$[1/min]$	[85]
Radio interno centrífuga (R3)	0,0525	$[m]$	[129]
Radio inicio recorrido de partícula (R1)	0,02625	$[m]$	Consultado
Largo centrífuga	0,73	$[m]$	[129]
Viscosidad de la mezcla	0,001003	$[kg/m \cdot s]$	[128]
Factor de diseño	1,25	$[-]$	[130]
Gravedad	9,81	$[m/s^2]$	[131]

■ Ecuaciones y supuestos

Para el dimensionamiento de la centrífuga se toman los siguientes supuestos:

- Se considera el radio interno de una centrífuga tubular utilizada para la separación de microorganismos de caldos de cultivos y que cuenta con una cámara de retención de sólidos de hasta 4 litros. En este caso se genera casi litro y medio (1,4 [L]) de sedimento para cada microorganismo, por lo que la elección se considera apropiada. El valor del radio interno de la centrífuga entregado por el proveedor es de 52,5 [mm], considerando que el diámetro interno del equipo es de 105 [mm], además, la altura de la cámara centrífuga es de 0,73 [m] [129].
- El valor del radio menor (R_1) desde el cual inician el recorrido las partículas hasta sedimentar, fue proporcionado por el proveedor y corresponde a 26,25 [mm] (considerando un diámetro menor de 52,5 [mm]).
- La densidad de las bacterias se asume igual para ambos microorganismo y corresponde a $1.050 [kg/m^3]$ [122]. Además, se estima un diámetro promedio de 1,75 [μm], considerando que este va desde los 1,5 a 2 [μm] [123].
- Se estima la densidad y viscosidad de la solución igual a la del agua a 20°C, al estar compuesta en un 98 % por esta y al asumir despreciable la producción de alginato.

Para el dimensionamiento de este equipo, se utiliza la ecuación de diseño correspondiente a la definición del caudal Q de una centrífuga tubular (Ecuación 9.9), igual al producto de la velocidad de sedimentación de las bacterias v_g (Ecuación 9.10) y del área proyectada de sedimentación, denominada como factor Σ , específico para una centrífuga tubular (Ecuación 9.11).

$$Q = v_g \cdot \Sigma_{tubular} \quad (9.9)$$

Para estimar la velocidad de sedimentación, se utiliza la siguiente expresión:

$$v_g = \frac{d^2}{18 \cdot \mu} (\rho_s - \rho) \cdot g \quad (9.10)$$

Donde:

- d : Diámetro promedio de la partícula.
- ρ_s : Densidad de la partícula (bacterias).
- ρ : Densidad del fluido.
- μ : Viscosidad del medio.
- g : Fuerza gravitacional.

Reemplazando en la Ecuación 9.10 los valores indicados en la Tabla 9.9, se obtiene:

$$v_g = \frac{(1,75 \cdot 10^{-6} [m])^2}{18 \cdot 0.001 [kg/m \cdot s]} \cdot (1.050 - 1.000) [kg/m^3] \cdot 9.81 [m/s^2] = 8,31 \cdot 10^{-8} [m/s]$$

El área proyectada para una centrífuga tubular, se determina con la Ecuación 9.11.

$$\Sigma = \frac{2 \cdot \pi \cdot L \cdot \Omega^2 \cdot R^2}{g} \quad (9.11)$$

Donde:

- L : Largo de la cámara de centrifugación.
- g : Fuerza de gravedad.
- R : Radio característico de la centrífuga, el cual corresponde a:

$$R = \frac{R_3 + R_1}{2}$$

Donde R_3 y R_1 se aprecian a continuación en la Figura 9.3.

- Ω : Velocidad angular de rotación, la cual corresponde a:

$$\Omega = \frac{2 \cdot \pi \cdot n}{60} [rad/s]$$

Con n igual a las revoluciones por minuto (rpm).

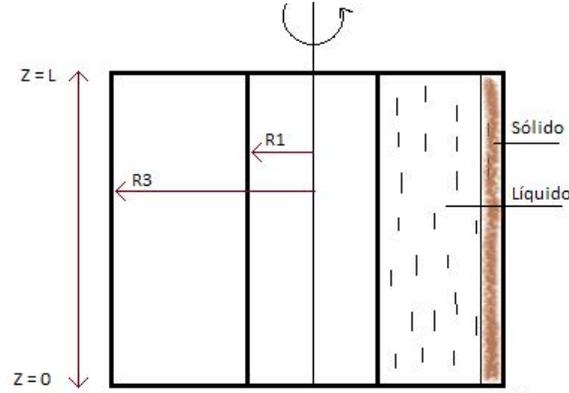


Figura 9.3: Notación de radios en una centrífuga tubular.

El radio característico de la centrífuga, considerando 105 [mm] de diámetro interno y la posición de inicio de las partículas, equivalente a un diámetro 52,5 [mm], corresponde a 0,04 [m] (40 [mm]).

Tomando en cuenta que la centrífuga opera a 15.000 [rpm], se determina la velocidad angular Ω , equivalente a 1.570,8 [rad/s]. Luego, se calcula el valor de Σ con la Ecuación 9.11.

$$\Sigma_{tubular} = \frac{2 \cdot \pi \cdot 0,73 [m] \cdot 1.570,8^2 [1/s^2] \cdot 0,04^2 m^2}{9,81 [m/s^2]} = 1,8 \cdot 10^3 [m^2]$$

A partir de lo anterior, se determina el caudal de operación de la centrífuga mediante la Ecuación 9.9.

$$Q = 1,49 \cdot 10^{-4} [m^3/s] = 535,7 [L/h]$$

Se considera un factor de seguridad de 1,25, por lo que el volumen a tratar sería de 0,038 [m³] (considerando 30,7 y 30,6 [L] de caldo de cultivo, respectivamente). Con esto, el tiempo de centrifugación de cada microorganismo es aproximadamente 5 [min].

Comparando los resultados con equipos comerciales, se encuentran centrífugas tubulares concordantes con las dimensiones propuestas y con un rango de operación de hasta 17.000 [rpm], capaces de tratar entre 300 a 1.600 [L/h], dependiendo de la concentración de sólidos [129]. Particularmente la centrífuga cotizada posee las características mostradas en la Tabla 9.10.

Tabla 9.10: Datos centrífuga tubular modelo Gq105 cotizada.

Marca	Precio [USD]	Diámetro interno [mm]	Altura [mm]	Rotación máx. [rpm]	Potencia motor [kW]
Reyes Machinery	6.980	105	730	17.000	2,2

9.1.3. Liofilizador

La etapa de liofilización elimina gran parte del agua contenida en el sedimento, dejando a los microorganismos en fase de latencia, lo que permite su almacenamiento por largos períodos (años), conservando una alta viabilidad [52] [117].

■ Datos

Para el dimensionamiento del liofilizador se consideran los parámetros bibliográficos mostrados en la Tabla 9.11.

Tabla 9.11: Parámetros de diseño para el liofilizador.

Parámetro	Valor	Unidad	Referencia
Temperatura de entrada del producto	25	[°C]	En este trabajo
Temperatura eutéctica	-30	[°C]	Estimada [132]
Temperatura mínima de la cámara de secado	-50	[°C]	[133]
Temperatura máxima sistema de calentamiento	50	[°C]	En este trabajo
Temperatura mínima del condensador	-80	[°C]	En este trabajo
Vacío máximo alcanzable (Presión mínima de la cámara)	0,01	[mbar]	Estimada [134]

■ Supuestos

Los supuestos para el dimensionamiento del liofilizador, se listan a continuación:

- Se requiere procesar alrededor de 2,78 [kg], lo que equivale a 2,65 [L] de producto (considerando la densidad de las bacterias igual a $1.050 [kg/m^3]$), sin embargo, para dejar un margen de seguridad por si a futuro se decide aumentar la producción, al momento de seleccionar el equipo, se buscará uno con una capacidad superior.
- La temperatura de entrada del producto (temperatura ambiente), se determinó acorde a las temperaturas máximas alcanzadas durante el año 2019 en Santiago de Chile, lugar dónde se espera, se sitúe el liofilizador. El valor de la temperatura promedio fue de 25 °C de acuerdo con *National Centers for Environmental Information*, Servicio Meteorológico Nacional.
- Para bacterias, se sugiere una temperatura mínima de congelamiento de -40 °C, pudiendo variar dependiendo de la especie. En este caso se determina una temperatura de congelamiento -50 °C, similar a la utilizada en alimentos [133].
- La temperatura de congelación suele ser aproximadamente 20°C por debajo de la temperatura eutéctica [135], por lo que esta última se estima en -30 °C.
- Se determina que la temperatura de los condensadores será de -80 °C (estándar), para asegurar la retención total del agua sublimada durante el proceso de liofilización.
- La temperatura del sistema de calentamiento varía dependiendo de la resistencia del producto al calor, por lo que oscila entre los 30°C a 50°C. Se selecciona una temperatura de 50°C, pues permite variar y reducirla en caso de ser necesario.

- De acuerdo a las Tabla de vapor (Anexo C) se observa que a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ y a una presión de vacío de $0,03\text{ [mbar]}$, el agua comienza a sublimar. Con el fin de garantizar vacío completo, se selecciona una presión de $0,01\text{ [mbar]}$ [134].
- Se considera la adición de un agente protector para resguardar la membrana celular y el citoplasma [52], el cual está compuesto por 20% de sacarosa + 10% de BSA (S/BSA). Esta elección se justifica en que ha sido probado en ambos géneros (*Azotobacter* y *Azospirillum*), conservando viabilidades sobre el 80% , hasta 4 semanas posteriores a la liofilización [117].

■ Diseño de la cámara de liofilización

Selección del material

Para la selección del material de construcción, se debe considerar que la cámara será sometida a bajas presiones. En el caso de la industria biotecnológica, farmacéutica y de alimentos, suele recomendarse el acero inoxidable, especialmente para las superficies que entran en contacto con los productos, donde los más recomendados suelen ser AISI 304 y AISI 316, los cuales presentan propiedades mecánicas y térmicas similares [136].

Forma de la cámara

Para determinar la forma de la cámara, se debe tomar en consideración la disponibilidad de equipos y la resistencia necesaria para soportar la diferencia de presión [137]. Comercialmente, las cámaras suelen ser cilíndricas o cúbicas, las primeras tienen como ventaja una mayor resistencia a la presión exterior (presión atmosférica máxima de 760 [mmHg]) y además, consideran una menor área de material empleado, reduciendo costos [138]. Es por esto que se selecciona una cámara cilíndrica vertical.

Tamaño de la cámara de vacío

Para determinar el tamaño, se considera la capacidad de la cámara, las características del producto, y la distribución de bandejas dentro del equipo. La cámara debe ser capaz de liofilizar $2,78\text{ [kg]}$ de torta, considerando una densidad de $1.050\text{ [kg/m}^3\text{]}$ para las bacterias [139], entonces la capacidad será de $2,65\text{ [L]}$. Idealmente, se proponía situar a las bacterias en bandejas diferenciadas, sin embargo, comercialmente los equipos cuentan con 3 niveles, por lo que se considerará esto y se ofrecerá la alternativa de generar una división dentro de una de las bandejas para evitar la mezcla anticipada de productos.

La cámara contará con 3 bandejas, las cuales deberán retener alrededor de $0,93\text{ [kg]}$. Acorde a bibliografía, espesores cercanos a $1,5\text{ [cm]}$ tardan alrededor de 24 horas en liofilizarse [117], por lo que se determina no exceder este valor, para evitar duraciones excesivas de la etapa. En base esto, se determina una altura de bandejas de 2 [cm] , dejando un margen de $0,5\text{ [cm]}$ para evitar el desborde o derrames de producto. Estos parámetros, indicados en la Tabla 9.12, permitirán dimensionar la cámara de vacío.

Tabla 9.12: Parámetros para el diseño de la cámara de vacío.

Tamaño de la cámara		
Parámetro	Valor	Unidad
Capacidad de la cámara	2,78	[kg]
Volumen asociado a 2,78 [kg] de producto	2,65	[L]
Número de niveles	3	[-]
Capacidad por nivel	0,93	[kg]
Altura de las bandejas	2	[cm]

Altura y diámetro de la cámara

La altura de la cámara será de 24 [cm] (0,24 [m]), considerando la altura de las bandejas (2 [cm]) y un espaciado de 6 [cm] entre los bordes de estas, permitiendo posicionar y retirar cómodamente el producto.

Las dimensiones de las bandejas (cilíndrica), se estiman considerando la Ecuación 9.12, donde V_p es el volumen del producto por nivel y ϵp es el espesor del producto, obteniéndose un diámetro de 0,27 [m].

$$V_p = (\epsilon p) \cdot \pi \cdot (r^2) \quad (9.12)$$

Considerando un margen de seguridad de un 10 %, para permitir la cómoda entrada y salida del sistema de bandejas en la cámara, se determina que el diámetro de la cámara será 0,3 [m].

Considerando las condiciones de cultivo y las estimaciones previas, se procedió a la cotización de liofilizadores, los cuáles debían alcanzar una temperatura de congelamiento de -50°C y tener una capacidad de al menos 2,65 [L]. El liofilizador recomendado por el proveedor (marca Labconco) es vendido y distribuido dentro del país. Posee una cámara con una capacidad de hasta 4,5 [L], lo que permitiría a futuro aumentar la producción, sin la necesidad de comprar otro equipo. Las dimensiones de la cámara son 25,4 [cm] de diámetro y una altura de 24,9 [cm], valores altamente similares a los estimados.

Junto con el equipo, se cotizaron las bandejas de liofilización y los accesorios requeridos para su funcionamiento, que corresponden a una cámara con 8 válvulas y frascos de 600 [mL]. Las características del liofilizador seleccionado se muestran en la Tabla 9.13.

Tabla 9.13: Datos liofilizador modelo LABC700401030 cotizado.

Marca	Precio [USD]	Capacidad [L]	Temperatura de congelamiento [$^\circ\text{C}$]	Material	Potencia [kW]
Labconco	14.196	4,5	-50	Acero inoxidable	2,76

El equipo seleccionado tiene una capacidad de remoción de 2,5 [L] de agua en 24 horas, por lo tanto tardará aproximadamente 18,5 horas en liofilizar el producto hasta las condiciones de humedad definidas. El proceso de liofilización, se sugiere que se lleve a cabo en las siguientes etapas: 1) -50°C durante 3 [h], 2) -4°C durante 2 [h], 3) 15°C durante 3 [h], 4) 25°C durante 4 [h] y 5) 30°C durante 6,5 [h] [117]. Se estima que para la primera etapa, la remoción de calor es de 1.144,4 [kJ] para que el producto alcance su congelación (Ver detalles de la estimación en el Anexo D).

Es importante considerar que el diseño propuesto no es el único disponible en el mercado, de hecho existen otras configuraciones que permiten un manejo del producto con mayor comodidad. Teniendo en cuenta esto, en el Anexo E se propone el diseño completo de un liofilizador con cámara cilíndrica de puerta frontal. La propuesta considera materiales, espesores, aislantes, forma de la cámara y de las tapas, bomba de vacío, etc. Inclusive, se realiza un balance de energía para el sistema completo, es decir el calor que debe ser removido de la cámara para alcanzar la temperatura deseada, incluyendo al producto, bandejas, aire y el calor cedido a través de las paredes del equipo. Por último, se establece el calor que se debe generar en las placas intercambiadoras para calentar el producto hasta la temperatura deseada.

■ Selección de la bomba de vacío

Para el funcionamiento del liofilizador seleccionado, se requiere de una bomba de vacío, cuya función es evacuar los gases no condensables de la cámara, generando la presión necesaria para que se produzca la sublimación. Además, evitar la presencia de aire previene la oxidación durante el proceso. La bomba de vacío debe ser capaz de disminuir la presión atmosférica hasta la presión de operación (0,01 [mbar]) dentro de la cámara. Para determinar qué bomba utilizar, se considera el volumen de la cámara, la presión de operación y el tiempo requerido para alcanzarla.

El volumen de la cámara corresponde a 0,017 [m³], el cual es obtenido a partir del reemplazo de los valores estimados previamente en la siguiente expresión:

$$Volumen\ cámara = \pi \cdot r^2 \cdot L$$

El tiempo requerido para que la bomba reduzca la presión de la cámara a 0,01 [mbar], se calcula mediante la Ecuación 9.13 [140], y se sugiere que no exceda los 20 [min], para que el producto no corra riesgo de descongelarse en las bandejas.

$$t = 2,3 \cdot \frac{V}{S_r} \cdot \log\left(\frac{P_1}{P}\right) \quad (9.13)$$

Donde:

- V: Volumen en litros.
- S_r : Velocidad real de aspiración [L/min] (Dato entregado por proveedor).

- P_1 : Presión inicial (Presión atmosférica de 760 [mmHg] = 1.013,24 [mbar]).
- P: Presión que se desea alcanzar en [mbar].
- t: Tiempo en minutos.

De acuerdo a los requerimientos del liofilizador cotizado, la bomba de vacío debe tener una capacidad de al menos 98 [L/min] y alcanzar un presión mínima de 0,01 [mbar]. Considerando esto y los requerimientos definidos previamente, se realiza una búsqueda y cotización de bombas de vacío que cumplan con estas condiciones. Para la estimación del tiempo de operación, se toma como referencia la bomba recomendada por el proveedor del liofilizador, la cual pertenece a la marca Labconco, con una capacidad de 117 [L/min] y que alcanza una presión de 0,002 [mbar]. Considerando este equipo, el tiempo en alcanzar el vacío es de aproximadamente 2 [min].

En la Tabla 9.14 se muestran las características de la bombas que cumplen con los requerimientos de operación. Particularmente, se selecciona la bomba Labconco, puesto que alcanza un vacío final de 0,002 [mbar], lo que asegura la sublimación del agua presente en el sedimento en aproximadamente 2 [min], tiempo que concuerda con el rango propuesto anteriormente. Además, es importante considerar que el costo de adquisición es considerablemente menor comparado con la segunda bomba cotizada.

Tabla 9.14: Especificaciones bombas de vacío.

Marca	Modelo	Máximo vacío [mbar]	Capacidad [L/min]	Tiempo [min]	Precio \$US
Vacuubrand	698143	0,01	165	5	6.930
Labconco	7739402	0,002	117	2	4.009

9.2. Equipos adicionales

9.2.1. Dosificadora y envasadora de polvos

Para envasar el biofertilizante generado, se utilizará una dosificadora de polvos de alta precisión, la cual separa el contenido y lo envasa en sobres de capacidad (volumen) ajustable. La dosificadora y envasadora de polvos, modelo SPDXDF20 AX puede operar con distintos *films* laminados que puedan ser sellados por calor como PE, PE aluminizado, BOPP/PE, Nylon/PE. La cotización fue realizada con la empresa Maspack, quienes recomendaron la máquina que se muestra en la Tabla 9.16.

Tabla 9.15: Especificaciones del autoclave seleccionado.

Marca	Modelo	Capacidad [ml]	Potencia [kW]	Precio [USD]
Maspack	SPDXDF20 AX	2-20	1,8	14.124

9.2.2. Autoclave

Los medios de cultivo, los matraces, reactores de 3 litros e implementos de laboratorio que son fáciles de trasladar y manipular, serán esterilizados en un autoclave. En este caso particular, los materiales y medios a esterilizar son de bajo volumen, por lo que se opta por un autoclave de mesa con una capacidad efectiva de 25 [L]. La cotización fue realizada con la empresa Autoclave Ltda., quienes recomendaron el equipo que se muestra en la Tabla 9.16.

Tabla 9.16: Especificaciones del autoclave seleccionado.

Marca	Modelo	Capacidad [L]	Potencia [kW]	Precio [USD]
Phoenix Luferco	AB-25 litros	25	1,8	6.240

9.2.3. Caldera

Como se mencionó en el capítulo 8, para la esterilización de los reactores de 30 litros con el medio de cultivo en su interior, se requiere de 11 [kg] de vapor a 121°C, por lo que el equipo se selecciona de acuerdo a estos requerimientos. A pesar de que en el mercado es posible obtener calderas que generen bajos flujos de vapor, se determina cotizar una de mayor capacidad, considerando una posible futura expansión de la planta. Las características de la caldera seleccionada, de la marca H. Y. Boiler Vessel Co. y vendida por Servitec, se muestran a continuación en la Tabla 9.17.

Tabla 9.17: Especificaciones de la caldera seleccionada.

Modelo	Generación de vapor [kg/h]	Potencia [kW]	Operación	Precio [USD]
LDR0.05-0.7-YQ	50	36	Eléctrica	2.074

9.2.4. Compresor

Para determinar las características del compresor, es necesario conocer los requerimientos totales de aire en el proceso. A continuación, en la Tabla 9.18, se identifican todos las etapas que requieren de aireación.

Tabla 9.18: Requerimientos de aire comprimido.

Etapa	Tiempo [h]	Flujo [L/min]	Volumen del cultivo [L]
Reactor 3L	22,2	3	3
Reactor 3L'	19,18	3	3
Reactor 30L	26,6	15	30
Reactor 30L'	21,5	15	30
Total		36	66

A pesar de que las etapas de fermentación en reactores de 3 y 30 litros no están organizadas para llevarse a cabo en simultáneo, ante eventuales imprevistos, se seleccionará un compresor que sea capaz de alimentar simultáneamente las fermentaciones. Como el flujo requerido por lote es de 36 [L/min], se opta por un equipo que pueda operar a mayores caudales, el cual se muestra en la Tabla 9.19 y está disponible en tiendas como Easy o Sodimac.

Tabla 9.19: Especificaciones del compresor seleccionado.

Marca	Modelo	Caudal máx. [L/min]	Potencia [kW]	Precio [USD]
Einhell	TC-AC 190/50/8	110	1,5	180

9.2.5. Bombas

Se requiere el uso de bombas para el trasvasije del caldo de cultivo desde los reactores de 3 litros hasta los de 30 litros, además, en estos últimos, se considera la alimentación de los sustratos de manera exponencial. Para la operación de la centrífuga se requiere de un flujo mayor de 540 [L/h]. Los requerimientos de bombeo de cada operación se muestran a continuación en la Tabla 9.20.

Tabla 9.20: Etapas que requieren de bombeo.

Operación	Flujo [L/h]	Volumen [L]	Tiempo [h]
Trasvasije en reactores de 3L a 30L	10	3	0,3
Alimentación exponencial en R 30L	0,5 - 3,0	20,7	15,7
Alimentación exponencial en R 30L'	0,7 - 3,4	20,6	11,9
Alimentación a centrífuga	540	31	0,06

Para la alimentación de los sustratos a los reactores de 30 litros, se consideran bombas peristálticas de flujo programable, de esta forma se asegura que este sea exponencial en los intervalos deseados. Con el fin de reducir costos, se utilizarán las mismas bombas para el trasvasije desde los fermentador de 3 litros hasta los de 30 litros, puesto ambas operaciones no son simultaneas. Considerando los datos de la tabla anterior, se opta por una bomba con las características mostradas en la Tabla 9.21.

Tabla 9.21: Especificaciones bombas peristálticas para flujo exponencial.

Marca	Modelo	Caudal [L/h]	Potencia [kW]	Precio [USD]
<i>Lambda instruments</i>	Lambda Maxiflow	0,002 - 10	1	1.635

Para la alimentación de la centrífuga, se utilizará una bomba centrífuga capaz de alcanzar el caudal deseado (540 [L/h]). Además, como los caldos de cultivo se centrifugarán de manera diferenciada, se considera una bomba para ambos, cuyas características se muestran en la Tabla 9.22.

Tabla 9.22: Especificaciones de bomba para alimentación de centrífuga.

Marca	Modelo	Caudal máximo [L/h]	Potencia [kW/h]	Precio [USD]
<i>Cole Parmer</i>	EW-75505-71	4.000	1	1.270

Capítulo 10

Programación de operaciones

Tal como se presentó en el capítulo 6, se requiere una producción anual de 48,17 [kg] de biomasa (peso seco), compuesta en igual proporción por *Azotobacter chroococcum* y *Azospirillum lipoferum*, específicamente 24,09 [kg] de cada bacteria.

La producción de un lote contempla tres etapas principales: propagación, producción y formulación. La etapa de propagación que consiste en propagar en serie el pre-inóculo en un matraz y posteriormente en un reactor de tres litros, y tiene una duración de 43,2 [h] para *Azotobacter chroococcum* y 39,8 [h] para *Azospirillum lipoferum* (Ver capítulo 9). A esto se suma el tiempo destinado a la carga y descarga de los equipos, estimado en 20 [min]. La fermentación principal tiene una duración de 26,6 [h] y 21,5 [h], respectivamente, mientras que la etapa de formulación considera 1 [h] para centrifugación (incluyendo descarga y limpieza) y 18,5 [h] para la liofilización.

10.1. Planificación y organización del proceso

Para tener un control del funcionamiento de ambas líneas de proceso, se propone la organización de las diferentes tareas asociadas a la producción del biofertilizante en una Carta Gantt. Se considera como un lote de producción, desde comienzos de la etapa de propagación hasta el término de la formulación. La distribución de los tiempos asignados a cada tarea se pueden apreciar en la Figura 10.1.

Es importante considerar que, si en algún momento, alguna de las etapas de la línea de proceso sufre algún inconveniente, la programación casi no considera actividades los días viernes, por lo que es posible flexibilizar los tiempos en caso de ser necesario, o incluir durante esos días, las mantenciones programadas de equipos y/o revisiones técnicas, las que se estiman deben ser al menos unos 20 días al año. Por último, a pesar de que no se indica en la planificación, tanto el proceso de propagación como el de producción tienen asociado un control de calidad, donde se toman muestras durante y al término de las fermentaciones para asegurar la calidad y esterilidad de los cultivos.

Capítulo 11

Evaluación económica

La evaluación económica de la línea de producción del biofertilizante bacteriano, considera en el flujo de caja: la inversión, los costos de producción y las ganancias. La unidad monetaria utilizada corresponde al dólar (USD), para esto se consideran los indicadores económicos al día 01 de marzo de 2021, donde el valor del dólar es de \$723 y el del euro de (EUR) \$870.

11.1. Costos de inversión

El CAPEX (*capital expenditure* o gasto en capital) es el gasto que una compañía o industria realiza en la adquisición de bienes, equipos e instalaciones necesarias en la planta [141]. De este modo, se transforma en un factor de prioridad para cualquier empresa, pues supone un indicador de ciclo de vida, es decir, establece las condiciones bases y transversales de producción, a través de la calidad de los equipos adquiridos para el funcionamiento normal de la compañía durante un cierto horizonte de tiempo. Los costos de inversión incluyen costos directos e indirectos, dentro de los costos directos se encuentran el costo de equipos y su instalación, instrumentación y control, piping, entre otros. Los costos indirectos están asociados a labores de ingeniería y supervisión, gastos de construcción y contingencias [142].

11.1.1. Costos directos

Costo de los equipos

La estimación tiene como primer paso una aproximación de costos asociados a la compra de los equipos que componen el proceso, tomando como referencia los resultados de su dimensionamiento y los precios entregados por proveedores. La mayoría de las cotizaciones son de proveedores dentro del país, sin embargo, en el caso de equipos cotizados en el extranjero, el precio reportado es del tipo FOB (*free on board*), por lo que no considera los costos asociados al transporte y seguro de embarque. En estos casos, se determina el costo CIF, el cual incluye el costo de la mercancía, el flete de traslado y la prima del seguro, y cuyo valor es generalmente un 10 % mayor al costo FOB [141]. Sumado a esto, se considera que las importaciones están afectas al pago del derecho *ad-valorem* que se calcula como un 6 % adicional a su costo CIF.

Además, se debe considerar el costo de instalación, el cual se puede estimar como un 35 % del costo efectivo del equipo (considerando el rango de 25 % a 55 %) [142]. Los resultados de las cotizaciones, se presentan en la Tabla 11.1, donde en la columna “Costo total”, se incluye el derecho *ad-valorem* (cuando corresponda) y el número de equipos.

Tabla 11.1: Costos de equipos.

Equipo	N°	Costo FOB [CLP]	Costo FOB [USD]	Costo CIF [USD]	Costo total [USD]	Costo instalado [USD]	Proveedor
Matraces	2	5.704	8	8	16	21	Bioquímica.cl Chile
Reactores 3 L	2	56.550.000	78.216	78.216	156.432	211.183	Dilaco Chile
Reactores 30 L ^a	2	152.250.000	210.581	210.581	421.162	568.568	Dilaco Chile
Centrífuga tubular	1	5.046.540	6.980	7.678	8.139	10.987	Reyes Machinery China
Liofilizador ^b	1	13.162.900	18.206	18.206	18.206	24.578	OF Química Chile
Equipos secundarios							
Envasadora y dosificadora de polvo	1	10.212.000	14.124	14.124	14.124	19.068	Maspack Chile
Bomba peristáltica	2	1.182.105	1.635	1.799	3.813	5.147	Lambda Lab. España
Bomba centrífuga	1	918.210	1.270	1.397	1.481	1.999	Cole-Parmer Estados Unidos
Compresor	1	130.140	180	180	180	243	Sodimac Chile
Caldera	1	1.499.502	2.074	2.281	2.418	3.265	Servitec España
Autoclave	1	4.511.520	6.240	6.240	6.240	8.424	Autoclave Ltda. Chile
Otros ^c	-	2.810.500	3.887	3.887	4.168	5.627	Chile
Total		248.279.121	343.401	344.597	636.378	859.111	

^a: Incluye software, ^b: Incluye bomba de vacío, ^c: Más detalles en Tabla F.1 Anexo F.

Costo directos adicionales

Tal como se mencionó previamente, se incluyen: instrumentación y control, equipamiento y materiales eléctricos, *pipiing* y construcciones. Estos costos pueden ser estimados como un porcentaje asociado al costo de los equipos entregados (sin considerar la instalación). En plantas de procesos, estos porcentajes suelen ser los que se muestran en la Tabla 11.2 [141].

Tabla 11.2: Porcentajes para estimación de costos directos.

Componente del costo	Porcentaje del costo del equipo
Instrumentación y control	8-50 %
<i>Pipiing</i>	16-80 %
Equipamiento y materiales eléctricos	10-40 %
Servicios de construcción y edificios	45-68 %

Como el proyecto propuesto corresponde a una línea de procesos y no al diseño de una planta nueva, se omite la sección de costos asociados a la compra y mejoramiento del terreno. Los demás componentes, se estiman considerando los porcentajes mostrados en la Tabla 11.3, los que corresponden a valores generales utilizados para industrias químicas pequeñas [141]. Además, para el caso de los costos de construcción y edificios, se utiliza el porcentaje sugerido para industrias que sólo incorporan nuevas líneas de proceso [141].

Tabla 11.3: Valor asociado a los costos directos adicionales.

Componente del costo	Porcentaje del costo del equipo	Valor [USD]
Instrumentación y control	26 %	165.458
<i>Piping</i>	31 %	197.277
Sistemas eléctricos	20 %	127.276
Servicios de construcción y edificios	29 %	184.550
Total		674.561

De esta forma, los costos directos totales corresponden a los mostrados en la Tabla 11.4.

Tabla 11.4: Costos totales directos.

Componente del costo	Valor [USD]
Equipos	636.378
Instalación	222.732
Costos directos adicionales	674.561
Total	1.533.671

11.1.2. Costos indirectos

Los costos indirectos corresponden a gastos que no están directamente relacionados con el material y la mano de obra de la instalación de la línea [141], y suelen estimarse a partir de los costos directos totales. En la Tabla 11.5 se muestran los valores típicos y los seleccionados.

Tabla 11.5: Costos totales indirectos.

Componente del costo	% comunes	% seleccionado	Valor [USD]
Ingeniería y supervisión	8 %	8 %	122.694
Servicios de construcción	8-10 %	0 %	0
Costos legales	1-3 %	3 %	46.010
Honorarios de contratistas	1,5-6 %	0 %	0
Contingencia	5-15 %	10 %	153.367
Total			322.071

Como el proyecto considera sólo la adición una nueva línea de proceso, se omiten los servicios de construcción y honorarios de contratistas, y se asume que todos los costos asociados a construcción, se consideran dentro de los costo directos “Servicios de construcción y

edificios” definidos previamente. Para la contingencia, se consideró un valor sugerido de 10 % [141], mientras que para los costos legales, se asumió el peor de los escenarios (3%).

11.1.3. Costo total de inversión

En la Tabla 11.6 se resumen los costos de inversión del proyecto.

Tabla 11.6: Resumen costos de inversión.

Costos de inversión	Valor [USD]
Costos directos	1.533.671
Costos indirectos	322.071
Total	1.855.742

11.2. Costos de capital de trabajo

El capital de trabajo hace alusión a los costos asociados a la puesta en marcha de la planta y al abastecimiento de materias primas e insumos para el primer mes de funcionamiento. En este trabajo se considera como un 20 % del costo total de inversión [141], es decir **371.148** [USD], puesto que la mayor parte de reactivos se compra al inicio de la operación y pueden tener una duración de varios meses.

11.3. Costos de operación

El OPEX (*operational expenditure* o gasto operacional) es el gasto asociado a la operación de la planta, es decir, aquel que permite su funcionamiento. Se descuenta anualmente a lo largo del horizonte de evaluación del proyecto, e incluye los costos de insumos, agua, electricidad, mano de obra, entre otros [141]. El OPEX está compuesto por costos fijos y variables.

11.3.1. Costos fijos

Los costos fijos se caracterizan por ser constantes y no sufrir variación asociada a la producción. Dentro de estos, se encuentran la mano de obra y los gastos generales fijos.

Mano de obra

El costo de la mano de obra depende del personal requerido para el funcionamiento de la línea de proceso. Como el proyecto incluye sólo la adición de una nueva línea de producción, se consideran 3 operadores, 2 a cargo de las líneas de propagación y fermentación (uno para cada microorganismo), además de un tercer operador a cargo de las etapas de separación y formulación del producto final. Junto con esto, se contará con un/a jefe de área, a cargo de la supervisión del proceso, una persona responsable del control de calidad, tomando muestras intermedias y realizando seguimientos, y otra persona encargada del aseo del recinto.

Para la determinación de los sueldos, se obtuvo un valor estimado del sueldo bruto para cada cargo, obtenidos de la base de datos de la fundación *WageIndicator*, quien recopila información salarial desde el año 2008 en Chile. Lo anterior se presenta en la Tabla 11.7, donde se consideran 12 meses pagados durante el año.

Tabla 11.7: Costo anual de mano de obra.

Cargo	Sueldo líquido mensual [CLP]	Sueldo bruto mensual [CLP]	Total mensual [CLP]	Total anual [USD]
Jefe/a de área	730.000	900.000	900.000	14.940
Operarios	530.000	650.000	1.950.000	32.364
Control de calidad	650.000	800.000	800.000	13.284
Personal de aseo	400.000	500.000	500.000	8.304
Total				68.892

Costos fijos adicionales de producción

Dentro de estos costos se encuentran los servicios de administración, distribución y marketing, y el financiamiento para I + D (Investigación y Desarrollo). Los primeros se estiman como un 25 % de los costos de mano de obra [141], es decir, **17.223** [USD]. Los costos de distribución y marketing son indispensables para un ingreso exitoso al mercado, por lo que se suponen un 20 % del OPEX total (el rango general va desde el 2 % al 20 %), mientras que I+D corresponde a un 5 % de este [141]. Considerando los datos de las siguientes secciones, se estiman en **65.000** [USD] y **16.500** [USD], respectivamente.

Considerando lo anterior, los costos fijos totales se resumen en la Tabla 11.8.

Tabla 11.8: Costos fijos de producción.

Componente del costo	Valor [USD]
Mano de obra	68.892
Costos fijos adicionales	98.723
Total	167.615

11.3.2. Costos Variables

Los costos de producción variables incluyen los gastos directamente asociados a la operación de la línea de proceso, es decir se incurren sólo cuando la planta opera. Este tipo de costo implica gastos de materias primas, mantenimiento y reparación de equipos, suministros operativos, catalizadores, solventes, etc [141].

Materia prima

Para estimar el costo de las materias primas utilizadas en el proceso, se considera el precio de los reactivos y los requerimientos de los cultivos, tal como se presenta en la Tabla 11.9.

Tabla 11.9: Costo de materias primas.

Materia prima	Consumo [Kg/año]	Precio [USD/Kg]	Total anual [USD]
Melaza	63,86	7,4	474
Glucosa	31,82	37,1	1.180
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,48	96,3	46
$Na_2MnO_4 \cdot 2H_2O$	0,01	1.424,6	16
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,16	92,9	15
KH_2PO_4	0,80	86,0	68
K_2HPO_4	2,39	122,5	293
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,03	167,4	5
$NaCl$	0,16	101	16
$CaCl_2$	0,03	185,3	6
$(NH_4)_2SO_4$	4,77	167,4	799
Total			2.918

Los costos de los reactivos fueron obtenidos a partir de una cotización en *Sigma-Aldrich*, para la cual se consideró el formato que más convenía considerando el consumo anual, independiente de si existían productos envasados en mayor cantidad. Esto con el fin de asegurar su consumo durante el año y evitar de esta forma, riesgos de vencimiento o pérdida de estabilidad del producto al permanecer abierto durante mucho tiempo.

Suministros básicos

Para la operación de la línea de proceso, se utiliza principalmente electricidad y agua. En la Tabla 11.10 se resumen los costos asociados al consumo de agua [m^3 /año] y energía [$kW-h$ /año]. El consumo de agua considera el volumen utilizado para los medios de cultivo, además del lavado de los equipos, para el que se estima un requerimiento hídrico equivalente al 20% del volumen de éstos [143]. Para la centrífuga tubular, se considera un volumen de agua igual al del medio de cultivo, el cual se deja circular por el equipo. Los detalles de las estimaciones se presentan en las Tablas F.3, F.4, F.5, Anexo F para el caso del suministro eléctrico, y en la Tabla F.2, Anexo F para el caso del suministro hídrico.

Tabla 11.10: Costo asociado a suministros básicos.

Suministro	Consumo anual	Valor de consumo	Costo [USD/año]
Agua	30,6 [m^3]	1.193 [CLP/ m^3]	51
Electricidad	34.822 [kW-h]	78,79 [CLP/kW-h]	3.794
Total			3.845

Las tarifas de luz y agua fueron obtenidas a partir de la información oficial publicada por la Comisión Nacional de Energía y por la Superintendencia de Servicios Sanitarios.

Costos variables adicionales

Adicionalmente, se tienen costos asociados a mantenencias y reparaciones de equipos; a suministros para la operación, que corresponden a lubricantes, productos químicos de prueba, entre otros; y finalmente costos de laboratorio. Los costos variables adicionales son calculados considerando un porcentaje de alguna estimación anterior [141] en un escenario desfavorable, tal como se muestra en la Tabla 11.11.

Tabla 11.11: Costos adicionales de producción variable.

Componente del costo	Valores típicos	% seleccionado	Costo [USD/año]
Mantenimiento y reparaciones	2-20 % del costo de equipos	20 %	127.276
Suministros de operación	15 % del costo de mantenimiento	15 %	19.091
Costos de laboratorio	10-20 % del costo de mano de obra	20 %	13.778
Total			160.145

Resumiendo lo anterior, los costos de producción variables se presentan en la Tabla 11.12.

Tabla 11.12: Costos variables de producción.

Componente del costo	Valor [USD]
Materia prima	2.918
Suministros básicos	3.845
Costos variables adicionales	160.145
Total	166.908

11.3.3. Costos totales de operación

En la Tabla 11.13 se resumen los costos totales de operación de la línea de proceso.

Tabla 11.13: Resumen costos de operación.

Costos de operación	Valor [USD]
Costos fijos	167.615
Costos variables	166.908
Total	334.523

11.4. Ingresos

Para determinar los ingresos, es indispensable definir el precio de venta del biofertilizante. Se toma como referencia el producto TwinN y otros productos relacionados, con un valor de 65 [USD/hectárea] por aplicación [144], sin embargo, con el fin de ingresar competitivamente al mercado, se decide apuntar a un valor menor, del orden de 50 [USD/hectárea], precio que se encuentra dentro del rango especificado por expertos del rubro¹. Ahora bien, la venta de biofertilizantes suele realizarse por medio de distribuidores, por lo que el precio de venta para estos debe ser de al menos un 40 % del precio de venta al usuario. Además, se debe considerar el costo asociado al despacho del producto, el cual se supone como un 10 % adicional al valor anterior². De esta forma, el precio de venta del producto se reduce a 25 [USD/hectárea].

Como se indica en el Capítulo 6, una hectárea debe ser inoculada con $6 \cdot 10^{10}$ [UFC]. Considerando que si todos los microorganismos generados en el proceso fuesen viables, esto equivaldría a $6 \cdot 10^{-2}$ [g producto/hectárea], sin embargo, como en la etapa de liofilización se pierde un 20 % de la viabilidad, entonces se requiere una aplicación mayor, equivalente a $7,5 \cdot 10^{-2}$ [g de producto/hectárea]. Considerando el valor definido por hectárea, se obtiene el precio por kilogramo de producto, el cual se muestra en la Tabla 11.14 junto con la cantidad de producto generado anualmente³ y los ingresos asociados a la venta de este.

Tabla 11.14: Ingresos por venta.

Producción [kg/año]	Precio de venta [USD/kg]	Ingresos por venta [USD/año]
43,36	333.333	14.453.613

11.5. Flujo de caja

Tomando en consideración la información expuesta anteriormente, se procede a realizar una proyección del flujo de caja, el cual se presenta la Tabla 11.15, y que incluye efectos tributarios como: depreciación, impuestos, valores residuales, etc. Para su desarrollo, se considera un horizonte de evaluación para el proyecto de 10 años. El Impuesto a la Renta de Primera Categoría es de 27 %, de acuerdo al circular N° 52, 10.10.2014 del Servicio de Impuestos Interno (SII) [145]. La tasa de descuento se estima en un 12 % considerando un riesgo medio con el proyecto, pues sólo abarca la adición de una nueva línea de proceso en una planta existente.

La depreciación para los equipos es de 15 años, excepto para las bombas y el compresor donde se consideran 10 años, de acuerdo a la Resolución N°43, de 26-12-2002 del SII [146]. De esta forma, estos últimos estarán desvalorizados al finalizar el horizonte de evaluación, mientras que los demás equipos se valorizarán considerando un precio de reventa de un 20 % sobre el valor libro. El detalle de las depreciaciones se presenta en la Tabla F.6, Anexo F.

¹ Conversación sostenida con Pablo Nuñez y María Fernanda Flores, *Gerente técnico y Gerente de Proyectos en Agroadvance SpA, respectivamente*, noviembre 2020.

² Estimaciones entregadas por María Fernanda Flores, *Gerente de Proyectos en Agroadvance SpA*, abril 2021.

³ Considera la pérdida del 10 % de la biomasa generada (48,18 [kg]) en la etapa de centrifugación.

Tabla 11.15: Flujo de caja del proyecto.

Factores	AÑO											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
(+) Ingresos por ventas	-	14.453.613	14.453.613	14.453.613	14.453.613	14.453.613	14.453.613	14.453.613	14.453.613	14.453.613	14.453.613	14.453.613
(-) OPEX	-	-334.523	-334.523	-334.523	-334.523	-334.523	-334.523	-334.523	-334.523	-334.523	-334.523	-334.523
(+/-) Ganancias/pérdidas de Capital	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	41.782
(-) Depreciaciones	-	-42.330	-42.330	-42.330	-42.330	-42.330	-42.330	-42.330	-42.330	-42.330	-42.330	-42.330
(-) Pérdidas ejercicio anterior	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(=) Utilidad antes de Impuesto	0	14.076.760	14.076.760	14.076.760	14.076.760	14.076.760	14.076.760	14.076.760	14.076.760	14.076.760	14.076.760	14.118.542
(-) Impuesto (27 %)	-	-3.800.725	-3.800.725	-3.800.725	-3.800.725	-3.800.725	-3.800.725	-3.800.725	-3.800.725	-3.800.725	-3.800.725	-3.812.006
(=) Utilidad después de Impuesto	0	10.276.035	10.276.035	10.276.035	10.276.035	10.276.035	10.276.035	10.276.035	10.276.035	10.276.035	10.276.035	10.306.536
(+) Depreciaciones	-	42.330	42.330	42.330	42.330	42.330	42.330	42.330	42.330	42.330	42.330	42.330
(-/+) Ganancias/pérdidas de Capital	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-41.782
(+) Pérdida ejercicio anterior	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(=) Flujo Operacional	0	10.318.365	10.307.084									
(-) Inversiones (CAPEX)	-1.855.742	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(-) IVA de la inversión	-352.592	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(+) Recuperación IVA de inversión	-	352.592	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(+) Valor Residual de activos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	250.694
(-) Capital de trabajo	-371.148	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(+) Recuperación Capital de Trabajo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	371.148
(=) Flujo de Capitales	-2.579.482	352.592	0	621.842								
Flujo de caja Neto	-2.579.482	10.670.957	10.318.365	10.928.926								
VAN ANUAL	-2.579.482	9.527.639	8.225.737	7.344.408	6.557.507	5.854.917	5.227.605	4.667.504	4.167.414	3.720.906	3.518.822	
VAN (USD)	56.232.976											
TIR	411 %											
Payback	1											

11.5.1. Indicadores económicos

Para evaluar si es conveniente o no invertir en este proyecto, es fundamental analizar al menos, los tres indicadores de viabilidad más importantes: Valor Actual Neto (VAN), Tasa Interna de Retorno (TIR) y Recuperación de la inversión (*payback*).

El valor actual neto proyecta el flujo de dinero, actualizándolo a su valor presente. Si el valor del VAN para el proyecto es superior a cero (0), entonces se determina que vale la pena invertir [147]. La tasa interna de retorno, corresponde a la tasa de descuento que hace que el flujo de caja tenga un VAN igual a cero (0). Una TIR alta indica que el proyecto es altamente rentable, y si es superior al valor de la tasa de descuento considerada, entonces se recomienda invertir [147]. El *payback* indica cuánto tiempo tardan las utilidades en cubrir la inversión inicial, mientras menor sea el plazo, más atractiva será la oferta, dependiendo de la realidad financiera y las expectativas de cada inversor [147].

Los resultados de estos indicadores, incluidos en la Tabla 11.15, denotan que el proyecto presenta valores de rentabilidad positivos, con un VAN de más de 56 millones de dólares y una TIR superior al 400 %. A pesar de que pueden existir proyectos que posean una rentabilidad tan alta (TIR superior al 100 %), este valor puede ser puesto en duda.

Al analizar el flujo de caja, se observa que los ingresos son los que desencadenan los resultados anteriores, puesto que la estimación de costos de operación e inversión fueron cotizados de manera específica para el proyecto, y concuerdan con los de proyectos similares. Considerando los ingresos, si se analiza el precio de venta por hectárea, este es similar a los productos que se comercializan actualmente, por lo que se prevé que la estimación de la demanda, y en consecuencia la producción, es excesiva, y que por ende, no sea posible cubrir un 35 % de la superficie nacional orgánica ni un 10 % de la superficie sin certificación orgánica.

Por otro lado, los supuestos utilizados para el diseño del proceso, determinan que el producto generado tenga una viabilidad de $8 \cdot 10^{11}$ [UFC/g], valor 8 veces superior al registrado para productos similares [144]. Es por esto que se determina realizar un análisis de sensibilidad, considerando que dentro del proceso se pierde al menos un orden de magnitud en la viabilidad de los microorganismos. De esta forma, se obtendrían $1 \cdot 10^{11}$ [UFC/g], con lo que la dosis de aplicación sería de 0,6 [g/hectárea], concordante con la del producto TwinN [144].

Modificaciones en la viabilidad celular

Considerando una viabilidad alcanzada igual a $1 \cdot 10^{11}$ [UFC/g] y dos aplicaciones por hectárea, entonces, con la producción estimada previamente sería posible cubrir 36.134 hectáreas, valor correspondiente a un 13 % de las 289 mil hectáreas a cubrir estimadas. Considerando este nuevo supuesto, el cual no genera variaciones en el diseño del proceso, puesto que la masa de microorganismos producida es la misma, sólo que la viabilidad se ve reducida, entonces se realiza un nuevo flujo de caja el cual se muestra en la Tabla 11.16. En este nuevo escenario se observa que el proyecto sigue siendo altamente rentable (VAN de 4.068.733 [USD] y TIR 46 %), pero ahora con valores realistas para los indicadores económicos.

Tabla 11.16: Flujo de caja del proyecto, considerando pérdida de viabilidad.

Factores	AÑO											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
(+) Ingresos por ventas	-	1.806.702	1.806.702	1.806.702	1.806.702	1.806.702	1.806.702	1.806.702	1.806.702	1.806.702	1.806.702	1.806.702
(-) OPEX	-	-334.523	-334.523	-334.523	-334.523	-334.523	-334.523	-334.523	-334.523	-334.523	-334.523	-334.523
(+/-) Ganancias/pérdidas de Capital	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	41.782
(-) Depreciaciones	-	-42.330	-42.330	-42.330	-42.330	-42.330	-42.330	-42.330	-42.330	-42.330	-42.330	-42.330
(-) Pérdidas ejercicio anterior	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(=) Utilidad antes de Impuesto	0	1.429.849	1.429.849	1.429.849	1.429.849	1.429.849	1.429.849	1.429.849	1.429.849	1.429.849	1.429.849	1.471.631
(-) Impuesto (27%)	-	-386.059	-386.059	-386.059	-386.059	-386.059	-386.059	-386.059	-386.059	-386.059	-386.059	-397.340
(=) Utilidad después de Impuesto	0	1.043.790	1.043.790	1.043.790	1.043.790	1.043.790	1.043.790	1.043.790	1.043.790	1.043.790	1.043.790	1.074.291
(+) Depreciaciones	-	42.330	42.330	42.330	42.330	42.330	42.330	42.330	42.330	42.330	42.330	42.330
(-/+) Ganancias/pérdidas de Capital	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-41.782
(+) Pérdida ejercicio anterior	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(=) Flujo Operacional	0	1.086.120	1.074.839									
(-) Inversiones (CAPEX)	-1.855.742	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(-) IVA de la inversión	-352.592	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(+) Recuperación IVA de inversión	-	352.592	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(+) Valor Residual de activos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	250.694
(-) Capital de trabajo	-371.148	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(+) Recuperación Capital de Trabajo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	371.148
(=) Flujo de Capitales	-2.579.482	352.592	0	621.842								
Flujo de caja Neto	-2.579.482	1.438.712	1.086.120	1.696.681								
VAN ANUAL	-2.579.482	1.284.563	865.848	773.078	690.249	616.293	550.262	491.305	438.665	391.666	340.127	546.286
VAN (USD)	4.068.733											
TIR	46%											
Payback	2											

Capítulo 12

Discusión y Conclusiones

12.1. Discusión

A partir de la búsqueda de información realizada para el estudio de mercado, se evidencia que no existe claridad en cuánto al número de empresas ni de productos comercializados, debido a que actualmente no existe normativa específica, más que el etiquetado, que permita su contabilización, siendo incluso importados en algunos casos bajo el mismo código arancelario que fertilizantes químicos. Considerando esto, se estima necesario realizar un estudio detallado y en profundidad tanto de importaciones como de la producción nacional de bioinsumos, lo que significa amplios esfuerzos para lograr una recopilación representativa de datos.

Particularmente, para analizar la producción nacional de bioinsumos, se seleccionó la información considerando sólo aquellos productos que se encuentran certificados para su uso en la agricultura orgánica nacional, información que no evidencia la realidad actual, puesto que se excluyen aquellas empresas que comercializan bioinsumos y que no cuentan con una certificación para su uso en la agricultura orgánica, ya sea por motivos económicos o burocráticos.

La información nacional recopilada es escasa en términos numéricos, por lo que no se conocen las capacidades productivas ni niveles de comercialización de los productos mencionados. La adquisición de estos datos es fundamental para realizar una estimación real de la capacidad de una planta, con el fin de competir con productores nacionales con niveles similares de producción, rendimiento e incidencia en el mercado, al menos para una etapa inicial del proyecto.

Acorde a lo anterior, el nivel de producción debiese ser estimado considerando la demanda nacional de bioinoculantes formulados a partir de microorganismo, y no tomando como base las posibles hectáreas cultivables a cubrir, como se realizó en este trabajo, puesto que esto puede llevar a una sobreestimación de la capacidad de producción establecida. Particularmente, el cubrir un 35 % de los suelos certificados para producción orgánica más un 10 % de los suelos no certificados, puede ser un escenario difícil de alcanzar, no por la factibilidad técnica, si no por que son productos que aun no se han masificado y por ende, la venta total de la producción puede ser improbable.

El diseño propuesto, a pesar de que considera pérdidas de viabilidad en la etapa de liofilización, no es representativo de la realidad productiva actual. Dentro de los productos existentes, las viabilidades más altas reportadas son del orden de $1 \cdot 10^{11}$ [UFC/g], 8 veces menor a la alcanzada en este diseño. Por otro lado, la venta de bioinsumos suele no ser constante, sino más bien estacionaria, teniendo un auge en períodos previos a la floración o en el inicio de las plantaciones. Considerando esto, es relevante analizar la pérdida de viabilidad, y por ende de efectividad, durante los períodos de almacenamiento de los productos, o en su defecto, modificar la programación de las operaciones para evitar su acumulación.

El proceso se considera técnicamente factible con los equipos y operaciones seleccionadas, las cuales permiten un control exhaustivo en las etapas de fermentación (T° , pH, espuma, aireación) y consideran una formulación que garantiza una alta viabilidad de los microorganismos. Sin embargo, se debe evaluar la aplicabilidad de los parámetros de fermentación considerados para el diseño, puesto que estos fueron obtenidos a partir de condiciones de laboratorio, y por lo tanto, pueden diferir en equipos de escala piloto. Además, se toma como supuesto que las concentraciones de sustrato se mantienen bajas durante las fermentaciones, con el fin de evitar la producción de alginato, el que puede mermar el rendimiento del sustrato en biomasa. Lo anterior está sujeto a las condiciones de homogeneización de los cultivos.

El proceso diseñado puede ser escalable para otros microorganismos, siempre y cuando, el microorganismo seleccionado se ajuste a los equipos del proceso. Podría evaluarse el cultivo de otras bacterias y de esta forma diversificar la gama de productos que pueden ser generados en la misma línea de proceso.

12.2. Conclusiones

Se desarrollo un estudio de mercado que incluía principalmente microorganismos con funciones bioinoculantes. A partir de la información recopilada, se determina que la producción nacional es escasa comparada con las importaciones y que por ende, el mercado chileno tiene un gran potencial para ser explotado al corto y mediano plazo. Considerando esto, se determinó abarcar un 35 % de los suelos orgánicos certificados estimados al 2025, más un 10 % de suelos sin certificación orgánica.

Para el desarrollo del bioinsumo, se seleccionaron dos microorganismos: *Azotobacter chroococcum* y *Azospirillum lipoferum*, los cuales tienen un rol biofertilizante, al tener la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y proporcionar este elemento al suelo en formas asimilables por plantas y árboles.

El proceso de producción del biofertilizante considera tres etapas principales: propagación, producción y formulación. La primera consiste en una serie de fermentaciones tipo *batch* que buscan incrementar la masa de microorganismos; la segunda considera un biorreactor en operación *fed-batch*, en el cual se adiciona exponencialmente el sustrato hasta alcanzar la masa de microorganismos requerida. Finalmente, para llevar a cabo la formulación del producto, se considera la concentración de la biomasa mediante centrifugación, y luego una etapa de liofilización que reduce considerablemente la humedad y el volumen del producto final, favoreciendo su envasado y transporte.

Para el diseño del proceso, se realizó un balance de masa que consideró una eficiencia de separación para las bacterias en la centrífuga del 90 % y una pérdida de viabilidad del 20 % durante la liofilización. Teniendo en cuenta la masa y el volumen a procesar en cada equipo, se procedió a su diseño a partir de ecuaciones características, donde los valores obtenidos coinciden con equipos comerciales utilizados para este tipo de procesos.

Desde un punto de vista técnico, es factible instalar la línea de proceso para la producción de un biofertilizante bacteriano, pues considera todos los equipos requeridos tanto para las fermentaciones como para la formulación. Además, el análisis considera la presencia de personal competente en el área, junto con una supervisión y control de la calidad constante.

A partir de la evaluación económica del proceso, se determina que con un precio de venta al usuario de 50 [USD/ha] el proyecto es altamente rentable, recuperando la inversión al primer año de funcionamiento y teniendo un VAN superior a los 56 millones de dólares. Debido a la baja confiabilidad de estos valores, se realizó un análisis de sensibilidad que consideraba una mayor pérdida de viabilidad de los microorganismos dentro del proceso, por lo que la superficie capaz de abarcar disminuía considerablemente (13 % de la superficie estimada inicialmente). Con estos nuevos valores, el proyecto sigue siendo rentable, con valores obtenidos para el VAN (4 millones de dólares) y la TIR (47 %) realistas. Se determina que la viabilidad del producto y por ende, la capacidad de cobertura de hectáreas estaban sobreestimadas en el diseño original.

12.3. Recomendaciones

Se propone evaluar la efectividad del producto en cultivos en que se pueda sustituir total o parcialmente la fertilización química, con el fin de ampliar la cantidad de pruebas de campo efectivas y de esta forma, evidenciar su eficacia y competitividad con los métodos tradicionales.

Se recomienda evaluar la viabilidad celular dentro del proceso completo, enfatizando en las etapas críticas como la centrifugación o liofilización. Además, se sugiere estudiar la pérdida de viabilidad del producto almacenado, con el fin de predecir la eficacia del producto en su aplicación, considerando que la comercialización de bioinsumos tiene un comportamiento más bien estacionario dentro del país, por lo que podrían generarse meses en donde el producto se mantenga almacenado.

Adicionalmente, se recomienda incorporar una unidad especializada en *marketing* para este tipo de productos, buscando llegar a un mayor número de clientes y de esta forma, incrementar y masificar el uso de bioinsumos para una producción agrícola más sustentable.

Para estudios futuros, se recomienda evaluar el proceso para la producción de otros microorganismos que tengan potencial bioinoculante. El proceso puede ser generalizable en tres grandes etapas, lo que permite conservar la infraestructura, variando los microorganismos a cultivar y en consecuencia, los requerimientos de la operación como: medio de cultivo, temperatura, pH, aireación, etc.

Bibliografía

- [1] FAO. 2002. *Los Fertilizantes y su uso*. Roma.
- [2] Silva, C. 2010. *Agricultura limpia y la necesidad del uso racional de los fertilizantes*. IDESIA (Chile) Volumen 28, N° 1, Enero - Abril, 2010, pp. 5-7.
- [3] Gallardo, J. 2007. *Conclusiones del IV Congreso Iberoamericano de Física y Química Ambiental*. Ecosistemas, 16 (2): 137-140. Disponible en: <http://www.revistaecosistemas.net/articulo.asp?Id=478> [Consulta: 10 de junio, 2020].
- [4] Tassara, C., Ortega, R. 2003. *Eurepgap y la regulación chilena en el uso de fertilizantes y plaguicidas*. Agronomía y Forestal UC. 19 (20-25).
- [5] FAO. 2019. *Código Internacional de Conducta para el Uso y Manejo de Fertilizantes*. Roma.
- [6] Barrera, D., Kremer, M. 2013. *Chile y su agricultura en el contexto global de emisiones de gases*. ODEPA, Ministerio de Agricultura.
- [7] SAG. 2013. *Agricultura Orgánica Nacional*. Ministerio de Agricultura, Servicio Agrícola y Ganadero, División de protección de Recursos Naturales Renovables.
- [8] Gómez, J. 2000. *Abonos orgánicos*. Colombia.
- [9] Martínez, M., Ortega, R., Valdés, S. 2016. *Bioproductos en Chile: Un nuevo e interesante mercado*. Red Agrícola. Volúmen N°76, Chile, febrero 2016, pp. 62-63.
- [10] Observatorio para la Innovación Agraria, Agroalimentaria y Forestal. 2012. *Desarrollo de biofertilizantes y creación de Planta Piloto de Producción*. BIOAGROTEC EIRL. [en línea] Disponible en: <https://www.opia.cl/601/w3-article-3199.html> [Consulta: 01 de julio, 2020].
- [11] Grageda, O., Díaz, A., Peña, J., Vera, J. 2012. *Impacto de los biofertilizantes en la agricultura*. Revista mexicana de ciencias agrícolas, 3(6), 1261-1274. [en línea] Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342012000600015&lng=es&tlng=es [Consulta: 16 de junio, 2020].
- [12] Dreistadt, S. 2007. *Biological Control and Natural Enemies*. Agriculture and Natural Resources, University of California [en línea] Disponible en: <http://ipm.ucanr.edu/PMG/menu.biocontrol.html> [Consulta: 15 de junio, 2020].

- [13] Bhattacharyya, P., Jha, D. 2012. *Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture*. World J Microbiol Biotechnol 28:1327–1350.
- [14] Vessey, J. 2003. *Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers*. Plant Soil 255:571–586.
- [15] Dibut, B., Martínez, R. 2004. *Biofertilizantes y bioestimuladores. Métodos de inoculación*. Manual sobre agricultura orgánica sostenible (págs. 15-21). Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical, “Alejandro de Humboldt”, (INIFAT), La Habana, Cuba. [en línea] Disponible en: http://www.fao.org/tempref/GI/Reserved/FTP_FaoRlc/old/prior/segalim/aup/pdf/organica.pdf [Consulta: 17 de junio, 2020].
- [16] All-Taweil, H., Osman, M., Hamid, A., Yusoff, W. 2009. *Development of microbial inoculants and the impact of soil application on rice seedlings growth*. Am. J. Agric. Biol. Sc. 4:79-82.
- [17] Pooja, S., Dudeja, S., Neeru, N. 2007. *Development of multiple co-inoculants of different biofertilizers and their interaction with plants*. Archives of Agron. Soil Sci.53: 221-230.
- [18] Bhattacharjee, R. Dey, U. 2014. *Biofertilizer, a way towards organic agriculture: A review*. African Journal of Microbiology Research, 8 (24), 2332-2343.
- [19] Mahanty, T., Bhattacharjee, S., Goswami, M., Bhattacharyya, P., Das, B., Ghosh, A. Tribedi, P. 2016. *Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development*. Environmental Science and Pollution Research, 24 (4), 3315-3335.
- [20] Tairo, E., Ndakidemi, P. 2013. *Possible benefits of Rhizobial inoculation and phosphorus supplementation on nutrition, growth and economic sustainability in grain legumes*. American Journal of Research Communication 1(12):532–556.
- [21] Ahemad, M., Khan, M. 2012. *Ecological assessment of biotoxicity of pesticides towards plant growth promoting activities of pea (Pisumsativum)-specific Rhizobium sp. strain MRP1*. Emirates Journal of Food and Agriculture 24(4):334.
- [22] Bhattacharyya, P., Jha, D. 2012. *Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture*. World J Microbiol Biotechnol 28(4):1327–1350.
- [23] Hoffman, B., Dean, D., Seefeldt, L. 2009. *Climbing nitrogenase: toward a mechanism of enzymatic nitrogen fixation*. Acc Chem Res 42(5):609–619.
- [24] Smith, B., Richards, R., Newton, W. 2013. *Catalysts for nitrogen fixation: nitrogenases, relevant chemical models and commercial processes*. Springer Science and Business Media 1:340.
- [25] Elmerich, C., Zimmer, W., Vieille, C. 1992. *Associative nitrogen-fixing bacteria*. En G. Stacey, R. Burris, H. Evans (Edits.), Biological Nitrogen fixation (págs. 212-258). Nueva York: Chapman and Hall.
- [26] Ferlini, H., Díaz, S., Traut, C. 2005. *Beneficios del uso de inoculantes sobre la base de azospirillum brasilense*. Universidad Nacional del Nordeste, Comunicaciones Científicas y

Tecnológicas, Santa Fe, Argentina.

- [27] Kusey, R., Jansen, H., Legget, M. 1989. *Microbially mediated increases in plant available phosphorus*. Adv.Agron., 199-223.
- [28] Paul, E., Clark, F. 1989. *Phosphorus transformation in soil*. Soil Microbiology and Biochemistry (págs. 222-232). Nueva York: Marcel Dekker Inc.
- [29] Peleg, Z., Blumwald, E. 2011. *Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants*. Curr Opin Plant Biol 14(3):290–295.
- [30] Spaepen, S., Vanderleyden, J. 2011. *Auxin and plant-microbe interactions*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 3(4).
- [31] Gupta, G., Parihar, S., Ahirwar, N., Snehi, S., Singh, V. 2015. *Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture*. Journal of microbial and Biochemical technology 7:2.
- [32] Glick, B. 2012. *Plant growth promoting bacteria: mechanisms and applications*. Scientifica 2012:15.
- [33] Frey-Klett, P., Burlinson, P., Deveau, A., Barret, M., Tarkka, M., Sarniguet, A. 2011. *Bacterial-fungal interactions: hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists*. Microbiol Mol Biol Rev 75(4):583–609.
- [34] Chibuike, G., Obiora, S. 2014. *Heavy metal polluted soils: effect on plants and bioremediation methods*. Applied and Environmental Soil Science 2014:12.
- [35] Upadhyaya, H., Panda, S., Bhattacharjee, M., Dutta, S. 2010. *Role of Arbuscular mycorrhiza in heavy metal tolerance in plants: prospects for phytoremediation*. Journal of Phytology 2(7).
- [36] Clua, A., Oligati, J. 2013. *Evaluación de la doble inoculación Bradyrhizobium-micorrizas y el uso de fitoterápicos de semilla en el crecimiento, eficiencia de inoculación y el rendimiento de un cultivo de soja*. (RIA) Revista de Investigaciones Agropecuarias, 39(3), 250-258.
- [37] Parada, M., Reyes, M., Mera, M. 2007. *Situación silvoagropecuaria en Chile y el uso de biofertilizantes*. En BIOFAG, Biofertilizantes en Iberoamérica, una visión técnica, científica y empresarial (págs. 32-37).
- [38] Goedas, A. 2010. *Las Micorrizas arbusculares como bioinoculantes*. Uso actual y potencial de microorganismos para mejorar la nutrición y el desarrollo en trigo y maíz (págs. 53-59). Buenos Aires: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- [39] Singh, R. (Eds.). 2017. *Principles and Applications of Environmental Biotechnology for a Sustainable Future*. Applied Environmental Science and Engineering for a Sustainable Future. Springer Science + Business Media Singapore. 487 pp.
- [40] Rivero, C., Hu, Y., Kwan, T., Webb, C., Theodoropoulos, C., Daoud, W., Lin, C. (Eds.).

2017. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Solid Wastes management*. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. Elsevier B.V. 534 pp.
- [41] Doran, P. 1998. *Principios de ingeniería de los bioprocesos*. Acribia, Zaragoza, España.
- [42] Tejeda, A. 2011. *Bioseparaciones*. Pearson, México.
- [43] *Tipos de Fermentadores*. Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca. [en línea] Disponible en: <http://webcd.usal.es/Web/educativo/ampliacion3/fermentador.htm> [Consulta: 25 de julio, 2020].
- [44] Barbosa-Póvoa, A. 2007. *A critical review on the design and retrofit of batch plants*. Computers & Chemical Engineering, 31(7), 833–855.
- [45] Rippin, D. 1993. *Batch process systems engineering: A retrospective and prospective review*. Computers & Chemical Engineering, 17, S1–S13.
- [46] Kondili, E., Shah, N., Pantelides, C. 1993. *Production planning for the rational use of energy in multiproduct continuous plants*. Computers & Chemical Engineering, 17, S123–S128.
- [47] Nagao, N., Matsuyama, T., Yamamoto, H., Toda, T. 2003. *A novel hybrid system of solid state and submerged fermentation with recycle for organic solid waste treatment*. Process Biochemistry, 39(1), 37–43.
- [48] Xavier, I., Holloway, G., Leggett, M., Bios, P. 2004. *Development of rhizobial inoculant formulations*. Online Crop Manag.
- [49] Fages, J. 1992. *An industrial view of Azospirillum inoculants: formulation and application technology*. Symbiosis 13:15–26.
- [50] Ho, W., Ko, W. 1985. *Soil microbiostasis: effects of environmental and edaphic factors*. Soil Biol Biochem 17:167–170.
- [51] Bashan, Y. 1998. *Inoculants for plant growth promoting bacteria for use in agriculture*. Adv Biotechnol 16:729–770.
- [52] Malusá, E., Sas-Paszt, L. 2012. *Technologies for Beneficial Microorganisms Inocula used as Biofertilizers*. The Scientific World Journal, 1-12.
- [53] Higa, T., Parr, J. 1994. *Beneficial and effective microorganisms for a sustainable agriculture and environment*. International Nature Farming Research Center, Atami, Japón.
- [54] Bashan, Y. 1998. *Inoculants of plants growth-promoting bacteria for use in agriculture*. Biotechnology Advances, 16(4), 729-770.
- [55] Bashan, Y. 2008. *El uso de inoculantes microbianos como una importante contribución al futuro de la agricultura mexicana*. In: Diaz-Franco, A. y Meyek-Pérez, N. (Eds.). La biofertilización como tecnología sostenible. Plaza y Valdéz. México. 17-24 pp.
- [56] Barea, J., Pozo, M., Azcon, R., Azcon-Aguilar, C. 2005. *Microbial cooperation in the*

- rhizosphere*. J. Exp. Bot. 56:1761-1778.
- [57] Okon, Y., Labandera-González, C. 1994. *Agronomic applications of Azospirillum evaluation of 20 years world wide field inoculation*. Soil Biology. 26: 1591-1601.
- [58] Red Agrícola. 2017. *Bayer CropScience: Serenade ASO, eficaz fungicida bactericida biológico*. [en línea] Disponible en: <https://www.redagricola.com/cl/bayer-cropscience-serenade-aso-eficaz-fungicida-bactericida-biologico/> [Consulta: 20 de marzo, 2021].
- [59] Agroadvance. *Línea Biológicos*. [en línea] Disponible en <https://agroadvance.cl/linea-biologicos/> [Consulta: 20 de marzo, 2021].
- [60] UPL Chile. *Bioestimulantes*. [en línea] Disponible en <https://www.upl-ltd.com/cl/portafolio-de-productos> [Consulta: 20 de marzo, 2021].
- [61] Mapleton Agri Biotec Pty Ltd. 2018. *Reduction of nitrate leaching rates via use of TwinN*. California, USA. [en línea] Disponible en: <https://www.mabiotec.com/sustainability.php>. [Consulta: 06 de septiembre, 2020].
- [62] Trentini, D. 2010. *Identificação dos alvos celulares das proteínas de transdução de sinal PII do diazotrófico de vida livre Azospirillum amazonense*. Brasil, RS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- [63] Schultz, N., Morais, R., Silva, J. 2012. *Avaliação agrônômica de duas variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e adubadas com nitrogênio*. Pesq Agropec Bras (47):261-268.
- [64] Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Okon, Y., Vanderleyden, J. 2002. *Effect of inoculation with wild type Azospirillum brasilense and A. irakense strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize*. Biol Fertil Soil (36):284-297.
- [65] Hungria, M., Nogueira, M., Araujo, R. 2016. *Inoculation of Brachiaria spp. with the plant growth-promoting bacterium Azospirillum brasilense: An environment-friendly component in the reclamation of degraded pastures in the tropics*. Agr Ecosyst Environ (221):125-131.
- [66] Zambrano, E., Jiménez, T., Tapia, A. 2007. *Estudo de bacterias asociadas a orquídeas (Orchidaceae)*. Lankesteriana 7 (1-2):322-325.
- [67] Reis, V., Baldini, J., Baldini, V., Dobereiner, J. 2000. *Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm Trees*. Plant Sci (19): -247.
- [68] Hartmann, A., Baldani, J. 2006. *The genus Azospirillum*. In: Dworkin M editor. The Prokaryotes. 1rst ed. New York, New York: Springer 115-140.
- [69] Frioni. 1999. *Procesos microbianos: Fijación biológica del nitrógeno (FBN) por diazotrofos en vida libre y en la rizosfera*. Editorial de la Fundación Universitaria Nacional de Rio Cuarto. Rio Cuarto, Argentina.

- [70] Gonzales-López, F., Salmeron, V., Martínez-Toledo, M., Ballesteros, F., Ramos-Cormenaza, A. 1986. *Production of auxins, cytokinins by Azotobacter vinelandii ATCC 12837 in chemically-defined media and dialysed soil media*. Soil Biol Biochem, 18(1), 119-120.
- [71] Tejera, N., Lluch, C., Martínez-Toledo, M., González-López, J. 2005. *Isolation and characterization of Azotobacter and Azospirillum strains from the sugarcane rhizosphere*. Plant and Soil 270: 223–232p.
- [72] Ferlini, H. 2006. *Co-Inoculación en Soja (Glycine max) con Bradyrhizobium japonicum y Azospirillum brasilense*. Cultrop vol.40 no.1 La Habana.
- [73] Okon, Y., Vanderleyden, J. 1997. *Root-associated Azospirillum species can stimulate plants*, Appl Environ Microbiol 63(7):366-370.
- [74] Rai, S., Gaur, A. 1998. *Caracterización de Azotobacter spp. y efecto de Azotobacter y Azospirillum como inoculantes sobre el rendimiento y la absorción de N del cultivo de trigo*. Plant Soil 109, 131-134.
- [75] Red agrícola. 2017. *Biofertilizantes TWIN N y su impacto en el rendimiento de cereales*. [en línea] Disponible en: <https://www.redagricola.com/cl/biofertilizantes-twin-n-impacto-rendimiento-cereales/> [Consulta: 02 de septiembre, 2020].
- [76] Red agrícola. 2013. *AM Ecological: La agricultura sustentable comienza en el suelo de Chile*. Edición N°59, diciembre 2013, ISSN 0718- 0802.
- [77] Castillo, C., Huenchuleo, M. José, Michaud, A., Solano, J. 2016. *Micorrización en un cultivo de papa adicionado del biofertilizante Twin-N establecido en un Andisol de la Región de La Araucanía*. Idesia (Arica), 34(1), 39-45.
- [78] ODEPA. 2018. *Agricultura orgánica: oportunidades y desafíos*. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias, Ministerio de Agricultura de Chile. [en línea] Disponible en: <https://www.ODEPA.gob.cl/publicaciones/articulos/agricultura-organicaoportunidades-y-desafios> [Consulta: 12 de junio, 2020]
- [79] Reglamento (UE) n.º 2019/1009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 05 de junio de 2019, relativo a la puesta a disposición en el mercado de los productos fertilizantes.
- [80] Reporte de Notificaciones 2017. Red de Información y Alertas Alimentarias (RIAL), Agencia Chilena para la Inocuidad y Calidad Alimentaria. [en línea] Disponible en: <https://www.achipia.gob.cl/wp-content/uploads/2019/02/OR.Informe-RIAL-2017-.pdf> [Consulta: 15 de junio, 2020].
- [81] Eguillor, P. 2020. *Agricultura orgánica chilena: estadísticas sectoriales 2019*. Departamento de Política Sectorial y Análisis de Mercado. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias – ODEPA, Ministerio de Agricultura.
- [82] Oficina de Estudios y Políticas Agrarias. 2019. *Panorama de la agricultura chilena*.

ODEPA, Ministerio de Agricultura.

- [83] AM Ecological S.A. Etiqueta producto TwinN. [en línea] Disponible en: <https://am.kull.cl/wp-content/uploads/2018/07/Etiqueta-Twin-N-1.jpg> [Consulta: 06 de diciembre, 2020].
- [84] Castillo1, C., Huenchuleo, M., Michaud, A., Solano, J. 2016. *Micorrización en un cultivo de papa adicionado del biofertilizante Twin-N establecido en un Andisol de la Región de La Araucanía*. Volumen 34, N° 1. Páginas 39-45 IDESIA (Chile) Enero-Febrero, 2016.
- [85] Brizuela, M., Serrano, P., Rodríguez, D., Iglesias, I., Almazán, O. 2005. *Recuperación y Secado de Lactobacillus rhamnosus para su empleo como probiótico en la salud animal*. Revista Cubana de Química, Vol. XVII, núm.1, pp.150-151.
- [86] Rojas, D., Ortiz, M., Rivera, D., Kloepper, J., Bonilla, R. 2013. *Evaluation of three methods for preservation of Azotobacter chroococcum and Azotobacter vinelandii*. Universitas Scientiarum, vol.18, n.2, pp.129-139.
- [87] Burris, R., Fu, H., Hartmann, A. 1988. *Influence of Amino Acids on Nitrogen Fixation Ability and Growth of Azospirillum spp.* Applied and Environmental Microbiology, 87-93.
- [88] Cutshall, D., Vigil, G., Westby, C. 1983. *Metabolism of Various Carbon Sources by Azospirillum brasilense*. Journal of Bacteriology, 1369-1372.
- [89] de Bashan, L. E., Holguin, G., Glick, B., Bashan, Y. 2007. *Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales*. En A. Alarcón, & R. Ferrata-Cerrato (Edits.), Microbiología agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico, planta-microorganismo págs. 170-224. Ciudad de México, México: Trillas.
- [90] Albrecht, S., Burris, R., Okon, Y. 1976. *Carbon and Ammonia Metabolism of A. lipoferrum*. Journal of Bacteriology, 592-597.
- [91] Burris, R., Burpee, C., Del Gallo, M., Martinez-Drets, G. 1984. *Catabolism of Carbohydrates and Organic Acids and Expression of Nitrogenase by Azospirillum spp.* Journal of Bacteriology, 80-85.
- [92] Tchan, Y., New, P. 1984. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Azotobacteraceae, Krieg, and JG., Holt (ed). Williams & Wilkins, Baltimore.
- [93] Becking, J. 2006. *The Family Azotobacteraceae*. Chapter 3.3.26. 6, 759-783.
- [94] Díaz-Barrera, A., Soto, E. 2010. *Biotechnological uses of Azotobacter vinelandii: Current state, limits and prospects*. African Journal of Biotechnology, 9(33), 5240-5250.
- [95] Steenhoudt, O., Vanderleyden, J. 2000. *Azospirillum, a free-living nitrogen fixing bacteria associated with grasses: Genetic, biochemical and ecological aspects*. FEMS Microbiol., 24, 487-506.
- [96] Rivera, M. 2008. *Optimización de un medio de cultivo para la producción de un inoculante con base en A. brasilense C16*. Universidad Francisco de Paula Santander, 92pp.

- [97] Dahm, H. 1993. *Production of B-group vitamins by Azospirillum spp. grown in media of different pH at different temperatures.* Z. Mikrobiol., 148, 195-203.
- [98] Paul, E., Mulard, D., Blanc, P., Fages, J. Goma, G., Pareilleux, A. 1990. *Effects of partial O₂ pressure, partial CO₂ pressure, and agitation on growth kinetics of Azospirillum lipoferum under fermentor conditions.* Applied and Environmental Microbiology, Nov. 1990, p. 3235-3239.
- [99] Del Gallo, M., Gratani, L., Morpurgo, G. 1988. *Selection at the chemostat of Azospirillum brasilense Cd N₂-fixing at high O₂ pressure.* W. Klingmuller (ed.), Azospirillum. IV. Genetics, physiology, ecology. Springer Verlag, Berlin.
- [100] Saribay, G. 2003. *Growth and dynamic nitrogen fixation dynamics of Azotobacter chroococcum nitrogen-free and own containing medium.* Tesis de maestria en ciencias aplicadas, 1-45.
- [101] Oros, D., Pavlečić, M., Šantek, B. Novak, S. 2011. *Cultivation of the bacterium Azotobacter chroococcum for preparation of biofertilizers.* African Journal of Biotechnology Vol. 10(16), pp. 3104-3111.
- [102] Balandreau, J. 1986. *Ecological factors and adaptive processes in N₂-fixing bacterial population of the plant environment.* Plant and Soil, 29, 73pp.
- [103] Mejía, M., Segura, D., Espín, G., Galindo, E., Peña, C. 2010. *Two-stage fermentation process for alginate production by Azotobacter vinelandii mutant altered in poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) synthesis.* J Appl Microbiol., 108, pp. 55-61.
- [104] R. Thavasi, Subramanyam Nambaru, V., Jayalakshmi, S., Balasubramanian, T., Banat, I. 2009. *Biosurfactant production by Azotobacter chroococcum isolated from the marine environment.* Mar Biotechnol., 11, pp. 551-556.
- [105] Peña, C., Millán, M., Galindo, E. 2008. *Production of alginate by Azotobacter vinelandii in a stirred fermentor simulating the evolution of power input observed in shake flasks.* Process Biochem., 43, pp. 775-778.
- [106] Camelo, M., Moreno, A., Romero, F., Bonilla, R. 2017. *Desarrollo de un sistema de fermentación líquida y de enquistamiento para una bacteria fijadora de nitrógeno con potencial como biofertilizante.* Revista Argentina de Microbiología, Volume 49, Issue 3, pp. 289-296.
- [107] Zavala, J., Alcarraz, M., Julian, J. 2020. *Evaluación para la producción de Azotobacter sp. promotor de crecimiento para cultivos de Coffea arabica.* Ciencia e Investigación 2020 23(1):45-50.
- [108] Segura, D., Guzmán, J., Espín, G. 2003. *Azotobacter vinelandii mutants that overproduce poly-beta-hydroxybutyrate or alginate.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 63: 159-163.
- [109] Gimmetstad, M., Steigedal, M., Ertesvåg, H., Moreno, S., Christensen, B., Espín, G., Valla, S. 2006. *Identification and characterization of an Azotobacter vinelandii type I se-*

- cretion system responsible for export of the AlgE-Type mannuronan C-5-epimerases. *J. Bacteriol.* 188: 5551-5560.
- [110] Sabra, W., Zeng, A., Deckwer, W. 2001. *Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects.* *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 315-325.
- [111] Tsagou, V., Aggelis, G. 2006. *Growth dynamics of Azospirillum lipoferum at steady and transitory states in the presence of NH₄.* The Society for Applied Microbiology, *Journal of Applied Microbiology* 100 286-295.
- [112] Fages, J. 1990. *An optimized process for manufacturing an Azospirillum inoculant for crops.* *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32:473-478.
- [113] Peña, C., Campos, N., Galindo, E. 1997. *Changes in alginate molecular mass distributions, broth viscosity and morphology of Azotobacter vinelandii cultured in shake flasks.* *Appl Microbiol Biotechnol*, 510-515.
- [114] Roush, D., Lu, Y. 2008. *Advances in primary recovery: Centrifugation and membrane technology.* *Biotechnol. Prog.* 24, 488-495.
- [115] Wiesmann, U., Binder, H. 1982. *Biomass separation from liquids by sedimentation and centrifugation.* *Adv. Biochem. Eng.* 24, 119-171.
- [116] Tejeda, A., Montesinos, R., Guzmán, R. 2011. *Bioseparaciones.* Segunda edición. Pearson Educación, México.
- [117] Rojas, D., Ortiz, M., Rivera, D., Kloepper, J., Bonilla, R. 2013. *Evaluation of three methods for preservation of Azotobacter chroococcum and Azotobacter vinelandii.* *Universitas Scientiarum* 18(2): 129-139.
- [118] Díaz, Á., Altamirano, C., Gutierrez, C., Martínez, F. 2013. *Production of alginate by Azotobacter vinelandii grown at two bioreactor scales under oxygen-limited conditions.* *Bioprocess Biosyst Eng*, 8.
- [119] Cedeño, L. 2018. *Fundamentos básicos de cálculos de ingeniería química con enfoque en alimentos.* Universidad Técnica de Machala. Ediciones UTMACH.
- [120] Gélinas, P. 2017. *Compressed Baker's Yeast: Mapping Patents on Post-Fermentation Processes.* Institute of Food Technologists. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Volume 16, Issue 3, 2017.
- [121] Koza, C. 2012. *Development of solid-liquid separation technologies in bioprocessing.* Graduate Theses and Dissertations. 12813. Iowa State University.
- [122] Marin, A., Zaira, T., Cortés, R., Montoya, C., Olga, I. 2009. *Evaluación de la viabilidad de crecimiento de la cepa nativa Lactobacillus plantarum LPBM10 y la cepa comercial Lactobacillus casei ATCC 393 en pulpa de uchuva y en solución isotónica de glucosa.* *Vitae*, 16(2), 210-217.
- [123] Biocultivos S.A. *Ficha Técnica. Cepa Azotobacter chroococcum.* [en línea] Disponible en:

- <http://www.biocultivos.com.co/dctos/Ficha+Tecnica+Azotobacter+Chroococcum.pdf> [Consulta: 12 de noviembre, 2020].
- [124] Pérez, J., Casas, M. 2005. *Estudio de la interacción Planta- en el cultivo de caña de azúcar (Saccharum sp.)*. Cultivos Tropicales, 2005, vol. 26, no. 4, p. 13-19.
- [125] Japan Atomic Industrial Forum (JAIF). 2006. *Biofertilizer Manual*. [en línea] Disponible en: https://www.fnca.mext.go.jp/english/bf/bfm/pdf/Biofertilizer_Manual.pdf [Consulta: 14 de noviembre, 2020].
- [126] Trujillo, M., Valdez, N., Gonzalez, C., Acevedo, E., Martínez, C., García, R., Gamboa, R., Marín, L., Villegas, J., Blancas, A. 2013. *Scale-up from shake flasks to pilot-scale production of the plant growth-promoting bacterium Azospirillum brasilense for preparing a liquid inoculant formulation*. Applied Microbiology and Biotechnology, 97(22), 9665–9674.
- [127] Acevedo, F., Gentina, J., Illanes, A. 2002. *Fundamentos de Ingeniería Bioquímica*. Valparaíso: Ediciones Universitarias de Valparaíso.
- [128] ThermExcel. 2003. *Physical characteristics of water (at the atmospheric pressure)* [en línea]. Disponible en: https://www.thermexcel.com/english/tables/eau_atm.htm [Consulta: 04 de diciembre, 2020].
- [129] Dalian Reyes Import & Export Co. Ltd. *Gq105j Liquid Solid Tubular Bowl Centrifuge for Bacteria*. [en línea]. Disponible en <https://dlreyes.en.made-in-china.com/product/tCcQqkLEhuWd/China-Gq105j-Liquid-Solid-Tubular-Bowl-Centrifuge-for-Bacteria.html> [Consulta: 24 de noviembre, 2020].
- [130] Pieracci, J., Armando, J., Westoby, M., Thommes, J. 2018. *Industry Review of Cell Separation and Product Harvesting Methods*. Biopharmaceutical Processing, 165–206.
- [131] NIST. 2018. *The NIST Reference on Constants, Units, and Uncertainty* [en línea]. Disponible en: <https://physics.nist.gov/cgi-bin/cuu/Value?gn> [Consulta: 04 de diciembre, 2020].
- [132] SERLABO TECHNOLOGIES. 2016. *A Guide to Freeze Drying for the Laboratory*. By Labconco Corporation. Printed in the U.S.A.
- [133] OPS Diagnostics. *Bacteria Lyophilization Overview* [en línea] Disponible en: https://opsdiagnostics.com/notes/ranpri/bacteria_lyophilization_overview.htm [Consulta: 15 de noviembre, 2020].
- [134] Cengel, Y., Ghajar, A. 2007. *Transferencia de Calor y Masa - Apéndice 1 Tabla A-3*. Tercera edición. Editorial Mc Graw Hill.
- [135] H. Kopp. 1844. *Ueber die Ausdehnung einiger fester Körper durch die Wärme*. Ann. Chem. Pharm. 81. 1. 1S52.
- [136] Horger, J. et al. 1958. *ASME Handbook: metals properties*. Volumen 2. Editorial McGraw-Hill. Universidad de Michigan.

- [137] Archila, S. 2002. *Propuesta de diseño de un equipo de liofilización para el laboratorio de operaciones unitarias*. Universidad de la Sabana, Facultad de Ingeniería. Santafé de Bogotá.
- [138] Megyesy, Eugene. 1997. *Manual de Recipientes a Presión*. Traducción México. Primera reimpresión. Editorial Limusa S.A. de C.V.
- [139] Bakken, L., Olsen, R. 1983. *Densidades de flotación y contenido de materia seca de microorganismos: conversión de un biovolumen medido en biomasa*. Microbiología aplicada y ambiental , 45 (4), 1188-1195.
- [140] Bannwarth, H. 2005. *Liquid Ring Vacuum Pumps*. Editorial WILEY-VCH, Alemania.
- [141] Peters, M., Timmerhaus, K., West, R. E. 2003. *Plant Design and Economics for Chemical Engineers*. Nueva York: McGraw-Hill.
- [142] Zugarramurdi, A., Parín, M., Lupín, H. 1998. *Ingeniería económica aplicada a la industria pesquera*. FAO Documento Técnico de Pesca. No. 351. Roma, FAO.
- [143] Llamas Laboratorio y Servicio. *Programa de Desinfección de Rutina*. [en línea] Disponible en: <http://www.laboratoriollamas.com.ar/articulos/general/Desinfeccion%20y%20calculo%20de%20producto.pdf> [Consulta, 12 de mayo, 2021].
- [144] E-agro. *Twin N*. [en línea] Disponible en: <https://www.eagro.cl/product/twin-n/> [Consulta, 29 de marzo, 2021].
- [145] Servicio de Impuestos Internos. Impuesto a la Renta de Primera Categoría (Artículo 20 Ley de Impuesto a la Renta). Circular N° 52, 10.10.2014.
- [146] Servicio de Impuestos Internos. Nueva Tabla de Vida Útil fijada por el Servicio de Impuestos Internos para bienes físicos del activo inmovilizado. Resolución N°43, de 26-12-2002, con vigencia a partir del 01-01-2003.
- [147] Brealey, R., Myers, S. 1990. *Principios de Finanzas Corporativas*. McGraw Hill. 2ª Ed. España.
- [148] Sonntag, R., Borgnakke, C. 2006. *Introducción a la termodinámica para ingeniería*. Editorial Limusa. México.
- [149] Dossat, R. 1997. *Principios de refrigeración*. Décima séptima edición. Editorial Continental. México.
- [150] Martínez, I. 1992. *Termodinámica Básica y Aplicada. Termodinámica de las mezclas*. Capítulo 7. Editorial Dossat S.A. Madrid, España.
- [151] Abbott, B., Clamen, A. 1973. *The relationship of substrate, growth rate, and maintenance coefficient to single cell protein production*. Biotechnol. Bioeng. 15, 117–127.
- [152] Universidad Veracruzana. 2013. *Termodinámica Aplicada - Formulario*. [en línea] Disponible en: <https://www.uv.mx/personal/tangarcia/files/2013/07/>

FormularioTermo13.pdf [Consulta: 21 de noviembre, 2020].

[153] Distribuidora Metálica S.A. de C.V. *Acero inoxidable*. [en línea] Disponible en: https://www.metlica.com.mx/pdf/DM_PLANOS.pdf [Consulta: 16 de noviembre, 2020].

[154] Ferdinand, P., Beer, E., Russell, J. 1990. *Mecánica Vectorial para Ingenieros - Estática*. Ediciones McGraw-Hill.

A. Proyectos financiados por la Fundación para la Innovación Agraria (FIA)

Tabla A.1: Proyectos ligados a biofertilizantes, financiados por la FIA.

Año de inicio	Año de término	Proyecto	Ejecutor	Objetivos
1998	2002	Desarrollo de Biofertilizantes para el Cultivo de Arroz en Chile	Universidad de Talca	Desarrollar y evaluar biofertilizantes para el cultivo de arroz, en base a microalgas fijadoras de nitrógeno. Desarrollar y transferir paquetes tecnológicos compatibles con el uso de biofertilizantes en arroz.
2007	2010	Biofertilizantes Microbianos : Preparación de Inoculantes Micorrizicos sobre Matrices Porosas Inertes	Universidad de la Frontera, Facultad de Ingeniería, Ciencias y Administración, Depto. de Ingeniería Química	
2010	2014	Biofertilizantes en Base a Rizobacterias para disminuir el uso de Nutrientes Fosforados en el Trigo y Cebada	Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias	Detectar, establecer y bioformular cuatro nuevos tipos de bacterias solubilizadoras de fósforo, evaluarlas en pruebas de campo y aplicarlas como prototipos funcionales para cultivos de trigo y cebada.

2010	2012	Nuevos Biofertilizantes Psicrofilos	Uxmal S.A.	Empaquetar la tecnología para producir un nuevo biofertilizante psicrofilo en base a bacterias antárticas.
2012	2015	Generación de un biofertilizante mediante el uso de genómica y microencapsulación para contribuir al desarrollo competitivo y sustentable del cultivo de lupino de alto rendimiento proteico en la agricultura familiar campesina del sur de Chile	Corporación Centro de Genómica Nutricional Agroacuícola - CGNA	Generar un biofertilizante para contribuir al desarrollo competitivo y sustentable del cultivo de lupino amarillo de alto rendimiento proteico en la agricultura familiar campesina del sur de Chile.
2012	2016	Desarrollo de biofertilizantes y creación de Planta Piloto de Producción	Agrícola, Forestal y Comercial Ródulo Enrique Rodón - BIOAGROTEC EIRL	Implementar una planta piloto para la producción masiva de bacterias solubilizadoras de fósforo, que permita la formulación de un producto microbiano de fosfobacterias autóctonas de las regiones del centro y sur de Chile con carácter comercial de uso agrícola y forestal.

2014	2015	Biofertilizante en Base a Hongos Micorrizógenos Antárticos	Universidad Mayor	Elaboración de un plan de negocios, el plan de trabajo para la ejecución de actividades de emprendimiento y la formalización de un acuerdo sobre propiedad intelectual del proyecto y conformación del emprendimiento contemplado en el marco del proyecto entre las partes involucradas.
2014	2015	Bioglomo: Biofertilizantes en Base a Hongos Glomeromycetes para la Agricultura Nacional	Universidad de Concepción	Elaboración de un plan de negocios, el plan de trabajo para la ejecución de actividades de emprendimiento y la formalización de un acuerdo sobre propiedad intelectual del proyecto y conformación del emprendimiento contemplado en el marco del proyecto entre las partes involucradas.
2015	2016	Biofertilizante en Base a Hongos Micorrizógenos Antárticos (Etapa II)	Universidad Mayor	
2015	2016	Bioglomo: Biofertilizantes en Base a Hongos Glomeromycetes para la Agricultura Nacional	Universidad de Concepción	

2015	2017	Validación técnica y comercial de nuevos biofertilizantes formulados en base a nanobiotecnología	Universidad de Concepción	Producir un prototipo tecnológico comercializable de un biofertilizante enzimático y un acondicionador de suelo formulados en base a nanobiotecnología y revalorización de residuos agropecuarios para ser introducidos al mercado de los biofertilizantes.
2015	2017	Rescate patrimonial del uso del alga Lamilla (<i>Ulva lactuca</i> L.) como biofertilizante en el cultivo de papa (<i>Solanum tuberosum</i> L.) mediante su validación agronómica en la comunidad indígena Lauquen Mapu de Catrumán, Chiloé	Lauquen Mapu de Catrumán	Rescatar y valorizar la práctica patrimonial del uso del alga Lamilla (<i>Ulva lactuca</i> L.) como biofertilizante en el cultivo de papa (<i>Solanum tuberosum</i> L.) mediante su validación agronómica en la comunidad indígena Lauquen Mapu de Catrumán, obteniendo un producto estabilizado.
2016	2016	Producción de un Biofertilizante en Base a Biocarbón Proveniente de Pirólisis de Residuos Agro-Industriales	Universidad de La Frontera	

2017	2017	Probatura y evaluación de un biofertilizante en base a una cepa de levadura muerta para el cultivo de hortalizas (tomate y pimentón) hasta el estado de plántulas y obtención de sus frutos en condiciones de vivero	Universidad Austral de Chile	Evaluar el Efecto del Biofertilizante en Base a la Cepa de Levadura Muerta <i>Kazachstania Exigua</i> Sobre la Biomasa y la Estimulación de Crecimiento Mediante el Contenido de Fitohormonas y del Precursor del Etileno en Plántulas y en la Obtención de Frutos de las Hortalizas (Tomate y Pimentón).
2017	2017	Utilización de cepas nativas de rhizobium como biofertilizante para las praderas naturales de la región de Magallanes y Antártica chilena	Universidad de Magallanes	Desarrollar un Inoculante Con Base en Bacterias Nativas del Género <i>Rhizobium</i> para Su Utilización como Biofertilizante para las Praderas de la Región de Magallanes y la Antártida Chilena.
2016	2018	Microagro: formulación de un biofertilizante microbiano	Marlene Henríquez Urrutia	Elaborar un bioinsumo a base de bacterias nativas que permita reducir el uso de fosfato químico en la agricultura.

2017	2018	Diseño de biofertilizantes en base a hongos micorrícicos arbusculares nativos del sur de Chile para su utilización en la agricultura	Universidad de La Frontera	<p>Prototipo de biofertilizante. - Descripción del resultado: el producto se presentará en forma de polvo granulado o polvo arcilloso en un recipiente plástico sellado en un empaque de cartón con diseño explicativo y alusivo al producto, el formato a presentar será en kilogramos, los tamaños serán definidos a lo largo del proyecto.</p> <p>El producto será aplicado directamente (dosificado) a la siembra y/o trasplante, las dosis serán definidas a lo largo del proyecto.</p>
2019	2021	BIOLUX: Desarrollo de un biofertilizante microbiano optimizado para la producción orgánica	Manuel Alejandro Abarca Marzán	Caracterizar el consorcio microbiano presente en la formulación BIOLUX y evaluar la efectividad de este como biofertilizante en cultivos modelos.

B. Resumen balance de masa

A continuación se presentan tablas resúmenes con la composición de las corrientes al inicio y término de cada operación.

Tabla B.1: Operación en matraz - cultivo de *Azotobacter chroococcum*.

Flujos						
Nombre corriente	Descripción corriente	Entrada [g]	Entrada [L]	Entrada [g/L]	Composición	[g] en corriente
S1	Preinóculo	30	0,03	994	Medio de cultivo sin sacarosa	29,82
					Sacarosa	0
				6	Microorganismos	0,18
F1	Medio de cultivo	270	0,27	981	Medio de cultivo sin sacarosa	264,87
				19	Sacarosa	5,13
Nombre corriente	Descripción corriente	Salida [g]	Salida [L]	Salida [g/L]	Composición	[g] en corriente
F2	Caldo de cultivo	300	0,3	6	Microorganismos	1,8
				4	Sacarosa	1,2
				990	Medio de cultivo sin sacarosa	297

Tabla B.2: Operación en matraz - cultivo de *Azospirillum lipoferum*.

Flujos						
Nombre corriente	Descripción corriente	Entrada [g]	Entrada [L]	Entrada [g/L]	Composición	[g] en corriente
S1'	Preinóculo	30	0,03	994	Medio de cultivo sin sacarosa	29,82
					Glucosa	0
				6	Microorganismos	0,18
F1'	Medio de cultivo	270	0,27	980	Medio de cultivo sin glucosa	264,6
				20	Glucosa	5,4
Nombre corriente	Descripción corriente	Salida [g]	Salida [L]	Salida [g/L]	Composición	[g] en corriente
F2'	Caldo de cultivo	300	0,3	7,6	Microorganismos	2,28
				4,1	Glucosa	1,23
				988,3	Medio de cultivo sin glucosa	296,5

Tabla B.3: Reactor de 3 litros - cultivo de *Azotobacter chroococcum*.

Flujos						
Nombre corriente	Descripción corriente	Entrada [g]	Entrada [L]	Entrada [g/L]	Composición	[g] en corriente
F2	Caldo de cultivo	300	0,3	6	Microorganismos	1,8
				4	Sacarosa	1,2
				990	Medio de cultivo sin sacarosa	297
F3	Medio de cultivo	2.700	2,70	981	Medio de cultivo sin sacarosa	2.648,7
				19	Sacarosa	51,3
Nombre corriente	Descripción corriente	Salida [g]	Salida [L]	Salida [g/L]	Composición	[g] en corriente
F4	Caldo de cultivo	3.000	3	7,5	Microorganismos	22,5
				0,8	Sacarosa	2,5
				991,7	Medio de cultivo sin sacarosa	2.975

Tabla B.4: Reactor de 3 litros - cultivo de *Azospirillum lipoferum*.

Flujos						
Nombre corriente	Descripción corriente	Entrada [g]	Entrada [L]	Entrada [g/L]	Composición	[g] en corriente
F2'	Caldo de cultivo	300	0,3	7,6	Microorganismos	2,3
				4,1	Glucosa	1,2
				988,3	Medio de cultivo sin glucosa	296,5
F3'	Medio de cultivo	2.700	2,70	980	Medio de cultivo sin glucosa	2.646
				20	Glucosa	54
Nombre corriente	Descripción corriente	Salida [g]	Salida [L]	Salida [g/L]	Composición	[g] en corriente
F4'	Caldo de cultivo	3.000	3	9,7	Microorganismos	29,1
				0,7	Glucosa	2
				989,6	Medio de cultivo sin glucosa	2.968,9

Tabla B.5: Operación *batch* en Reactor 30L - *Azotobacter chroococcum*.

Flujos						
Nombre corriente	Descripción corriente	Entrada [g]	Entrada [L]	Entrada [g/L]	Composición	[g] en corriente
F4	Caldo de cultivo	3.000	3	7,5	Microorganismos	22,5
				0,8	Sacarosa	2,5
				991,7	Medio de cultivo sin sacarosa	2.975
F5	Medio de cultivo	7.000	7	981	Medio de cultivo sin sacarosa	6.867
				19	Sacarosa	133
Nombre corriente	Descripción corriente	Salida [g]	Salida [L]	Salida [g/L]	Composición	[g] en corriente
<i>Batch</i>	Caldo de cultivo	10.000	10	7,8	Microorganismos	78
				0,1	Sacarosa	1,4
				992,1	Medio de cultivo sin sacarosa	9.920,6

Tabla B.6: Operación *fed-batch* Reactor 30L - *Azotobacter chroococcum*.

Flujos						
Nombre corriente	Descripción corriente	Entrada [g]	Entrada [L]	Entrada [g/L]	Composición	[g] en corriente
<i>Batch</i>	Caldo de cultivo	10.000	10	7,8	Microorganismos	78
				0,14	Sacarosa	1,4
				992,06	Medio de cultivo sin sacarosa	9.920,6
F6	Fuente de carbono	10.000	20,7	45	Sacarosa	931
				955	Agua	19.759
Nombre corriente	Descripción corriente	Salida [g]	Salida [L]	Salida [g/L]	Composición	[g] en corriente
F7	Caldo de cultivo	30.690	30,7	15,1	Microorganismos	463
				0,04	Sacarosa	2
				984,86	Medio de cultivo sin sacarosa	30.225

Tabla B.7: Operación *batch* en Reactor 30L - *Azospirillum lipoferum*.

Flujos						
Nombre corriente	Descripción corriente	Entrada [g]	Entrada [L]	Entrada [g/L]	Composición	[g] en corriente
F4'	Caldo de cultivo	3.000	3	9,7	Microorganismos	29,1
				0,7	Glucosa	2
				989,6	Medio de cultivo sin glucosa	2.968,9
F5'	Medio de cultivo	7.000	7	980	Medio de cultivo sin glucosa	6.860
				20	Glucosa	140
Nombre corriente	Descripción corriente	Salida [g]	Salida [L]	Salida [g/L]	Composición	[g] en corriente
<i>Batch</i> '	Caldo de cultivo	10.000	10	10	Microorganismos	100
				0,1	Glucosa	1,3
				989,9	Medio de cultivo sin glucosa	9.898,7

Tabla B.8: Operación *fed-batch* Reactor 30L - *Azospirillum lipoferum*.

Flujos						
Nombre corriente	Descripción corriente	Entrada [g]	Entrada [L]	Entrada [g/L]	Composición	[g] en corriente
<i>Batch</i> '	Caldo de cultivo	10.000	10	10	Microorganismos	100
				0,1	Glucosa	1,3
				989,9	Medio de cultivo sin glucosa	9.898,7
F6'	Fuente de carbono	10.000	20,6	35	Glucosa	721
				965	Agua	19.879
Nombre corriente	Descripción corriente	Salida [g]	Salida [L]	Salida [g/L]	Composición	[g] en corriente
F7'	Caldo de cultivo	30.593	30,6	15,1	Microorganismos	463
				0,04	Glucosa	2
				984,86	Medio de cultivo sin glucosa	30.128

C. Tablas de vapor

A continuación, en la Tabla C.1 se muestran los valores de la presión de vapor del hielo a diferentes temperaturas.

Tabla C.1: Presión de vapor del hielo [148].

Temperatura [°C]	Presión [Pa]	Presión [mbar]	Temperatura [°C]	Presión [Pa]	Presión [mbar]	Temperatura [°C]	Presión [Pa]	Presión [mbar]
0,0	611,150	6,112	-15,0	165,300	1,653	-30,0	38,010	0,380
-1,0	562,670	5,627	-16,0	150,680	1,507	-31,0	34,240	0,342
-1,5	539,770	5,398	-16,5	143,820	1,438	-31,5	32,490	0,325
-2,0	517,720	5,177	-17,0	137,250	1,373	-32,0	30,820	0,308
-3,0	476,060	4,761	-18,0	124,920	1,249	-33,0	27,710	0,277
-3,5	456,390	4,564	-18,5	119,150	1,192	-33,5	26,270	0,263
-4,0	437,470	4,375	-19,0	113,620	1,136	-34,0	24,900	0,249
-5,0	401,760	4,018	-20,0	103,260	1,033	-35,0	22,350	0,224
-5,5	384,920	3,849	-20,5	98,410	0,984	-35,5	21,160	0,212
-6,0	368,730	3,687	-21,0	93,770	0,938	-36,0	20,040	0,200
-7,0	338,190	3,382	-22,0	85,100	0,851	-37,0	17,960	0,180
-7,5	323,800	3,238	-22,5	81,040	0,810	-37,5	16,990	0,170
-8,0	309,980	3,100	-23,0	77,160	0,772	-38,0	16,070	0,161
-8,5	296,700	2,967	-23,5	73,450	0,735	-38,5	15,200	0,152
-9,0	283,940	2,839	-24,0	69,910	0,699	-39,0	14,370	0,144
-9,5	271,680	2,717	-24,5	66,520	0,665	-39,5	13,590	0,136
-10,0	259,900	2,599	-25,0	63,290	0,633	-40,0	12,840	0,128
-10,5	248,590	2,486	-25,5	60,200	0,602	-45,0	7,202	0,072
-11,0	237,740	2,377	-26,0	57,250	0,573	-50,0	3,936	0,039
-11,5	227,320	2,273	-26,5	54,430	0,544	-55,0	2,093	0,021
-12,0	217,320	2,173	-27,0	51,740	0,517	-60,0	1,080	0,011
-12,5	207,730	2,077	-27,5	49,180	0,492	-65,0	0,540	0,005
-13,0	198,520	1,985	-28,0	46,730	0,467	-70,0	0,261	0,003
-13,5	189,690	1,897	-28,5	44,390	0,444	-75,0	0,122	0,001
-14,0	181,220	1,812	-29,0	42,160	0,422	-80,0	0,055	0,001
-14,5	173,090	1,731	-29,5	40,040	0,400			

D. Calor a retirar del producto

Calor cedido por el producto

La carga asociada al producto, hace referencia al calor que debe ser eliminado para que la temperatura del producto baje hasta el valor deseado [149]. En este caso el producto es congelado a una temperatura inferior a su temperatura de congelación, por lo que su carga de enfriamiento se calcula en tres partes:

1. Calor cedido por el producto al enfriarse desde la temperatura de entrada hasta la temperatura de congelación (25 °C a - 3 °C).

Para estimar este valor, se utiliza la siguiente expresión de calor.

$$Q_1 = m \cdot C_p \cdot \Delta T$$

Donde:

- m : Masa del producto.
- C_p : Calor específico del producto.
- ΔT : Diferencia de temperaturas.

La masa del producto considerada para el diseño es de 2,78 [kg], tal como se estableció previamente. Por otro lado, la capacidad calorífica del producto, que se compone por bacterias y medio de cultivo, se estima mediante la Ecuación D.1 [150].

$$C_{p \text{ Mezcla}} = X_A \cdot C_{pA} + X_B \cdot C_{pB} + \dots \quad (\text{D.1})$$

Para estimar el calor específico C_p de las bacterias, se utiliza la regla de Kopp, representada en la Ecuación D.2 [135], para un microorganismo de fórmula $C_\alpha H_\beta O_\gamma N_\delta$.

$$C_p \text{ [J/mol} \cdot \text{K]} = \alpha \cdot C_{pC} + \beta \cdot C_{pH} + \gamma \cdot C_{pO} + \delta \cdot C_{pN} \quad (\text{D.2})$$

El valor de los calores específicos atómicos se presenta a continuación en la Tabla D.2.

Tabla D.2: Capacidades caloríficas atómicas [135].

Elemento	Capacidad calorífica en estado sólido [J/átomo K]
C	7,524
H	9,614
O	16,720
P	22,572
S	-
Otros	25,916

Se considera la fórmula general para bacterias igual a $CH_{1,666}O_{0,270}N_{0,200}$ [151]. Utilizando la Ecuación D.2 y los Datos de la Tabla D.2, se obtiene la capacidad calorífica de las bacterias.

$$C_{p_{Bact}} [J/mol \cdot K] = 1 \cdot 7,524 + 1,666 \cdot 9,614 + 0,27 \cdot 16,72 + 0,2 \cdot 25,916 = 33,24 [J/mol \cdot K]$$

Además, tomando en consideración que la masa molar de las bacterias es igual a 25,5 [g/mol] [152], se obtiene el siguiente valor para el C_p :

$$C_{p_{Bact}} = \frac{33,24 [J/mol \cdot K]}{25,5 [g/mol]} = 1,303 [J/g \cdot K]$$

Por otro lado, el agua tiene un C_p igual a 4,18 [J/g · K], por lo que, al utilizar la Ecuación D.1 y las composiciones al inicio (obtenidas mediante el Balance de Masas), se obtiene el calor específico de la mezcla a liofilizar.

$$C_{p_{Mezcla}} = 0,3 \cdot 1,303 [J/g \cdot K] + 0,7 \cdot 4,18 [J/g \cdot K] = 3,32 [J/g \cdot K] = 3,32 [kJ/kg \cdot K]$$

Finalmente, considerando que la diferencia de temperaturas ΔT es igual a 28 °C (25°C – (–3°C)), al reemplazar los valores en la ecuación de calor cedido por el producto, se obtiene:

$$Q_1 = 2,78 [kg] \cdot 3,32 [kJ/kg \cdot K] \cdot 28^\circ C = 258,4 [kJ]$$

2. Calor cedido por el producto durante su solidificación o congelación

Para determinar cuánto calor cede el producto durante su congelación, se utiliza la siguiente expresión:

$$Q_2 = m \cdot \lambda_f$$

Donde m es la masa del producto y λ_f corresponde al calor latente de fusión. En este caso particular, la masa fue determinada con anterioridad (2,78 [kg]) y el calor latente de fusión se estima considerando alimentos que presenten una humedad similar a la de la mezcla (70%), puesto que no se encuentran datos específicos para bacterias. En este caso, el valor de λ_f utilizado es 235,5 [kJ/kg] [134]. Reemplazando en la ecuación anterior se obtiene:

$$Q_2 = 2,78 [kg] \cdot 235,5 [kJ/kg] = 654,7 [kJ]$$

3. Calor cedido por el producto para enfriarse desde su temperatura de congelación hasta la temperatura final

Para determinar el calor cedido para reducir la temperatura desde -3 °C a -50 °C se utiliza la siguiente expresión:

$$Q_3 = m \cdot Cp_2 \cdot \Delta T$$

Donde la masa m corresponde a 2,78 [kg], Cp_2 la capacidad calorífica del producto bajo el punto de congelación y ΔT es igual a 47°C (-50°C - (-3 °C)). El valor de Cp_2 se obtiene a partir de alimentos que tengan un porcentaje de agua similar al producto a (70%), en este caso se considera 1,77 [kJ/kg] [134].

Reemplazando se obtiene:

$$Q_3 = 2,78 \text{ [kg]} \cdot 1,77 \text{ [kJ/kg]} \cdot 47^\circ\text{C} = 231,3 \text{ [kJ]}$$

De esta manera, el calor total a retirar del producto es:

$$Q_{\text{Producto}} = Q_1 + Q_2 + Q_3$$

$$Q_{\text{Producto}} = 258,4 \text{ [kJ]} + 654,7 \text{ [kJ]} + 231,3 \text{ [kJ]}$$

$$Q_{\text{Producto}} = 1.144,4 \text{ [kJ]}$$

E. Diseño alternativo de liofilizador.

Es posible diseñar otros modelos de liofilizadores, los cuales tienen un acceso frontal a las bandejas. A continuación, se propone un diseño alternativo para el equipo.

E.1. Esquema del proceso

El diagrama que define la entrada y salidas del equipo se aprecia en la Figura E.1.

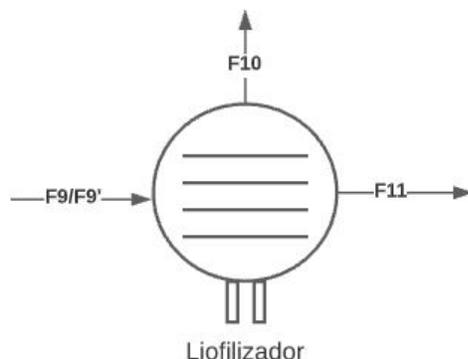


Figura E.1: Diagrama liofilizador.

E.2. Datos

Para el dimensionamiento del liofilizador se consideran los mismo parámetros que el Capítulo 9, como se observa en la Tabla E.3.

Tabla E.3: Parámetros de diseño para el liofilizador.

Parámetro	Valor	Unidad	Referencia
Temperatura de entrada del producto	25	[°C]	En este trabajo
Temperatura eutéctica	-30	[°C]	Estimada [132]
Temperatura mínima de la cámara de secado	-50	[°C]	[133]
Temperatura máxima sistema de calentamiento	50	[°C]	En este trabajo
Temperatura mínima del condensador	-80	[°C]	En este trabajo
Vacío máximo alcanzable (Presión mínima de la cámara)	0,01	[mbar]	Estimada [134]

E.3. Justificación de elección de parámetros

Los supuestos considerados para el dimensionamiento del liofilizador, son los mismo presentados en el Capítulo 9, salvo por la siguiente excepción:

- Tal como se presenta en el Capítulo Balance de Masa, se requiere procesar alrededor de 2,65 litros de torta, equivalente a 2,78 [kg] (considerando la densidad de la torta).

Para dejar un margen de seguridad por si en futuro se decide aumentar la producción, se propone que el liofilizador tenga una capacidad de 4 [kg].

- La temperatura de las placas de calentamiento, varía dependiendo de la resistencia del producto al calor, por lo que oscila entre 30 °C a 50°C. Se selecciona una temperatura de 50°C, pues permite variar la temperatura y reducirla en caso de ser necesario.

E.3.1. Diseño de la cámara de liofilización

Selección del material

Para la selección del material de construcción, se debe considerar que la cámara será sometida a bajas presiones. En el caso de la industria biotecnológica, farmacéutica y de alimentos, suele recomendarse el acero inoxidable, especialmente para las superficies que entran en contacto con los productos, donde los más recomendados suelen ser AISI 304 y AISI 316. Ambos materiales tienen propiedades mecánicas y térmicas similares [136], sin embargo se diferencian en que el acero AISI 304 es atacado por los ácidos cítricos y lácticos, los cuales suelen generarse en medios biológicos, mientras que el acero AISI 316 suele ser más resistente a estos ataques corrosivos. Es por esto que, se determina que la cámara de vacío considerará acero AISI 316 para su construcción.

Forma de la cámara

Para determinar la forma de la cámara, es necesario tomar en consideración la resistencia necesaria para soportar la diferencia de presión, la disponibilidad de material con la geometría requerida y por último, la facilidad para su construcción y unión de partes [137].

Comercialmente, las principales geometrías de cámaras son cilíndricas y cúbicas. Las cilíndricas tienen como ventaja una mayor resistencia para soportar la presión exterior, igual a la presión atmosférica máxima (760 [mmHg]). Además, esta geometría significa una menor área de material empleado, y dado que tiene una mayor resistencia a la presión, entonces requiere un menor espesor. Esto se traduce en una reducción en el costo de volumen de material empleado y en consecuencia, en una reducción en el peso final de la cámara [138]. Es por esto que se determina que la cámara tendrá una geometría cilíndrica.

E.3.1.1. Tamaño de la cámara de vacío

Para determinar el tamaño, es necesario tener en consideración los siguientes aspectos:

- Capacidad de la cámara y número de niveles
- Densidad del producto a procesar
- Espesor del producto
- Espacio entre placas
- Espesor de las placas

La capacidad de la cámara se definió previamente para 4 [kg] de torta, además, se considera una densidad de 1.050 [kg/m³] para las bacterias [139]. Esto significa que la capacidad máxima a liofilizar de la cámara de vacío vendrá dada al considerar 4 [kg] de microorganismos con la densidad antes mencionada, lo que es equivalente a 3,8 [L].

Se determina además que la cámara contará con 5 niveles, los cuales tendrán una capacidad máxima de retención de 0,8 [kg], de esta forma permiten el procesamiento de 4 [kg] de torta. Además, cada nivel cuenta con una placa intercambiadora de calor donde circulará el fluido de transferencia (para la etapa de congelación del producto) y además, estas contarán con resistencia para suministrar calor para las etapas posteriores a la congelación.

La torta a liofilizar se dispondrá en las bandejas con un espesor de 1 [cm], esto considerando que es un proceso que requiere bastante tiempo, donde el espesor del producto tendrá incidencia directa en la duración de la etapa. Acorde a bibliografía, espesores cercanos a 1 [cm] tardan entre 10 a 12 horas en secarse, por lo que se determina no incrementar más el espesor, para evitar duraciones excesivas de la etapa. Considerando lo anterior, la altura de las bandejas será de 1,5 [cm], esto incluye el espesor del producto (1 [cm]) y un margen de 0,5 [cm] para evitar el desborde o posibles derrames de producto.

Las placas estarán espaciadas por 6 [cm], considerando la altura de la bandeja. Esto dejando un margen de 4 [cm] para el posicionamiento cómodo del producto y 2 [cm] adicionales para permitir el flujo libre de vapor dentro la cámara. Por último, las placas intercambiadoras de calor tendrán un espesor máximo de 2 [cm], de modo que permitan la circulación de refrigerante por su interior.

Un resumen de los parámetros definidos se presenta a continuación en la Tabla E.4.

Tabla E.4: Parámetros para determinar el tamaño de la cámara.

Tamaño de la cámara		
Parámetro	Valor	Unidad
Capacidad de la cámara	4	[kg]
Densidad del producto (bacterias)	1,05	[kg/L]
Volumen máximo para 4 [kg] de producto	3,8	[L]
Número de niveles	5	[-]
Capacidad por nivel	0,8	[kg]
Volumen de producto por nivel	0,76	[L]
Número de placas	5	[-]
Espacio entre placas	6	[cm]
Altura de las placas intercambiadoras de calor	2	[cm]
Altura de las bandejas	1,5	[cm]

Considerando estos parámetros, se estiman las dimensiones de la cámara de vacío.

Altura de la estantería

La altura que tendrá la estantería, que corresponde a la región en donde se sitúan las bandejas y placas, se determina mediante la Ecuación E.3.

$$\text{Número}_{Placas} \cdot \text{Espesor}_{Placas} + \text{Número}_{Placas} \cdot \text{Espacio entre placas} \quad (\text{E.3})$$

$$5 \cdot 2 [cm] + 5 \cdot 6 [cm] = 40 [cm] = 0,4 [m]$$

Diámetro de la cámara

Considerando la altura de la estantería, y dejando un margen de 5 [cm] entre la pared de la cámara y los vértices de la estantería (arriba y abajo), se determina el diámetro de la estructura mediante la Ecuación E.4.

$$\text{Altura}_{Estantería} + 2 \cdot \text{Margen de espaciado} \quad (\text{E.4})$$

$$40 [cm] + 2 \cdot 5 [cm] = 50 [cm] = 0,5 [m]$$

Ancho de las placas intercambiadoras

Para establecer el ancho de las placas intercambiadoras de calor, se emplea el teorema de Pitágoras, donde “a” es la altura y “c” es el diámetro de la cámara, de esta forma, el ancho de las placas correspondería a “b”. Los tramos asociados al teorema, se presentan a continuación en la Figura E.2.

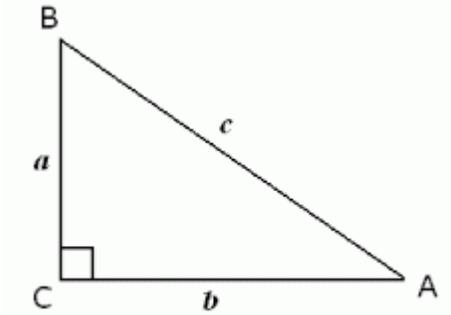


Figura E.2: Determinación de ancho de placas intercambiadoras de calor.

De esta manera, se utiliza la Ecuación E.5 para estimar el ancho de las placas.

$$\text{Ancho}_{Placas} = \sqrt{\text{Diámetro}^2_{Cámara} - \text{Altura}^2_{Estantería}} \quad (\text{E.5})$$

$$\text{Ancho}_{Placas} = \sqrt{50 [cm]^2 - 40 [cm]^2} = 30 [cm] = 0,3 [m]$$

Dimensiones de las bandejas

Ancho de las bandejas

Para permitir un fácil desplazamiento de las bandejas dentro de la cámara, se le resta 1 [cm] al ancho de las placas, como se muestra en la Ecuación E.6.

$$\begin{aligned} Ancho_{Bandejas} &= Ancho_{Placas} - 1 [cm] \\ 30 [cm] - 1 [cm] &= 29 [cm] = 0,29 [m] \end{aligned} \quad (E.6)$$

Longitud de las bandejas

Para determinar el largo de las bandejas, se utiliza la Ecuación E.7, donde V_p es el volumen del producto por nivel y ϵp es el espesor del producto.

$$V_p = (\epsilon p) \cdot (Ancho_{Bandeja}) \cdot (Longitud_{Bandeja}) \quad (E.7)$$

Reordenando la expresión y reemplazando se obtiene:

$$\begin{aligned} Longitud_{Bandeja} &= \frac{V_p}{(\epsilon p) \cdot (Ancho_{Bandeja})} \\ Longitud_{Bandeja} &= \frac{0,00076 [m^3]}{(0,01 [m]) \cdot 0,29 [m]} = 0,26 [m] \end{aligned}$$

Longitud de la cámara

Para estimar la longitud de la cámara, se proporciona un margen de seguridad de 10 % a la longitud de las bandejas, tal como se muestra en la Ecuación E.8.

$$Longitud_{Cámara} = Longitud_{Bandeja} \cdot 1,1 \quad (E.8)$$

$$Longitud_{Cámara} = 0,26 [m] \cdot 1,1 = 0,29 [m]$$

E.3.1.2. Forma y espesor de las tapas del liofilizador

Para determinar la forma de las tapas del liofilizador, se considera el costo y peso que involucran tapas de gran tamaño, por lo que económicamente es más conveniente utilizar tapas del tipo hemisféricas o elipsoidales [138]. Considerando esto, se determina que la forma elegida será la elipsoidal.

Las tapas, al igual que la cámara de vacío, serán sometidas a una presión externa de 760 [mmHg] (14,7 [lb/in²]), correspondiente a la presión atmosférica en Santiago de Chile, según la Dirección Meteorológica de Chile, Servicios Climáticos. Para el cálculo del espesor de las tapas, se considerará una presión un 25 % mayor la presión máxima externa [138], y se utiliza el siguiente procedimiento [138]:

1. Suponer un valor para t y calcular el valor de A usando la Ecuación E.9.

$$A = \frac{0,125}{\frac{R_o}{t}} \quad (E.9)$$

2. Con el valor de A, utilizar la Gráfica “Cálculo del espesor de tapas. Valores para el factor B” (Figura E.5), y obtener el valor de B.
3. Calcular la presión máxima permitida mediante la Ecuación E.10.

$$P_a = \frac{B}{\frac{R_o}{t}} \quad (\text{E.10})$$

Donde: t es igual al espesor de pared mínimo requerido y, A y B son factores de determinación de espesor.

Se debe asegurar que el espesor seleccionado, permita una presión máxima igual o mayor a la estimada, correspondiente a 18,4 [lb/in²].

Para la profundidad de las tapas, se considera la geometría mostrada en la Figura E.3.

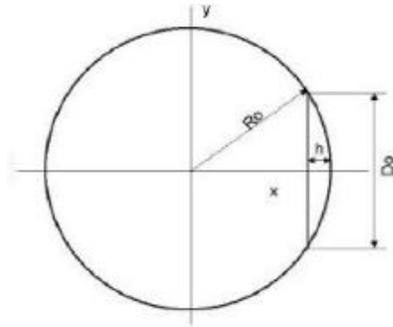


Figura E.3: Representación de la profundidad de la cámara, h [137].

Donde:

- $R_o = 0,9 \cdot D_o$ (Radio exterior para la forma elipsoidal [138]).
- Se utiliza la ecuación de la circunferencia: $R_o^2 = X^2 + Y^2$.
- Para $Y = \frac{D_o}{2}$; $h = R_o - X$, por lo tanto

$$h = R_o - \sqrt{R_o^2 - \left(\frac{D_o}{2}\right)^2}$$

De esta forma, se proponen las medidas de espesores ya estandarizadas para el acero inoxidable 316. Donde se determina que a partir del calibre 16 (espesor de 1,52 [mm]), la placa será capaz de soportar la presión externa. Sin embargo, se busca que el espesor de las tapas sea igual al de la lámina de la cámara de vacío, por lo que se evaluarán ambos al momento de decidir el espesor final.

E.3.1.3. Espesor de la lámina al interior de la cámara de vacío

Para determinar el espesor de lámina al interior de la cámara, es necesario considerar la presión externa a soportar, el diámetro y longitud del cilindro, y por último, la resistencia del material a las temperaturas de operación. En este caso, se considera la notación presentada en la Figura E.4.

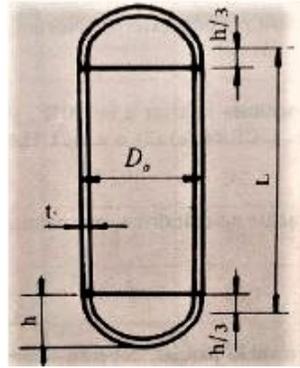


Figura E.4: Diagrama de un recipiente cilíndrico [138].

Donde:

- $D_o = \text{Diámetro interno} + t$ (Diámetro exterior).
- $L = L_c + \frac{2}{3} \cdot h$ (Longitud del recipiente considerando las tangentes de las tapas más un tercio de profundidad de las mismas).
- L_c (Longitud de la cámara).
- t (Espesor de pared mínimo requerido).

Considerando un casco cilíndrico, la presión máxima permitida es la que se presenta en la Ecuación E.11 [138].

$$P_a = \frac{4 \cdot B}{3 \cdot \left(\frac{D_o}{t}\right)} \quad (\text{E.11})$$

Ahora, para determinar el valor de B se realiza el siguiente procedimiento:

- Suponer un espesor (t) y determinar los valores de L/D_o y D_o/t .
- Con el valor de L/D_o , utilizar la gráfica presente en la Figura E.6, y determinar A.
- Con el valor de A obtenido, utilizar la Figura E.5 y estimar el valor de B.

Análogo al caso anterior, se prueba con los calibres conocidos para el acero inoxidable 316 y se evalúa que la presión máxima sea mayor o igual que la presión de trabajo permitida.

En la Tabla E.5 se muestran los valores obtenidos para el calibre 11, donde se estima la profundidad de las tapas y el espesor tanto de las tapas como de la cámara, además de

la presión máxima de trabajo permitida. Es importante considerar que la presión elegida es superior a la requerida (28,27 $[lb/in^2]$ en comparación a 18,4 $[lb/in^2]$), esto asegura que soportará la presión externa ejercida en condiciones de vacío. Los datos del espesor de calibre 11 para el acero inoxidable 316 fueron obtenidos a partir de un catálogo de Distribuidora Metálica S.A [153].

Tabla E.5: Cálculos asociados al espesor de las tapas y de la cámara.

Parámetros para espesor de cámara de vacío		
Parámetro	Valor	Unidad
Calibre	11	[-]
Espesor de lámina y tapa	0,304	[cm]
Profundidad de la tapa	7.63	[cm]
Presión máxima de trabajo	28,27	$[lb/in^2]$

E.3.1.4. Espesor de las bandejas

Las bandejas que contendrán el producto, deben ser fabricadas de un material resistente a corrosión y oxidación, por lo que se selecciona como material al acero inoxidable AISI 316. Cada bandeja dentro de la cámara estará sometida a la presión ejercida por el peso del producto que contienen. En este caso, cada nivel cuenta con una bandeja que debe soportar 0,8 [kg] de microorganismos a liofilizar. De esta manera, el espesor de las bandejas se calcula según la Ecuación E.12 [154].

$$\tau_d = \frac{P \cdot d^2}{t^2} \quad (E.12)$$

Donde:

- τ_d : Esfuerzo de diseño.
- t : Espesor del material de las bandejas.
- d : Ancho de las bandejas = 29 [cm].
- P : Fuerza máxima a la cual están sometidas las bandejas

$$P = \frac{0,8 [kg] \cdot 9,81 [m/s^2]}{0,29 [m] \cdot 0,5 [m]} = 93,64 [N/m^2] = 0,013 [lb/in^2]$$

Empleando un factor de seguridad de 1,8, el esfuerzo de diseño τ_d corresponde a

$$\tau_t/1,8$$

- τ_t : Resistencia a la tracción: 660 [MPa] [136].

$$\tau_d = \frac{660 [MPa]}{1,8} = 366,7 [MPa]$$

Entonces despejando t de la Ecuación E.12, se tiene:

$$t = \sqrt{\frac{93,64[N/m^2] \cdot 0,29^2[m^2]}{366,7 [MPa]}} = 0,0005 [m] = 0,5 [mm]$$

El calibre más cercano al espesor obtenido es el 24, con un espesor de 0,61 [mm] [153], lo que permitirá soportar el peso de 0,8 [kg].

E.3.2. Selección de la bomba de vacío

La utilidad de la bomba de vacío es evacuar los gases no condensables de la cámara, generando la presión necesaria para que se produzca la sublimación. Además, evitar la presencia de aire previene la oxidación durante el proceso. La bomba de vacío debe ser capaz de disminuir la presión atmosférica hasta la presión de operación (0,01 [mbar]) dentro de la cámara. Para determinar qué bomba utilizar, es necesario tener en consideración: la presión de operación, el volumen de la cámara y el tiempo requerido para alcanzar la presión.

Presión de operación

Esta presión determina el tipo de bomba a utilizar. En este caso la presión propuesta es de 0,01 [mbar], con el fin de asegurar el máximo vacío, considerando que a una temperatura de -50°C se requiere una presión de al menos 0,03 [mbar] para que el agua comience a sublimar.

Volumen de la cámara

El volumen de la cámara va a influir en la capacidad de la bomba, pues debe ser capaz de disminuir la presión en toda la cámara en un cierto intervalo de tiempo. Se determina con la siguiente expresión:

$$Volumen_{cámara} = \pi \cdot R^2 \cdot L + 2 \cdot Volumen_{Tapa}$$

Para estimar el volumen de las tapas, se considera que este corresponde a la mitad del volumen de un cilindro, es decir:

$$V_{Tapa} = \frac{\pi \cdot r^2 \cdot Altura_{Tapa}}{2}$$

Reemplazando,

$$V_{Tapa} = \frac{\pi \cdot (0,29/2)^2 [m^2] \cdot 0,076 [m]}{2} = 0,00749 [m^3]$$

Considerando lo anterior, el volumen de la cámara es:

$$Volumen_{cámara} = \pi \cdot (0,29/2)^2 [m^2] \cdot 0,29 [m] + 2 \cdot 0,00749 [m^3]$$

$$Volumen_{cámara} = 0,072 [m^3] = 72 [L]$$

Tiempo para alcanzar la presión

El tiempo para que la bomba reduzca la presión de la cámara a 0,01 [mbar] se sugiere que sea inferior a 20 [min], para evitar el riesgo de descongelamiento del producto [137]. El tiempo requerido para vaciar un volumen V , se calcula con la Ecuación E.13 [140].

$$t = 2,3 \cdot \frac{V}{S_r} \cdot \log\left(\frac{P_1}{P}\right) \quad (\text{E.13})$$

- V : Volumen en litros.
- S_r : Velocidad real de aspiración [L/min] (Dato entregado por proveedor).
- P_1 : Presión inicial (Presión atmosférica de 760 [mmHg] = 1013,24 [mbar]).
- P : Presión que se desea alcanzar en [mbar]. t : Tiempo en minutos.

Para determinar el tiempo de operación, es necesario obtener parámetros específicos de bombas de vacío, por lo que se procederá con la selección de la bomba.

Selección de bomba de vacío

Acorde a los requerimientos definidos previamente, se realiza una búsqueda y cotización de bombas de vacío, que alcancen la presión de operación requerida en la cámara. Para la estimación del tiempo requerido para la operación, se toma como referencia la bomba de vacío CPS, modelo V2PD Pro-Set. La capacidad de esta bomba es de 56,6 [L/min] y alcanza una presión de 0,013 [mbar], acorde a la información proporcionada por el proveedor. Reemplazando estos valores en la Ecuación E.13, se obtiene lo siguiente:

$$t = 2,3 \cdot \frac{72 \text{ [L]}}{56,6 \text{ [L/min]}} \cdot \log\left(\frac{1013,24 \text{ [mbar]}}{0,013 \text{ [mbar]}}\right) = 22,7 \text{ [min]} = 14 \text{ [min]} \text{ y } 15 \text{ [seg]}$$

En la Tabla E.6 se muestran bombas de vacío que alcanzan presiones cercanas a la presión de operación y que a su vez, se caracterizan por poseer distintas capacidades. Particularmente, se selecciona la bomba CPS V2PD Pro-Set, puesto que alcanza un vacío final de 0,013 [mbar] en aproximadamente 15 [min], tiempo que concuerda con el rango propuesto anteriormente. Además, es importante considerar que el costo de adquisición es considerablemente menor comparado con las demás bombas especificadas.

Tabla E.6: Especificaciones bombas de vacío. Proveedor: Cole Parmer, Empresa distribuidora de instrumentación industrial y científica.

Marca	Modelo	Máximo vacío [mbar]	Capacidad [L/min]	Tiempo [min]	Precio \$US
Vacuubrand	698143	0,01	165	5	6930
CPS	VP12D Pro-Set	0,013	339,8	2,4	1290
Uniweld	HVP8	0,002	228	3,5	725
CPS	VP2D Pro-Set	0,013	56,6	14,3	338

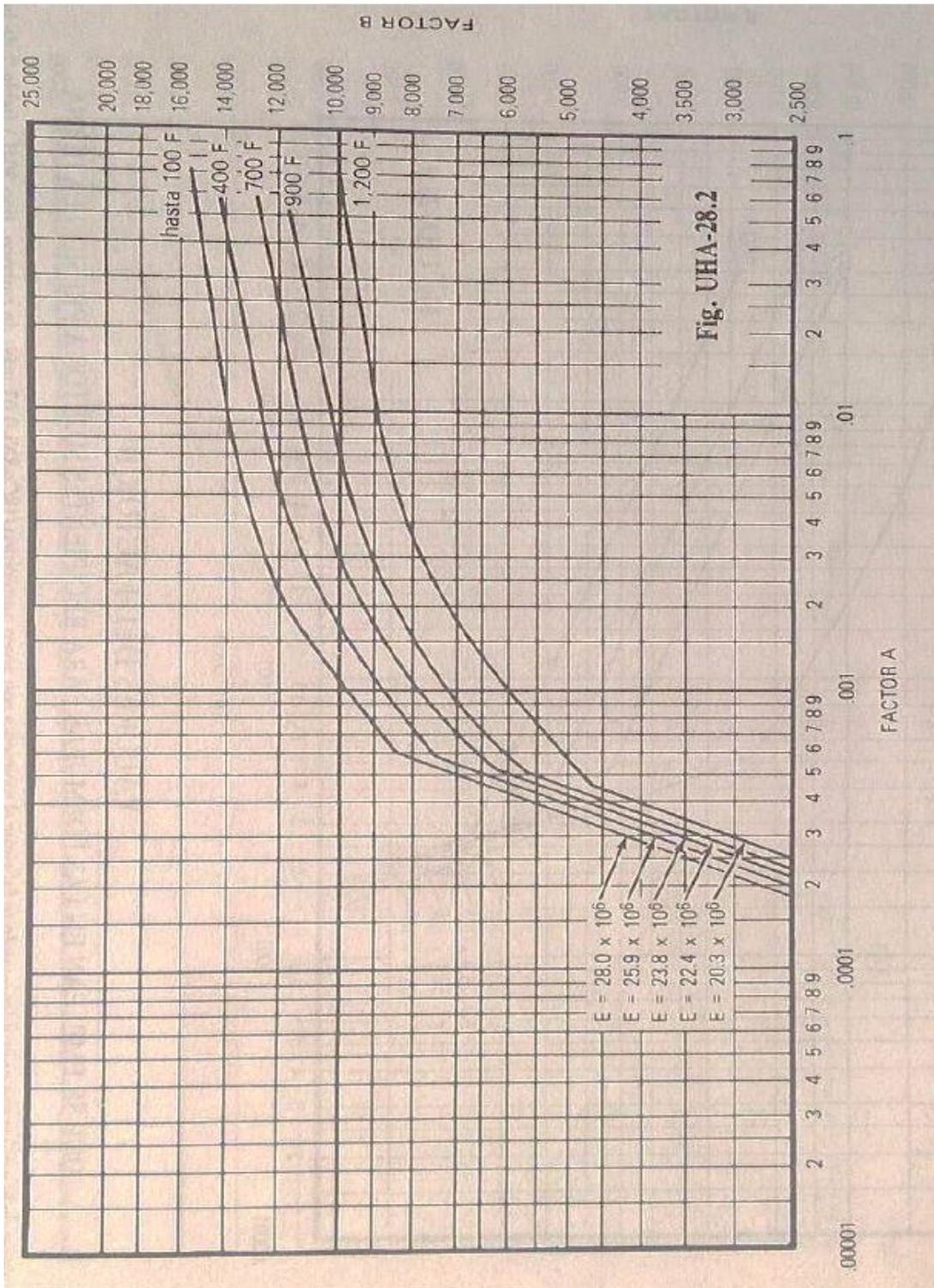


Figura E.5: Cálculo espesor de las tapas. Valores del factor B que se emplean en las fórmulas para recipientes sujetos a presión externa.

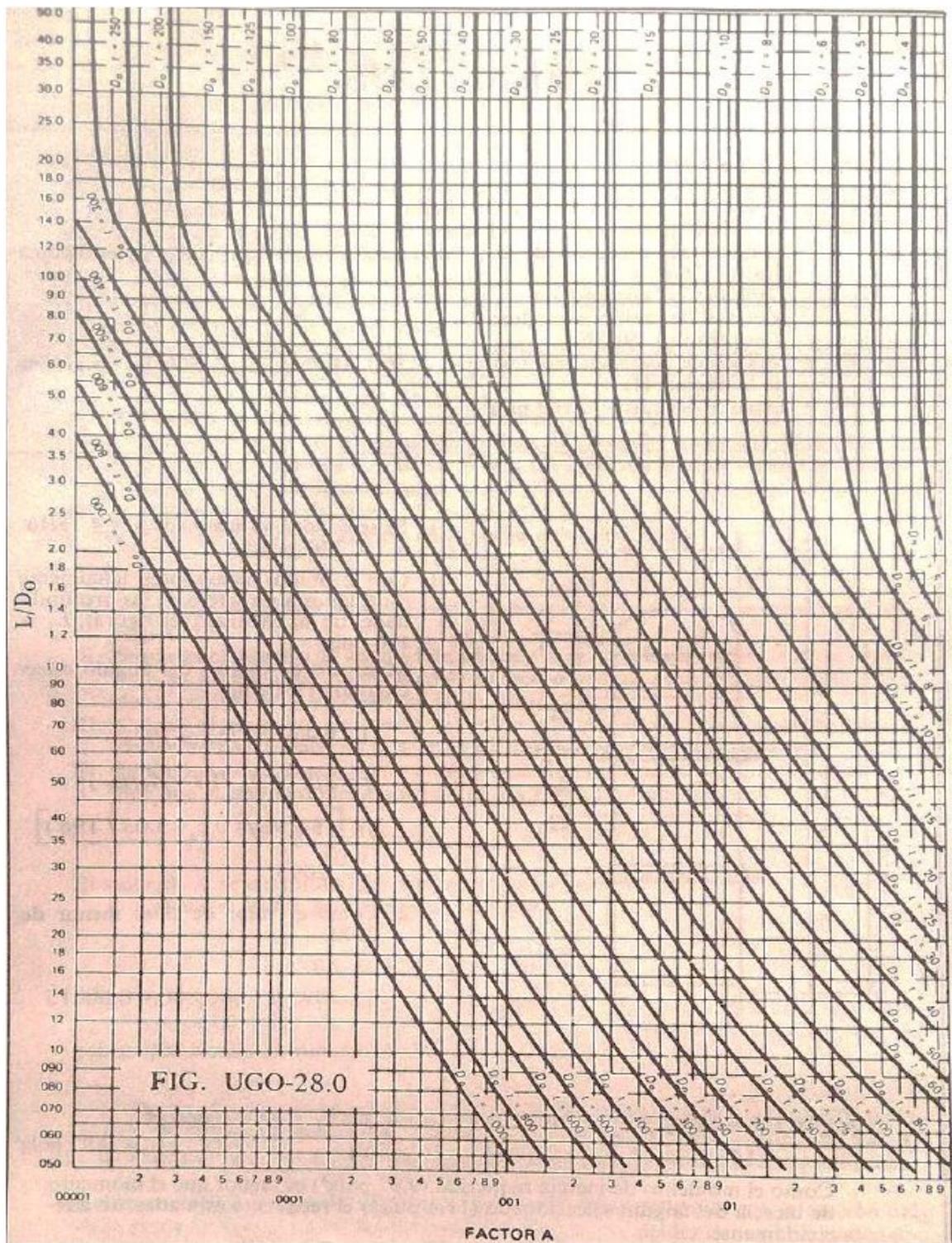


Figura E.6: Cálculo espesor de lámina. Valores del factor B que se emplean en las fórmulas para recipientes sujetos a presión externa.

E.4. Cálculo Sistema de Refrigeración

El Sistema de Refrigeración es indispensable para el funcionamiento del liofilizador, pues es el encargado de disminuir la temperatura del producto bajo su punto eutéctico, es decir a -50°C , además de enfriar los condensadores hasta una temperatura de -80°C con el fin de asegurar la condensación de todo el vapor de agua.

Para diseñar el sistema de refrigeración, es necesario determinar la carga de enfriamiento, que corresponde a la cantidad de calor a retirar necesaria para alcanzar la temperatura requerida.

Cargas de enfriamiento

Para el caso de un liofilizador, la carga de enfriamiento del equipo corresponde a la suma de todas las cargas térmicas en la que están involucradas diferentes fuentes, en este caso las fuentes de calor que suministran carga de enfriamiento son las siguientes:

1. Calor cedido por el producto.
2. Calor cedido por el aire de la cámara.
3. Calor cedido por las bandejas.
4. Calor que ingresa a través de las paredes.

Calor cedido por el producto

Siguiendo el proceso análogo al mostrado en el Anexo D, pero considerando una masa de 4 [kg] de biomasa, se obtienen los siguientes valores para los calores cedidos por el producto:

$$Q_1 = 4 \text{ [kg]} \cdot 3,32 \text{ [kJ/kg} \cdot \text{K]} \cdot 28^{\circ}\text{C} = 371,51 \text{ [kJ]}$$

$$Q_2 = 4 \text{ [kg]} \cdot 235,5 \text{ [kJ/kg]} = 942 \text{ [kJ]}$$

$$Q_3 = 4 \text{ [kg]} \cdot 1,77 \text{ [kJ/kg]} \cdot 47^{\circ}\text{C} = 332,76 \text{ [kJ]}$$

De esta manera, el calor total a retirar del producto es:

$$Q_{\text{Producto}} = Q_1 + Q_2 + Q_3$$

$$Q_{\text{Producto}} = 371,51 \text{ [kJ]} + 942 \text{ [kJ]} + 332,76 \text{ [kJ]} = 1.646,27 \text{ [kJ]}$$

Calor cedido por el aire presente en la cámara

El aire presente dentro de la cámara entrega calor cuando este es enfriado durante la etapa de congelación. El cálculo del calor cedido se realiza mediante la siguiente expresión:

$$Q_{\text{Aire}} = m_{\text{aire}} \cdot (U_2 - U_1)$$

Donde:

- U_2 : Energía interna del aire a 25 °C = 213,04 [kJ/kg] [148].
- U_1 : Energía interna del aire a -50 °C = 152,17 [kJ/kg] [148].
- m_{aire} : Masa de aire presente en la cámara en kg. Este valor se calcula de la siguiente forma:

$$m_{aire} = \frac{V}{V_e}$$

Donde

- V: Volumen del cámara = 0,072 [m^3].
- V_e : Volumen específico del aire al inicial el proceso en [kg/m^3], el cual se estima con:

$$V_e = \frac{R \cdot T}{P \cdot Mm}$$

Con:

- R: Constante universal de los gases = 8,314 [$m^3 \cdot Pa/mol \cdot K$].
- T: Temperatura inicial = 25 °C = 298,15 K.
- P: Presión 760 [mmHg] = 101.325 [Pa].
- Mm: Masa molecular del aire = 0,029 [kg/mol] [134].

Con estos valores, se obtiene el volumen específico del aire al iniciar el proceso de congelación:

$$V_e = \frac{8,314 [m^3 \cdot Pa/mol \cdot K] \cdot 298,15 [K]}{101.325 [Pa] \cdot 0,029 [kg/mol]} = 0,843 [m^3/kg]$$

Posteriormente, se realiza el cálculo de la masa de aire presente en la cámara:

$$m_{aire} = \frac{0,072 [m^3]}{0,843 [m^3/kg]} = 0,085 [kg]$$

Con esto, el calor cedido por el aire corresponde a:

$$Q_{Aire} = 0,085 [kg] \cdot (213,04 [kJ/kg] - 152,17 [kJ/kg]) = 5,14 [kJ]$$

Calor cedido por las bandejas

El calor cedido por las bandejas, se determina a partir de la siguiente expresión:

$$Q_{Bandejas} = m \cdot Cp_{316} \cdot \Delta T$$

Donde:

- Cp_{316} : Capacidad calorífica del acero AISI 316 = 0.461 [kJ/kg · °C] [136].
- ΔT : Diferencia de temperaturas de 25°C a -50 °C = 75 °C.

- m : Masa de las bandejas en [kg], la cual se determina mediante la siguiente fórmula:

$$m = V_b \cdot \delta$$

Donde:

- δ : Densidad del acero AISI 316 = 8.030 [kg/m³] [136].
- V_b : Volumen de la bandeja = $V_1 + V_2 + V_3$.

Para determinar el volumen de las bandejas se calcula de manera diferenciada la superficie (V_1) y los bordes (V_2 y V_3). Recordar que el espesor de las bandejas había sido determinado previamente y corresponde a 0,61 [mm] ($6,1 \cdot 10^{-4}$ [m]).

$$V_{1,Superficie} = Largo \cdot Ancho \cdot Espesor$$

$$V_{1,Superficie} = 0,29 [m] \cdot 0,29 [m] \cdot 6,1 \cdot 10^{-4} [m] = 5,11 \cdot 10^{-5} [m^3]$$

$$V_2 = Largo \cdot Altura \cdot Espesor \cdot 2$$

$$V_2 = 0,29 [m] \cdot 0,015 [m] \cdot 6,1 \cdot 10^{-4} [m] \cdot 2 = 5,29 \cdot 10^{-6} [m^3]$$

$$V_3 = Ancho \cdot Altura \cdot Espesor \cdot 2$$

$$V_3 = 0,29 [m] \cdot 0,015 [m] \cdot 6,1 \cdot 10^{-4} [m] \cdot 2 = 5,31 \cdot 10^{-6} [m^3]$$

De esta forma, el volumen de la bandeja es igual a:

$$V_b = 5,11 \cdot 10^{-5} [m^3] + 5,29 \cdot 10^{-6} [m^3] + 5,31 \cdot 10^{-6} [m^3]$$

$$V_b = 6,17 \cdot 10^{-5} [m^3]$$

El valor para la masa de las bandejas es:

$$m = 6,17 \cdot 10^{-5} [m^3] \cdot 8.030 [kg/m^3] = 0,5 [kg]$$

El calor cedido por cada bandeja, es entonces:

$$Q_{Bandeja} = 0,5 [kg] \cdot 0,461 [kJ/kg \cdot ^\circ C] \cdot 75 [^\circ C]$$

$$Q_{Bandeja} = 17,13 [kJ]$$

Puesto que el equipo cuenta con 5 bandejas (1 por cada nivel) como se determinó previamente, entonces el calor total a retirar es:

$$Q_{Bandejas} = 17,13 [kJ] \cdot 5 = 85,68 [kJ]$$

Calor que atraviesa las paredes de la cámara

La magnitud del calor que atraviesa las paredes de la cámara, depende de tres factores relacionados de la siguiente manera:

$$Q = A \cdot U \cdot \Delta T$$

Donde:

- Q : Cantidad de valor transferido en [kJ].
- ΔT : Diferencia de temperatura entre las paredes.
- A : Área de la superficie de la pared externa en [m], considerando que el área superficial de las tapas es la mitad de la de una esfera.

$$\text{Área}_{\text{Exterior}} = \text{Área}_{\text{Tapas}} + \text{Área}_{\text{Cámara}}$$

$$\text{Área}_{\text{Exterior}} = 2 \cdot \pi \cdot R^2 + 2 \cdot \pi \cdot R \cdot L$$

$$\text{Área}_{\text{Exterior}} = 0,85 \text{ [m}^2\text{]}$$

- U : Coeficiente total de transferencia de calor en [kJ].

$$\frac{1}{U} = \frac{1}{f_i} + \frac{X_1}{K_1} + \frac{X_2}{K_2} + \dots + \frac{1}{f_o}$$

Los coeficientes de convección de las paredes internas y externas ($\frac{1}{f_i}$ y $\frac{1}{f_o}$) se consideran despreciables, ya que la velocidad del aire en ambas es mínima. Los demás parámetros corresponden a:

- x_1 : Espesor del aislante en metros.
- x_2 : Espesor de la lámina AISI 316 metros = 0,003048 [m] (Tabla E.5).
- k_1 : Conductividad térmica del aislante.
- k_2 : Conductividad térmica del acero = 13,8 [W/m · K].

Se determina un aislante y espesor estándar para cámaras liofilizadoras, correspondiente a poliuretano con un espesor de 3 [cm]. La conductividad del poliuretano es 0,017 [W/m · K] [136].

Con esto:

$$\frac{1}{U} = + \frac{0,03 \text{ [m]}}{0,017 \text{ [W/m} \cdot \text{K]}} + \frac{0,003048 \text{ [m]}}{13,8 \text{ [W/m} \cdot \text{K]}} = 1,76 \text{ [m}^2 \cdot \text{K/W]}$$

$$U = 0,57 \text{ [W/[m}^2 \cdot \text{K}]}$$

Con esto, el calor que atraviesa las paredes corresponde a:

$$Q_{Paredes} = 0,85 [m^2] \cdot 0,57 [W/[m^2 \cdot K]] \cdot 75 [K]$$

$$Q_{Paredes} = 35,98 [W] = 129,52 [kJ]$$

Para lo anterior se considera el tiempo de congelamiento igual a 1 hora.

Para obtener el calor total cedido por el sistema correspondiente a la cámara de vacío, se realiza la sumatoria de todas las cargas de enfriamiento.

$$Q_{Total} = Q_{Producto} + Q_{Aire} + Q_{Bandejas} + Q_{Paredes}$$

$$Q_{Total} = 1.646,27 [kJ] + 5,14 [kJ] + 85,68 [kJ] + 129,52 [kJ]$$

$$Q_{Total} = 18.866,61 [kJ]$$

E.5. Cálculo Sistema de Calefacción

Para determinar la potencia de las resistencias eléctricas, se requiere conocer la temperatura de calentamiento de estas y el tiempo de trabajo. Como se mencionó anteriormente, la temperatura máxima de calentamiento es de 50°C y la temperatura eutéctica es de -30°C.

Se considera para las resistencias barras de cobre de 5 [mm]. Para calcular la potencia de diseño es necesario conocer la masa de cobre, para ello, se consideran un largo de 6,5 [m] (sugerido) y se acude al software de la empresa GUTMANN, con el que se estima una masa de cobre de 1,138 [kg], considerando el espesor y la longitud indicada.

La capacidad calorífica del cobre C_p es de 385 [J/kg · K] [134]. Por lo que el calor a generar se determina con la siguiente ecuación:

$$Q = m \cdot C_p \cdot \Delta T$$

$$Q = 1,138[kg] \cdot 385[J/kg \cdot K] \cdot (323,15 - 243,15)[K]$$

$$Q = 35,05[kJ]$$

F. Evaluación económica

Estimación de costos adicionales a equipos

Dentro de la estimación de costos, se presenta la categoría “Otro”, la cual hace alusión a los activos mostrados a continuación en la Tabla F.1.

Tabla F.1: Descripción de categoría “otro”, en costos de equipos.

Equipo	N°	Costo FOB [CLP]	Costo FOB [USD]	Costo CIF [USD]	Costo total [USD]	Costo instalado [USD]
Balanzas	2	78.000	108	108	216	291
Refrigerador	1	800.000	1.107	1.107	1.107	1.494
Agitadores	2	125.000	173	173	346	467
Instrumentación	-	361.500	500	500	500	675
Empaques	-	361.500	500	500	500	675
Demás	-	1.084.500	1.500	1.500	1.500	2.025
Otros		2.810.500	3.887	3.887	4.168	5.627

Estimación de consumo eléctrico e hídrico

A continuación en la Tabla F.2 se presenta el detalle del consumo de agua dentro de la línea de proceso.

Tabla F.2: Consumo de agua en el proceso.

Operación	Consumo [Lt]		Consumo total [Lt]	Consumo total [m3]
	m.o.1	m.o.2		
Medio de cultivo	30,6	30,7	61,3	0,0613
Esterilización	5,5	5,5	11	0,011
Lavado de reactores	6,78	6,8	13,58	0,014
Lavado de centrífuga	30,6	30,7	61,3	0,061
Lavado de bandejas	20		40	0,04
Gastos de lavado de utensilios + Consumos adicionales	400		400	0,4
Total [m3/lote]				0,59
Total [m3/año]				30,57
Total [USD/año]				51

A continuación en la Tabla F.3 se muestra el consumo energético para la línea de *Azotobacter chroococcum* (m.o.1) y *Azospirillum lipoferum* (m.o.2). Es importante considerar que para la centrífuga se consideran 5 [min] de operación, más 5 [min] de operación para lavado.

Tabla F.3: Consumo energético de equipos.

Equipo	Cantidad	Tiempo [h]		Potencia [kW]	Consumo [kWh]
		m.o. 1	m.o. 2		
Matraces	2	20,25	19,7	0,025	0,998
Reactores 3 L	2	22,2	19,8	0,8	33,6
Reactores 30 L	2	26,6	21,5	7,2	346,3
Centrífuga tubular	1	0,17	0,17	2,2	0,73
Liofilizador	1	18,5		2,76	51,06
Envasadora - dosificadora	1	0,03		1,8	0,06
Equipos secundarios					
Bombas peristáltica	2	15,7	11,9	1	27,6
Bomba centrífuga	1	0,17	0,17	1	0,33
Compresor	1	48,8	41,3	1,5	135,15
Caldera	1	1	1	36	72
Autoclave	1	0,5	0,5	1,8	1,8
Total [kWh/ciclo]					669,7
Total [kWh/año]					34.822
Total [USD/año]					3.795

A continuación en la Tabla F.4 y F.5, se muestra el detalle del consumo energético de la caldera y del compresor.

Tabla F.4: Consumo energético de la caldera por lote.

Operación	Vapor [Kg]	Potencia [kW]	Tiempo [h]	Consumo [kWh]
Esterilización R30L	11,86	36	1	36
Esterilización R30L'	11,82	36	1	36
Total				72

Tabla F.5: Consumo energético por lote para el compresor.

Operación	Tiempo [h]	Potencia [kW]	Consumo [kWh]
Fermentador R3L	22,2	1,5	33,3
Fermentador R3L'	19,8	1,5	29,7
Fermentador R30L	26,6	1,5	39,9
Fermentador R30L'	21,5	1,5	32,25
Total			135,15

Depreciación de equipos

Los valores asociados a la depreciación de los activos se muestra a continuación en la Tabla F.6, donde para estimar el valor de reventa, se considero que este era un 20 % superior al valor libro del año 10.

Tabla F.6: Detalle de depreciación de activos.

Activos	Vida útil [años]	Valor de adquisición [USD]	Depreciación anual [USD/año]	Valor libro año 10 [USD]	Valor de reventa [USD]
Matraces	15	16	1	5	6
Reactores 3 L	15	156.432	10.429	52.144	62.573
Reactores 30 L	15	421.162	28.077	140.387	168.465
Centrífuga tubular	15	8.139	543	2.713	3.255
Liofilizador	15	18.206	1.214	6.069	7.282
Bombas peristáltica	10	3.813	381	0	0
Bomba centrífuga	10	1.481	148	0	0
Compresor	10	180	18	0	0
Caldera	15	2.418	161	806	967
Autoclave	15	6.240	416	2.080	2.496
Envasadora - dosificadora	15	14.124	942	4.708	5.650
Total			42.330	208.912	250.694