

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

PROPUESTA TÉCNICA Y FINANCIERA DE UN PROCESO PARA LA  
PRODUCCIÓN DE ACEITES MICROBIANOS (TAGS) A PARTIR DE  
UNA BACTERIA BIOINGENIERIZADA DEL GÉNERO RHODOCOCCUS  
QUE UTILIZA SUERO LÁCTICO COMO FUENTE DE CARBONO.

Proyecto de graduación sometido a consideración de la Escuela de  
Ingeniería Química como requisito final para optar por el grado de  
Licenciatura en Ingeniería Química.

Andrea Quirós Cordero

*San Pedro, 2022.*

**Propuesta técnica y financiera de un proceso para la producción de aceites microbianos (TAGs) a partir de una bacteria bioingenierizada del género *rhodococcus* que utiliza suero láctico como fuente de carbono.**

Informe del proyecto de graduación presentado ante la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad de Costa Rica como requisito final para optar por el grado de Licenciado en Ingeniería Química.

**Sustentante:**

Andrea Quirós Cordero

**Tribunal examinador:**



Ing. Adolfo Ulate Brenes  
Escuela de Ingeniería Química

Presidente del tribunal



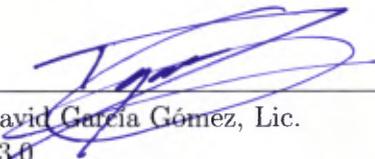
Ing. Natalia Montero Rambla, M.Sc  
Escuela de Ingeniería Química, UCR

Directora del proyecto



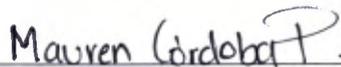
Ing. Juliana Da Luz Castro, Lic.  
Escuela de Ingeniería Química, UCR

Miembro lector



Ing. David García Gómez, Lic.  
Cibus 3.0

Miembro lector



Ing. Maureen Córdoba Pérez  
Escuela de Ingeniería Química

Lector invitado



## AGRADECIMIENTO

A mis papás y mi hermana, gracias por ser mi apoyo incondicional. Comparto con ustedes este logro, que tiene un poco de cada uno: la mente soñadora de mami que me permite creer que puedo lograr cualquier meta, el trabajo duro de papi que me dió la fortaleza para perseverar aún en los momentos más difíciles y la ambición de Toti que me impulsa a superar mis límites hasta lograr alcanzar lo que quiero.

A la Universidad de Costa Rica y la Escuela de Ingeniería Química, gracias por brindarme una formación profesional que me llena de orgullo.

A mi comité asesor, integrado por la Ing. Natalia Montero, Ing. Juliana Da Luz e Ing. David García. Gracias por toda la dedicación, guía, confianza y apoyo que me brindaron a lo largo del camino.

A mis amigos, gracias por ser el mejor equipo, por su compañía, sus palabras de aliento, su ejemplo y su confianza en mí. Ustedes son parte indispensable de este proyecto y de mi formación personal y profesional.



## RESUMEN

El presente trabajo es el resultado de la conclusión de un proyecto dirigido de graduación para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería Química. El proyecto consistió en la elaboración de una propuesta técnica y financiera para un proceso productivo de aceites microbianos, específicamente triacilgliceroles (TAGs), a partir de un microorganismo bioingenierizado que utiliza suero láctico residual como fuente de carbono. El primer objetivo cumplido fue el diseño del bioproceso. La metodología que permitió la ejecución de dicho objetivo consistió de una primera etapa de investigación en la literatura. A raíz de dicha investigación se determinaron las condiciones operativas, la tecnología a utilizar y demás parámetros requeridos para la definición técnica del proyecto. Posteriormente, se realizaron balances de masa y de energía y el diagrama de flujo del proceso y se finalizó el objetivo con una propuesta de aplicación para insertar el producto en el mercado: producción de biodiesel a partir de aceites microbianos. Mediante esta metodología se obtuvieron dos propuestas técnicas, denominadas en este documento como Escenario A y Escenario B, estas propuestas difieren entre sí únicamente en las etapas del proceso utilizadas para acondicionar el suero láctico. El principal resultado del primer objetivo fue la definición de las etapas operativas: concentración, mezclado, biorreacción, separación, disrupción celular y dos fases de purificación.

El segundo objetivo consistió en definir las acciones requeridas para mitigar el impacto ambiental del proyecto. Esto se cumplió con el formulario D1 de Setena. Dicho documento es una evaluación del impacto ambiental que conlleva la puesta en marcha de un proyecto y emite una calificación y puntos a mejorar del proceso evaluado. De esta manera se propusieron las siguientes acciones de mitigación: realizar una propuesta de aprovechamiento de las corrientes residuales de la tecnología de membranas para agua de limpieza, participar en proyectos sociales dentro de su comunidad y seleccionar equipos de construcción con controladores de ruido.

El tercer y último objetivo fue determinar la rentabilidad del bioproceso mediante un análisis financiero. Para esto se estimaron costos, gastos, inversiones y beneficios, se efectuó el flujo neto de efectivo y un análisis de sensibilidad utilizando el Software @Risk de Palisade. Las variables de interés del análisis de sensibilidad fueron la tasa interna de retorno y el valor actual neto. Mediante el análisis financiero se determinó que el proyecto presenta una mayor rentabilidad y viabilidad si se sustituye la evaporación por la adición de lactosa. Además, se determinó que entre las variables de precio unitario, costo unitario y volumen de ventas, la que tiene mayor incidencia sobre el valor actual neto y la tasa interna de retorno es el precio unitario.

Las principales conclusiones son que el diseño más adecuado para la planta de producción de aceites microbianos está constituido por: una primera etapa de concentración mediante evaporación, seguida de una etapa de mezclado, un proceso de biorreacción mediante un sistema de tres biorreactores en paralelo, una etapa de separación mediante microfiltración, una disrupción celular mediante un homogeneizador a alta presión y dos etapas de separación y purificación realizadas mediante una microfiltración y una ultrafiltración.

Además, se concluye que se deben plantear acciones para mitigar el consumo

de agua, la contribución de las emisiones a la contaminación atmosférica, ruidos y vibraciones en la etapa constructiva, generación y clasificación de residuos sólidos, cantidad de plazas laborales generadas (menos de 25) y utilización de combustibles fósiles.

Finalmente, se concluye que ambos escenarios presentan condiciones favorables de rentabilidad, con la diferencia de que el Escenario B tiene una mayor capacidad productiva y un menor consumo energético. Además, se determinó que de las variables de entrada analizadas (precio unitario, costo unitario y volumen de ventas), la que tiene mayor efecto sobre las variables de salida (indicadores financieros VAN y TIR) es el precio unitario.

Con base en los resultados obtenidos se recomienda realizar una propuesta detallada del proceso de aprovechamiento de las corrientes residuales de las tecnologías de membranas para la operación de CIP (Clean In Place) de la planta, ampliar el análisis técnico y financiero respecto al aprovechamiento de los aceites microbianos para producir biodiesel, así como realizar pruebas a nivel de planta piloto en laboratorios.



# Índice

*Página*

<b>AGRADECIMIENTO</b>	iii
<b>RESUMEN</b>	v
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>Fundamento teórico</b>	3
<b>1.1 Pretratamiento: acondicionamiento del suero láctico</b>	3
<b>1.1.1 Pasteurización</b>	5
<b>1.1.2 Evaporación</b>	6
<b>1.2 Biorreacción: producción de lípidos (TAGs)</b>	7
<b>1.2.1 Oxígeno disuelto</b>	9
<b>1.2.2 Agitación</b>	10
<b>1.2.3 Temperatura</b>	11
<b>1.2.4 pH</b>	12
<b>1.2.5 Configuración</b>	12
<b>1.2.6 Escalamiento</b>	14
<b>1.3 Bioseparación: recuperación lípidos producidos (TAGs)</b>	14
<b>1.3.1 Etapa de cosecha celular</b>	16
<b>1.3.2 Etapa de recuperación</b>	16
<b>1.3.3 Etapa de concentración</b>	21
<b>1.3.4 Etapa de purificación</b>	24
<b>1.3.5 Etapa de acabado</b>	26
<b>1.4 Legislación</b>	26
<b>1.4.1 Ley de Biodiversidad 7788</b>	27
<b>1.4.2 Reglamento para el Acceso a los Elementos y Recursos Genéticos y Bioquímicos de la Biodiversidad en Condiciones ex situ N°33697</b>	27
<b>1.4.3 Permiso Sanitario de Funcionamiento</b>	28

1.4.4	Reglamento de Vertido y Reuso de Aguas Residuales N°33601-	
	MINAE-S	31
1.4.5	Permiso de viabilidad ambiental otorgado por la Secretaría	
	Técnica Nacional Ambiental	32
1.4.6	Documentación legal y técnica adicional	33
1.5	Viabilidad económica	35
1.5.1	Inversiones	35
1.5.2	Gastos	35
1.5.3	Costos	36
1.5.4	Beneficios del proyecto	36
1.5.5	Indicadores financieros	37
<b>Diseño del bioproceso</b>		<b>39</b>
2.1	Metodología	39
2.2	Diseño del bioproceso	40
2.2.1	Etapa de evaporación	41
2.2.2	Etapa de biorreacción	44
2.2.3	Etapa de recuperación	50
2.2.4	Etapa de purificación	58
2.2.5	Elaboración de biodiesel a partir de aceites microbianos	63
2.2.6	Variación del proceso productivo planteado	65
2.2.7	Legislación que le compete al proceso	69
<b>Viabilidad ambiental y acciones de mitigación</b>		<b>73</b>
3.1	Metodología	73
3.2	Evaluación de impacto ambiental	73
3.2.1	Consumo afectación	74
3.2.2	Impacto en aire, agua, suelo y humano	78
3.2.3	Impacto en suelo	79
3.2.4	Impacto humano	81
3.2.5	Otros riesgos	82
3.3	Acciones de mitigación	83

<b>Rentabilidad y análisis financiero</b>	<b>87</b>
4.1 Metodología . . . . .	87
4.2 Análisis financiero . . . . .	88
<b>Conclusiones y recomendaciones</b>	<b>107</b>
5.1 Conclusiones . . . . .	107
5.2 Recomendaciones . . . . .	109
<b>NOMENCLATURA</b>	<b>111</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>113</b>
<b>APÉNDICES</b>	<b>125</b>
A Resultados . . . . .	125
B Muestra de cálculo . . . . .	140
C Diagrama de flujo . . . . .	147

## Índice de Tablas

Cuadro 1.1 Límites máximos permisibles para parámetros universales de análisis obligatorio para el vertido de aguas residuales según el Reglamento N°33601-MINAE-S.	32
Cuadro 2.1 Condiciones operativas de dos procesos de evaporación realizados por (Murillo, 2011) y (Jimenez, 2015) respectivamente.	42
Cuadro 2.2 Condiciones operativas seleccionadas para el proceso de evaporación.	43
Cuadro 2.3 Condiciones operativas del bioproceso suministradas por la empresa.	44
Cuadro 2.4 Condiciones operativas de bioprocesos productivos de lípidos a partir de <i>Rhodococcus opacus</i> reportados en la literatura.	45
Cuadro 2.5 Composición del suero láctico a utilizar en el bioproceso antes del acondicionamiento.	48
Cuadro 2.6 Composición del medio de cultivo a utilizar en el bioproceso.	49
Cuadro 2.7 Balance de masa para un biorreactor durante los 3 días de operación.	50
Cuadro 2.8 Balances de masa de la microfiltración empleada para la cosecha celular.	51
Cuadro 2.9 Comparación de costos operacionales de métodos de disrupción para un flujo de 10 ton/h (Ustun-Aytekin <i>et al.</i> , 2016).	53
Cuadro 2.10 Condiciones de operación de proceso productivos de lípidos por <i>Rhodococcus opacus</i> encontrados en la literatura.	57
Cuadro 2.11 Condiciones operativas seleccionadas para el proceso de disrupción celular mediante un homogenizador a alta presión.	58
Cuadro 2.12 Flujo de entrada y de salida del homogenizador.	58
Cuadro 2.13 Resultados del balance de masa de la microfiltración de la etapa de purificación.	59
Cuadro 2.14 Resultados del balance de masa de la ultrafiltración de la etapa de purificación.	62

<b>Cuadro 2.15</b>	Flujos de entrada de TAGs y alcohol etílico y flujo de biodiesel de salida correspondientes al reactor en donde se lleva a cabo el proceso de transesterificación. . . . .	65
<b>Cuadro 2.16</b>	Resultados del balance de masa para el escenario alternativo en el año 1 de producción. . . . .	67
<b>Cuadro 2.17</b>	Resultados del balance de masa para el escenario alternativo en el año 3 de producción. . . . .	68
<b>Cuadro 3.1</b>	Resumen de la estimación de la mano de obra (MO) requerida para el debido funcionamiento de la planta. . . . .	76
<b>Cuadro 4.1</b>	Resumen de ingresos para los años 1, 2 y 3 para ambos escenarios. . . . .	90
<b>Cuadro 4.2</b>	Resumen de inversión y depreciación anual para el escenario A. . . . .	91
<b>Cuadro 4.3</b>	Resumen de inversión y depreciación anual para el escenario B. . . . .	92
<b>Cuadro 4.4</b>	Desglose del balance de gastos preoperativos. . . . .	93
<b>Cuadro 4.5</b>	Desglose del balance de gastos operativos. . . . .	94
<b>Cuadro 4.6</b>	Desglose del balance de costos para los Escenarios A y B. . . . .	96
<b>Cuadro 4.7</b>	Desglose de costos por concepto de materia prima para el escenario A. . . . .	97
<b>Cuadro 4.8</b>	Costos por concepto de materia prima para el Escenario B. . . . .	98
<b>Cuadro 4.9</b>	Capital de trabajo para el Escenario A y para el Escenario B en los años 1, 2 y 3. . . . .	99
<b>Cuadro 4.10</b>	Resumen del flujo neto de efectivo para el Escenario A. . . . .	100
<b>Cuadro 4.11</b>	Resumen del flujo neto de efectivo para el Escenario B. . . . .	101
<b>Cuadro A.1</b>	Resultados del balance de masa del evaporador correspondiente al Escenario A. . . . .	125
<b>Cuadro A.2</b>	Balance de masa para un biorreactor durante los 3 días de operación correspondiente al Escenario A. . . . .	125
<b>Cuadro A.3</b>	Balances de masa de la microfiltración empleada para la cosecha celular en el Escenario A. . . . .	125

Cuadro A.4 Flujo de entrada y de salida del homogenizador del Escenario A.	126
Cuadro A.5 Resultados del balance de masa de la microfiltración de la etapa de purificación del Escenario A.	126
Cuadro A.6 Resultados del balance de masa de la ultrafiltración de la etapa de purificación del Escenario A.	126
Cuadro A.7 Flujos de entrada de TAGs y alcohol etílico y flujo de biodiesel de salida correspondientes al reactor en donde se lleva a cabo el proceso de transesterificación para el Escenario A.	126
Cuadro A.8 Resultados del balance de masa para el Escenario B en el año 1 de producción.	127
Cuadro A.9 Resultados del balance de masa para el Escenario B en el año 2 de producción.	128
Cuadro A.10 Resultados del balance de masa para el Escenario B en el año 3 de producción.	129
Cuadro A.11 Resumen de la estimación de la mano de obra (MO) requerida para el debido funcionamiento de la planta.	130
Cuadro A.12 Resumen de ingresos para los años 1, 2 y 3 para ambos escenarios.	130
Cuadro A.13 Resumen de inversión y depreciación anual para el escenario A.	131
Cuadro A.14 Resumen de inversión y depreciación anual para el escenario B.	131
Cuadro A.15 Desglose del balance de gastos preoperativos.	132
Cuadro A.16 Desglose de costos de materiales auxiliares.	132
Cuadro A.17 Desglose de cargas sociales aplicadas a la estimación de salarios.	133
Cuadro A.18 Desglose de estimación de salarios para el personal.	133
Cuadro A.19 Desglose de estimación de salarios para los operarios.	133
Cuadro A.20 Desglose de costos por concepto de servicios.	133
Cuadro A.21 Desglose del balance de gastos operativos.	134

<b>Cuadro</b> A.22 Desglose de costos por concepto de materia prima para el	
escenario A.	134
<b>Cuadro</b> A.23 Costos por concepto de materia prima para el Escenario B.	135
<b>Cuadro</b> A.24 Desglose del balance de costos para los Escenarios A y B.	136
<b>Cuadro</b> A.25 Capital de trabajo para el Escenario A y para el Escenario	
B en los años 1, 2 y 3.	137
<b>Cuadro</b> A.26 Resumen del flujo neto de efectivo para el Escenario A.	138
<b>Cuadro</b> A.27 Resumen del flujo neto de efectivo para el Escenario B.	139

# Índice de Figuras

<b>Figura 1.1</b> Representación esquemática del homogenizador Manton-Gaulin usado para la disrupción de células microbianas. (Figura modificada de Gomes <i>et al.</i> (2020).)	17
<b>Figura 2.1</b> Régimen de alimentación al sistema de tres biorreactores (R-1, R-2 y R-3) paralelos por parte de dos tanques de almacenamiento que contienen medio de cultivo. (Elaboración propia).	49
<b>Figura 2.2</b> Comparación de los criterios de selección para determinar su peso ponderado.	52
<b>Figura 2.3</b> Comparación de las opciones de tecnología en términos de rendimiento.	53
<b>Figura 2.4</b> Comparación de las opciones de tecnología en términos de costos operacionales.	54
<b>Figura 2.5</b> Comparación de las opciones de tecnología en términos de escalabilidad.	55
<b>Figura 2.6</b> Comparación de las opciones de tecnología en términos de consumo energético.	55
<b>Figura 2.7</b> Ponderación final de los pesos asignados a cada criterio para cada una de las tecnologías evaluadas.	56
<b>Figura 2.8</b> Comparación de los criterios de selección para determinar su peso ponderado.	60
<b>Figura 2.9</b> Comparación de las opciones de tecnología en términos de costos de implementación.	60
<b>Figura 2.10</b> Comparación de las opciones de tecnología en términos de escalabilidad.	61
<b>Figura 2.11</b> Comparación de las opciones de tecnología en términos de pureza.	61
<b>Figura 2.12</b> Ponderación final de los pesos asignados a cada criterio para cada una de las tecnologías evaluadas.	62

<b>Figura 2.13</b>	Diagrama de flujo del proceso productivo de aceites microbianos. . . . .	63
<b>Figura 2.14</b>	Diagrama representativo de las etapas que componen al proceso productivo de biodiesel a partir de aceites microbianos. . . . .	65
<b>Figura 2.15</b>	Diagrama representativo de las etapas que componen al proceso productivo de biodiesel a partir de aceites microbianos del Escenario B. . . . .	66
<b>Figura 3.1</b>	Sección de matriz del Formulario D1 en donde se realiza la evaluación del consumo afectación de agua. . . . .	74
<b>Figura 3.2</b>	Sección de matriz del Formulario D1 en donde se realiza la evaluación del consumo afectación de suelo y energía. . . . .	77
<b>Figura 3.3</b>	Sección de matriz del Formulario D1 en donde se realiza la evaluación del consumo afectación de biotopos. . . . .	78
<b>Figura 3.4</b>	Sección de matriz del Formulario D1 en donde se realiza la evaluación del impacto en aire. . . . .	78
<b>Figura 3.5</b>	Sección de matriz del Formulario D1 en donde se realiza la evaluación del impacto en agua. . . . .	79
<b>Figura 3.6</b>	Sección de matriz del Formulario D1 en donde se realiza la evaluación del impacto en suelo por residuos sólidos. . . . .	80
<b>Figura 3.7</b>	Sección de matriz del Formulario D1 en donde se realiza la evaluación del impacto en suelo por residuos peligrosos. . . . .	81
<b>Figura 3.8</b>	Sección de matriz del Formulario D1 en donde se realiza la evaluación del impacto humano. . . . .	82
<b>Figura 3.9</b>	Sección de matriz del Formulario D1 en donde se realiza la evaluación de lo que se denomina como otros riesgos. . . . .	82
<b>Figura 4.1</b>	Diagrama representativo de las etapas involucradas en los dos escenarios evaluados en el análisis financiero. (Elaboración propia). . . . .	87
<b>Figura 4.2</b>	Representación gráfica utilizada para estimar el punto de equilibrio del Escenario B. (Elaboración propia). . . . .	102
<b>Figura 4.3</b>	Percentiles de las variables de salida correspondientes al Escenario A. (Elaboración propia). . . . .	103

<b>Figura 4.4</b>	Percentiles de las variables de salida correspondientes al Es-	
	cenario B. (Elaboración propia).	104
<b>Figura 4.5</b>	Gráfico de las variables de entrada jerarquizadas según su	
	efecto en la salida media del VAN. (Elaboración propia).	105
<b>Figura 4.6</b>	Gráfico de las variables de entrada jerarquizadas según su	
	efecto en la salida media del TIR. (Elaboración propia).	105
<b>Figura 7.1</b>	Diagrama de flujo del proceso. (Elaboración propia).	147



# INTRODUCCIÓN

Costa Rica es uno de los principales fabricantes de productos lácteos de América Latina. Se estima que un 60% de la producción de leche en el país corresponde al sector industrial y el restante 40% a productores artesanales. Además, de la totalidad de productos lácteos elaborados a escala industrial, un 18% corresponde a la elaboración de quesos. A diferencia del sector artesanal, en el cual la elaboración de queso corresponde a un 89% de la totalidad de la producción. Esta actividad comercial generó en el país cerca de 396 100 000 L de suero para el 2016 (Barquero, 2016; Víquez, 2016) y para junio del 2020 se reportaban alrededor de 1 035 000 000 L (Valerio, 2020).

La elaboración de queso presenta rendimientos sumamente bajos, lo que implica que cerca del 90% del total de la leche utilizada en dicho proceso es eliminada como lactosuero. El suero láctico, además de ser un producto voluminoso, presenta una alta capacidad contaminante (DBO de 30 000 a 50 000 mg/L), un gran contenido de minerales, una elevada demanda química de oxígeno (DQO) y una alta concentración de sólidos suspendidos totales (Morillo, 2018). Mil litros de este residuo pueden llegar a equivaler, en términos de capacidad contaminante, a las aguas negras de 450 personas generadas en un día (Arce *et al.*, 2016). Consecuentemente, el lactosuero se puede identificar como uno de los mayores problemas de la industria láctea (Jiménez, 2015).

El aumento en la producción de queso y en los niveles de suero que se disponen de manera inapropiada, repercuten en la contaminación de suelos y ríos (Sanchez, 2015). En la actualidad, se considera que el suero lácteo debe ser tratado como un subproducto aprovechable y no como un residuo (Bylund, 2003), lo que cambia el paradigma y hace necesario que se generen nuevas soluciones para la gestión y revalorización de dicho residuo. Una propuesta innovadora para solucionar este tema se encuentra en la ingeniería biotecnológica.

Los aceites y grasas representan una importante materia prima que puede ser obtenida a partir de residuos como el suero láctico. Los aceites vegetales, provenientes de la soja, palma, girasol y otros cultivos, son los aceites con la mayor tasa

de producción en el mundo, lo cual implica a su vez un elevado cambio de uso de suelo e impactos ambientales relacionados a cultivos extensivos (Yang y Sha, 2020). Sin embargo, los aceites microbianos, conocidos también como aceites unicelulares, están recibiendo más atención. Los organismos eucariotas tienen la capacidad de almacenar compuestos lipofílicos de gran valor calórico, mayor que los carbohidratos y proteínas, por lo que tienen la capacidad de producir aceites de alta calidad. Esto con el beneficio de que se requiere menos espacio en comparación a los cultivos y menos recursos, como agua, para la producción (Kumar *et al.*, 2015).

El proyecto que se expone en este documento surge ante la localización de la problemática que representa la mala disposición de residuos y la gran disponibilidad del suero láctico en el país. Esto visibilizó la necesidad y oportunidad de revalorizar el suero para obtener beneficios tanto económicos como ambientales. La propuesta que se planteó para atender dichas premisas consiste en la obtención de aceites microbianos a partir de una bacteria bioingenierizada. En este documento se formula el diseño del proceso industrial requerido para obtener los aceites a partir de la bacteria y se analizan aspectos legales, ambientales y financieros que se deben considerar para poder implementar la planta productiva.

### **Objetivo General**

Realizar una propuesta técnica y financiera de un bioproceso para la producción de aceites microbianos (TAGs) a partir de una bacteria bioingenierizada del género *Rhodococcus* que utiliza suero láctico como fuente de carbono.

### **Objetivos Específicos**

- Diseñar el bioproceso de manera en que se favorezca la producción de aceites microbianos.
- Definir las acciones requeridas para mitigar el impacto ambiental del proceso propuesto.
- Determinar la rentabilidad del bioproceso mediante un análisis financiero.

## Fundamento teórico

La producción de aceites microbianos que se plantea en este trabajo tiene el objetivo de revalorizar el residuo industrial de suero láctico que abunda en nuestro país. Esto es posible gracias a una bacteria bioingenierizada que tiene la capacidad de utilizar lactosa como fuente de carbono y de acumular lípidos (triacilgliceroles) que ha desarrollado la empresa para la cual se realiza este trabajo. El proceso que se requiere llevar a cabo para favorecer la acumulación de los lípidos consiste en una primera etapa de concentración del suero, ya que el contenido inicial de lactosa es más bajo que el necesario para un adecuado crecimiento de la bacteria. Una vez que el suero alcanzó la concentración de lactosa requerida, se debe mezclar con nutrientes que favorecen el crecimiento del microorganismo. En este punto, el caldo de cultivo (suero mezclado con nutrientes) puede ponerse en contacto con la bacteria para iniciar el bioproceso, el cual se desarrolla en biorreactores. Una vez que las bacterias llegaron al fin de su etapa productiva, se debe proceder con la cosecha del producto. El primer paso consiste en separar la biomasa del caldo de cultivo restante. El segundo paso consiste en extraer los lípidos de la bacteria. Finalmente, se deben llevar a cabo etapas de separación que permitan la purificación de los lípidos.

La definición de las etapas productivas (concentración, mezclado, biorreacción, separación, disrupción celular y purificación) involucra la selección de la tecnología, de parámetros operativos, de balances de masa y energía y de análisis legales, ambientales y financieros, con el fin de asegurar la viabilidad técnica y económica del proyecto propuesto. A continuación se presenta la fundamentación teórica que respalda la propuesta técnica y financiera planteada en este proyecto para la producción de aceites microbianos.

### 1.1 Pretratamiento: acondicionamiento del suero láctico

Como se mencionó anteriormente, la primera etapa que se debe ejecutar es la del acondicionamiento del suero láctico para que sea apto como caldo de cultivo para la bacteria. El acondicionamiento, en este caso particular, implica el aumento de la concentración de lactosa en el fluido y la adición de nutrientes. Con el fin de comprender cómo llevar a cabo estas operaciones es necesario primero definir qué es

el suero láctico.

El suero láctico es el líquido resultante de la coagulación de la leche durante la elaboración de queso, se obtiene tras la separación de las caseínas y la grasa y constituye aproximadamente un 90% del volumen total de la leche. La composición del lactosuero varía dependiendo de las características de la leche de la que procede y de las condiciones utilizadas para la elaboración del queso, ya que la cuajada se puede obtener por acidificación (lactosuero ácido) o por la adición de cuajo (lactosuero dulce) (Jiménez, 2015). Aproximadamente, por cada kilogramo de queso, se producen 9 kg de suero, lo que representa entre un 85% y 90% de la leche inicial (Hernandez y Velez, 2014; Parra, 2009).

Según Parra (2009), el lactosuero contiene en promedio el 55% de los nutrientes de la leche (lactosa, proteínas solubles, lípidos, vitaminas y sales minerales). Entre los principales minerales que se encuentran en esta suspensión se tienen: potasio, calcio, fósforo, sodio y magnesio (Arce *et al.*, 2016). En promedio, el lactosuero contiene la mitad de los sólidos y el 20% de las proteínas de la leche original, además de la mayor parte de la lactosa, grasa y minerales (Hernandez y Velez, 2014).

El suero láctico que funcionará como materia prima para el bioproceso, consiste en una corriente residual proveniente de la línea de producción de queso y se caracteriza como un derivado lácteo obtenido mediante procesos de filtración con membranas. El suero láctico consiste en la corriente de permeado, lo cual significa que está constituido por fluidos y compuestos que por su peso molecular tienen la capacidad de pasar a través de la membrana utilizada.

Al tratarse de un derivado lácteo, cuando el suero va a utilizarse en un proceso productivo, es necesario aplicar una etapa de pasteurización. Para el proyecto planteado en este documento, no es necesario añadir en el diseño una etapa de pasteurización ya que la corriente de entrada de suero láctico ya se encuentra pasteurizada, sin embargo, resulta importante conocer los criterios y requerimientos técnicos que implica la pasteurización con el fin de asegurar un adecuado almacenamiento y desplazamiento del fluido.

### 1.1.1 Pasteurización

Fellows (2009) explica que la pasteurización es un tratamiento térmico moderado, el cual consiste en calentar a temperaturas inferiores de los 100°C con el objetivo de eliminar microorganismos y extender la vida útil de productos alimenticios. Para la eliminación de patógenos (*brucella abortis*, *mycobacterium tuberculosis*, *coxiella burnettii*) en productos lácteos (pH mayor a 4,5) se recomienda calentar a 63°C por 30 minutos, 71,7°C por 15 segundos, 88,3°C por 1 segundo o 90°C por 0,5 segundos. Por otro lado, Castrillon (2019) afirma que para un correcto tratamiento térmico del suero láctico, basta con un tiempo de retención de 15 segundos a su temperatura de pasteurización. Si no se cumplen con estos tiempos y estas temperaturas se podrían alterar los componentes de la leche, por ejemplo, la desnaturalización de las proteínas.

Garbanzo *et al.* (2015) explican que los tipos de pasteurización más utilizados en la industria son el de alta temperatura por corto tiempo (high temperature short time o HTST) y el de baja temperatura constante (low temperature holding o LTH). El sistema de pasteurización HTST es un proceso de alta eficiencia, se usa para alimentos que se encuentran en estado líquido y homogéneo, suele ser un proceso continuo que utiliza intercambiadores de calor de baja inercia térmica y de alta eficiencia y presenta tiempos de retención de aproximadamente 3 segundos.

A su vez, Garbanzo *et al.* (2015) y Rahman (2007), explican que la pasteurización LTH es el sistema que se suele seleccionar cuando se tienen volúmenes de trabajo inferiores a los 800 litros. Básicamente, el modo en que opera este sistema, es sometiendo el fluido a bajas temperaturas (de 63,5°C a 68°C) por un período de al menos 30 minutos. Si bien esta metodología es menos eficiente, los costos de implementación son considerablemente menores. Este tipo de pasteurización puede utilizar agua caliente, vapor de agua o resistencias eléctricas para promover el calentamiento deseado.

Una vez que el producto fue pasteurizado, es necesario mantenerlo a temperaturas entre los 2°C y 5°C con el fin de mantener su carácter estéril. Por lo que si después de pasteurizado el producto se almacenará antes de llegar al inicio del proceso productivo de aceites, se debe velar por el cumplimiento de la cadena de

frío (Garbanzo *et al.*, 2015).

Partiendo de suero láctico que tuvo un proceso adecuado de pasteurización, un debido almacenamiento y transporte hasta el punto de partida del proceso productivo de aceites microbianos, el primer paso a realizar es concentrarlo para aumentar su contenido de lactosa y que sea suficiente para favorecer el desarrollo de la bacteria. Si bien existen numerosas metodologías para concentrar fluidos, desde métodos térmicos hasta filtración por membranas, las partes interesadas de este proyecto realizaron la solicitud de utilizar la operación de evaporación al vacío, ya que cuentan con el equipo y personal capacitado para su uso. Debido a esto, solo se presentará a continuación una revisión bibliográfica de la operación unitaria de evaporación.

### 1.1.2 Evaporación

Según Schuck *et al.* (2015), uno de los métodos más utilizados para la remoción de agua en la industria láctea es la evaporación al vacío. La evaporación se basa en la transferencia de calor entre el vapor de condensación y el fluido a concentrar (Gourdon *et al.*, 2015). Dicha etapa suele requerir un alto consumo energético, ya que para poder evaporar 1 kg de agua de un producto lácteo, se requiere la condensación de 1,1 kg de vapor primario, lo que conlleva un costo energético aproximado de 2700 kJ/kg (Robinson, 1993).

Schuck *et al.* (2015) y Gourdon *et al.* (2015) explican que una técnica utilizada para disminuir el costo de concentración por evaporación al vacío consiste en utilizar una configuración de múltiples etapas conformadas por evaporadores de una sola etapa conectados entre sí. De esta manera, es posible calentar la primera etapa (el primer evaporador) con vapor primario y las demás con niebla de vapor generado en la etapa que les antecede. La última etapa se debe conectar a un condensador, equipo que se encarga de generar el vacío en la totalidad del sistema. De esta manera, el costo energético para la remoción de agua utilizando evaporación al vacío con  $n$  etapas sería de  $\frac{2700}{n}$  kJ/kg.

Los evaporadores de película descendente son de los equipos más utilizados en la industria de productos lácteos (Tanguy *et al.*, 2015), específicamente, los de configuración vertical (Gourdon *et al.*, 2015). En dicho equipo, el líquido ingresa por

la parte superior y se desplaza por los tubos en forma de película, abandonando el equipo por la parte inferior junto con el vapor (Morison *et al.*, 2006). Estos equipos tienen las ventajas de presentar bajos tiempos de residencia y altas tasas de transferencia de calor con cambios mínimos en la temperatura (Salvagnini y Taqueda, 2004). Además, son altamente recomendados para el tratamiento de productos termosensibles, ya que el vacío ayuda a disminuir la temperatura de ebullición (Tanguy *et al.*, 2015).

La concentración máxima que se puede alcanzar en un evaporador al vacío depende de la viscosidad del concentrado, la cual depende de la cantidad de sólidos totales y de la temperatura de operación (Tanguy *et al.*, 2015). Otras propiedades físicas que se requieren para llevar a cabo el diseño de esta operación son: densidad, calor específico, conductividad térmica y elevación del punto de ebullición (Gourdon *et al.*, 2015). Por otro lado, la característica más importante de la superficie de transferencia de calor del evaporador es el diseño geométrico, el cual comprende el largo y el diámetro de los tubos. Actualmente, los tubos llegan a tener largos de hasta 18 m (Wastergaard, 2004).

Según Green y Southard (2019) las principales ventajas que presentan los equipos de evaporación verticales de película descendente con tubos largos son: bajos costos, gran superficie de calentamiento en una sola unidad operativa, bajo tiempo de retención, ocupa poco espacio de planta y buenos coeficientes de transferencia de calor a cualquier diferencial de temperatura. Como desventaja de este equipo, se tiene que suele requerir de recirculación.

Una vez que se tiene el lactosuero acondicionado a la concentración de lactosa requerida, se procede a mezclarlo con nutrientes en tanques agitados para obtener el caldo de cultivo en el cual crecerá la bacteria. La etapa de desarrollo de la bacteria, que es también la etapa en la que se acumulan los aceites de interés, se lleva a cabo en biorreactores.

## 1.2 Biorreacción: producción de lípidos (TAGs)

Para poder definir una debida etapa de biorreacción, es necesario primero conocer algunas generalidades del microorganismo involucrado en el proceso. La bacteria

que se utiliza en el diseño planteado es la especie *Rhodococcus opacus* del género *Rhodococcus* (también conocida como *R.opacus*) y se caracteriza por ser *gram positiva*. La pared celular de bacterias *grampositivas* consiste en el espacio periplásmico entre la membrana de plasma y una capa peptidoglycan gruesa, además estas bacterias tienen ácidos teicoicos dentro de la pared celular (Farrar, 2018), estas características son relevantes para la etapa de disrupción celular. Adicionalmente, la *R.opacus* se conoce como uno de los productores de lípidos más relevantes gracias a su capacidad de acumular dichos compuestos en forma de triacilgliceroles (Castro et al., 2016). Esta característica es la que se aprovecha y se debe favorecer en la etapa de biorreacción para obtener el producto deseado.

El principal objetivo de los biorreactores es el de controlar, contener y afectar positivamente la reacción biológica. Para lograr esto, es necesario proveer un ambiente con condiciones asépticas y controladas, promover una distribución y contacto adecuado entre el medio y los gases con el biocatalizador y controlar con facilidad los parámetros de la reacción (Panda, 2011). Los parámetros deben ser los adecuados tanto para el sistema biológico como para el químico y el físico, el cual consiste en la macrocinética del bioproceso, es decir, el crecimiento microbiano y la producción de metabolitos (Williams, 2002). Por lo tanto, la selección y diseño de un biorreactor depende de la naturaleza del bioproceso, es decir: tipo de cultivo a procesar (células vegetales, células animales, enzimas), estado del medio en el que se va a llevar a cabo la fermentación (sólido, líquido), composición del medio, tasa de reacción, entre otras (Panda, 2011).

Los principales parámetros por controlar y definir para llevar a cabo una bioreacción son: pH, temperatura, sustrato (fuente de carbono), disponibilidad de agua, sales para nutrición, vitaminas, oxígeno (para procesos aeróbicos), evolución de los gases y remoción de producto y subproductos (Williams, 2002). Con respecto al rendimiento del bioproceso, se tiene que los tres factores con mayor incidencia son: agitación, efecto de corte (fuerza por unidad de área que actúa en una superficie en dirección tangencial que surge de una variación en la velocidad, provocada por los procesos de agitación y mezclado y puede causar estrés en las células del microorganismo) y transferencia de calor (Panda, 2011).

En el diseño y escalamiento de procesos en biorreactores, algunas de las principales consideraciones son: mezclado, tiempos de mezcla y transferencia de masa del gas. El mezclado se suele caracterizar en términos de potencia por unidad de volumen, tiempo de mezcla, número de Reynolds, tasa de transferencia de masa y cizallamiento hidrodinámico (Green y Southard, 2019). Además, es necesario que el bioproceso sea efectivo y rentable, lo cual depende del costo del medio de cultivo y de los suplementos, del tiempo de operación, del crecimiento de las bacterias, del rendimiento del producto y de las concentraciones de nutrientes y de subproductos en el medio (Yang y Sha, 2020). Si el medio de cultivo y los suplementos son muy costosos, la rentabilidad del proyecto se puede ver afectada ya que puede implicar más costos que beneficios. Si el tiempo de operación es muy elevado, puede afectar también a la rentabilidad del proceso ya que los gastos operativos pueden ser significativamente altos. Si el crecimiento de las bacterias es ineficiente, el bioproceso puede no ser efectivo, al igual que si el rendimiento es muy bajo, lo cual afecta tanto a la efectividad como a la rentabilidad, ya que realizar un proceso extenso y costoso para obtener solo una pequeña porción de producto que se puede colocar y vender en el mercado, afecta los beneficios del proyecto. Los subproductos son un factor indispensable a considerar, ya que pueden dificultar gravemente las etapas de purificación, que suelen ser costosas y con complejidad técnica, teniendo el poder de incidir en la efectividad y rentabilidad de todo el proyecto.

A continuación, se presenta un repaso bibliográfico de los parámetros mencionados, que resultan importantes para la definición técnica de la etapa de biorreacción para la obtención de aceites microbianos.

### 1.2.1 Oxígeno disuelto

El oxígeno es el sustrato gaseoso más importante para el metabolismo microbiano y el anhídrido carbónico es el producto metabólico más importante. El oxígeno es poco soluble en agua y es relativamente escaso en el aire (20,8 %). Una solución saturada de oxígeno contiene unos 9 mg/L de este gas en agua debido a la influencia de los ingredientes del cultivo, el contenido máximo de oxígeno realmente es más bajo de lo que debería de ser en agua pura. Según la ley de Henry, la solubilidad

del oxígeno en soluciones de nutrientes está relacionada con la presión parcial del oxígeno en la fase gaseosa (Sanz, 2017).

La solubilidad del oxígeno desciende a medida que aumenta la temperatura. Al aumentar la concentración de oxígeno en fase gaseosa, se consigue aumentar la proporción de oxígeno en la solución de nutrientes. La presión más alta de oxígeno se consigue durante la aireación con oxígeno puro. En agua se disuelven 43 mg de oxígeno por litro cuando se utiliza oxígeno puro, en comparación con el valor obtenido al utilizar aire que era de 9 mg de oxígeno por litro (Sanz, 2017).

El oxígeno disuelto debe transferirse desde la burbuja de gas a cada célula individual. Para ello se deben superar varias resistencias, la primera es dentro de la película de gas a la interfase. Luego la penetración de la interfase entre la burbuja de gas y el líquido, seguido por la transferencia desde la interfase al líquido. Después, movimientos dentro de la solución de nutrientes y por último la transferencia a la superficie de la célula (Sanz, 2017).

La concentración crítica de oxígeno es el término utilizado para expresar el valor de la velocidad específica de absorción de oxígeno que permite la respiración sin impedimentos. Dicho parámetro suele tener valores específicos para cada microorganismo, oscilando entre el 5% y el 25% de los valores de saturación de oxígeno en los cultivos (Sanz, 2017).

La totalidad de flujo de gas que se debe suministrar a un bioreactor, típicamente, para un proceso microbiano es del volumen del reactor por minuto (Hall, 2018). Para asegurar un debido suministro, se utilizan técnicas de agitación dentro del equipo.

### 1.2.2 Agitación

Green y Southard (2019) exponen que la demanda global de oxígeno de las células debe satisfacerse suministrando oxígeno a partir de un gas de burbujeo, el cual puede ser aire, oxígeno o aire enriquecido con oxígeno. El diseño y el funcionamiento del biorreactor deben ser capaces de lograr una tasa de transferencia de masa de oxígeno igual a la demanda de oxígeno del cultivo celular a la densidad celular viable máxima. Por lo tanto, la combinación agitador-rociador es una de las consideraciones de diseño más importantes debido a la baja solubilidad del oxígeno y a las altas

tasas de transferencia que se requieren para satisfacer la demanda metabólica de un bioproceso. La dispersión de gas depende del tamaño del agitador, de la velocidad, del diseño y de la ubicación relativa del impulsor y del rociador.

Una adecuada agitación aumenta el área de transferencia de oxígeno, favorece la dispersión del aire en la solución de nutrientes, homogeniza las condiciones (temperatura, pH, concentración) de la mezcla, favorece la suspensión de los microorganismos y de los nutrientes sólidos, asegura la transferencia de gases, dispersa los líquidos inmiscibles y disminuye el grosor de la interfase gas-líquido al crear un flujo turbulento (Sanz, 2017).

Los procesos de fermentación microbiana poseen un alto metabolismo y densidad celular, por lo tanto, requieren de altos flujos de gas con el fin de proporcionar suficiente oxígeno y reducir la concentración de dióxido de carbono. Sin embargo, un alto nivel de burbujeo o agitación, puede presentar efectos adversos, como una alta retención de gas o esfuerzos de corte excesivos que provoquen daño a los microorganismos (Green y Southard, 2019; Sanz, 2017).

Según Sanz (2017), existen tres tipos de agitación que se utilizan en procesos de fermentación: agitadores rotativos (mecánico), columnas de burbujas y sistema aero-elevado. González (2018) recomienda que para volúmenes superiores a los 500  $m^3$  no se utilice agitación mecánica ya que el requerimiento energético para lograr una mezcla adecuada en estos volúmenes es demasiado alto, por lo que el costo asociado lo hace poco rentable. Sin embargo, el agitador rotativo es el más utilizado, ya que es más flexible en condiciones de operación, es más fácil de conseguir comercialmente y provee una eficiente transferencia de gases a las células (Sanz, 2017).

Un proceso de fermentación puede ser considerado como un sistema de tres fases que implica reacciones líquido-sólido, gas-sólido y gas-líquido. La agitación facilita la transferencia de oxígeno, la mezcla de los nutrientes y la homogenización de la mezcla (Sanz, 2017).

### 1.2.3 Temperatura

Según Sanz (2017), la temperatura es un parámetro en la fermentación muy importante ya que afecta el funcionamiento de las células. Los organismos cuya

temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre los 20°C y 50°C se denominan mesófilos. Cabe destacar que las temperaturas óptimas para el crecimiento microbiano y formación de producto son diferentes.

Durante la fermentación la temperatura se va incrementando hasta llegar a la temperatura de crecimiento óptimo y la velocidad de crecimiento se incrementa aproximadamente el doble por cada 10°C que aumenta la temperatura. Una vez superada la temperatura óptima, la velocidad de crecimiento disminuye y se puede producir muerte celular. Sin embargo, durante el proceso, la temperatura se debe mantener constante (Sanz, 2017).

#### 1.2.4 pH

El pH en un bioproceso tiene menos efecto sobre la actividad biológica de los microorganismos que la temperatura. La mayor parte de los microorganismos crecen de forma óptima entre pH 5,5 y 8,5. Aún así, el pH es uno de los parámetros que más se tienen que controlar, ya que durante la fermentación se liberan metabolitos celulares que pueden alterar el pH del medio, lo cual puede interferir con la formación de producto y con la viabilidad del microorganismo en el medio (Sanz, 2017).

#### 1.2.5 Configuración

Una decisión importante que se debe tomar durante el diseño de un bioproceso, corresponde a la configuración o tipo de biorreactor a utilizar. Actualmente, la mayoría de bioprocesos industriales son tipo batch o fed-batch (batch con alimentación) (Cinar *et al.*, 2003). En principio, los bioprocesos continuos podrían ser más económicos comparados con los de tipo batch o fed-batch (Verbelen *et al.*, 2006), sin embargo, presentan debilidades como: obtención de bajas concentraciones de productos, mayor complejidad del procesamiento posterior de los productos, del diseño de flujo del proceso y del mantenimiento de las condiciones estériles (Li *et al.*, 2014).

Yang y Sha (2020) y Williams (2002) explican que en los procesos de fermentación tipo batch, los microorganismos son inoculados en un volumen fijo. Conforme crecen, los nutrientes se van consumiendo y los productos se van acumulando. Por lo tanto,

el ambiente del cultivo cambia de manera constante y el caldo de fermentación se remueve al final de cada corrida. La curva de crecimiento se caracteriza por iniciar con la fase de latencia, en la cual los organismos crecen lentamente debido a que se están adaptando al nuevo ambiente. Seguidamente, se tiene la fase de crecimiento exponencial, período que se caracteriza por una tasa de división constante de los microorganismos. Después de esto, se tiene la fase de crecimiento estacionario, en la cual los nutrientes se empiezan a agotar y los productos a acumular. Esta fase es en la que se lleva a cabo la cosecha del cultivo, ya que la etapa que sigue es la de la muerte.

La fermentación fed-batch es el modo de operación más utilizado en la industria de los bioprocesos (Yang y Sha, 2020). Los microorganismos son inoculados y se dejan crecer en un régimen batch durante cierto tiempo. Luego, se añaden nutrientes y se incorporan al sistema en incrementos durante el tiempo restante de operación. Finalmente, la totalidad del cultivo suspendido se retira al final de cada corrida. El inicio de la alimentación se suele determinar por la limitación de sustrato en el caldo y el perfil de suministro en el tiempo se debe establecer de manera en que el sustrato nunca se encuentre en exceso pero que siempre haya disponible para favorecer el crecimiento. En este tipo de configuración, es usual obtener una acumulación excesiva de biomasa en la fase de crecimiento exponencial. Debido a esto, es que la fermentación fed-batch se recomienda cuando el proceso requiere una alta producción de biomasa. Además, debido a que el sustrato nunca se encuentra en exceso, la generación de subproductos es limitada (Williams, 2002; Yang y Sha, 2020).

En la fermentación continua, se tiene un suministro constante de medio fresco al mismo tiempo en que medio ya utilizado y células son cosechadas. Los nutrientes consumidos se reemplazan y metabolitos tóxicos se remueven del cultivo. Por lo tanto, el volumen de operación es constante, ya que el medio fresco se añade a la misma tasa que se remueve el medio utilizado. Esto puede facilitar el escalamiento de la operación. Además, la tasa de intercambio del medio de cultivo se puede optimizar para alcanzar el estado estable, lo que haría que el proceso fuera más competitivo a nivel económico. Los cultivos en estado estable se pueden mantener por días,

semanas o incluso meses (Yang y Sha, 2020). Sin embargo, tiempos prolongados de cultivación pueden resultar desafiantes para mantener la esterilidad del proceso y para las transformaciones subsiguientes a las que se debe someter el producto (Li *et al.*, 2014).

### 1.2.6 Escalamiento

Para llevar a cabo el diseño y el escalamiento geométrico del biorreactor, se pueden utilizar parámetros típicos como los que se muestran a continuación expuestos por Hall (2018):

- Relación de volumen de trabajo a volumen total de 0,8
- Diámetro del impulsor a diámetro del tanque de 0,3
- Altura de tanque a diámetro de tanque 2:1
- Altura del líquido a diámetro de tanque 1,6:1
- Relación de rechazo 5:1

Adicionalmente, se tienen parámetros de ingeniería que pueden ser utilizados como un punto de partida en el diseño y definición de condiciones operativas del bioproceso: entrada de alimentación de energía de 10 W por metro cúbico, velocidad periférica menor a 1,8 m/s y tiempo de mezclado proporcional al diámetro del tanque y a la potencia (2/3) (Hall, 2018).

Una vez finalizada la etapa de biorreacción, ya se obtuvo el producto de interés, en este caso, aceites microbianos. Sin embargo, estos aceites se encuentran dentro de la estructura celular de las bacterias, por lo que hay que someter a los microorganismos a etapas de disrupción celular para la liberación de los lípidos y plantear etapas de separación para la purificación del producto.

## 1.3 Bioseparación: recuperación lípidos producidos (TAGs)

Las operaciones de bioseparación en procesamientos biotecnológicos consisten en cuatro etapas: recuperación, concentración, purificación y acabado. La etapa

de recuperación, en este caso, corresponde a un proceso de disrupción celular para poder acceder a los lípidos acumulados intracelularmente. Una vez que se tienen los lípidos extraídos en suspensión con los demás restos celulares y medio de cultivo, se procede a concentrarlos. Cuando la corriente del producto ya está concentrada, se somete a operaciones de purificación y acabado, las cuales dependerán de la pureza y presentación que se busque obtener para comercializar el producto (Tejeda *et al.*, 2011).

Bharathiraja *et al.* (2017), indican que el proceso de bioseparación de lípidos microbianos suele presentar buenos rendimientos a escala de laboratorio, sin embargo, esto no garantiza una adecuada industrialización de la operación. En algunos casos, en producciones de mayor escala, la separación de lípidos resulta muy costosa. Por lo tanto, la viabilidad de la producción de aceites microbianos depende en gran parte de la obtención de una alta tasa de conversión del sustrato en lípidos intracelulares y de un proceso de recuperación, concentración, purificación y acabado eficiente y de bajo consumo energético.

Green y Southard (2019) proponen un esquema para seleccionar las operaciones de recuperación y purificación. La primera etapa consiste en una separación sólido-líquido, la cual se puede llevar a cabo mediante: centrifugación, precipitación, filtración o extracción. Seguidamente, si la fase líquida separada contiene producto, se debe someter a un proceso preliminar de aislamiento y purificación. Esto puede llevarse a cabo mediante una cromatografía, precipitación, extracción o filtración. Con respecto a la fase sólida, en el caso de que el producto se encuentre dentro de las células, se debe realizar una lisis o disrupción celular. Seguido de la disrupción, se debe realizar una separación primaria del producto y solubilizarlo para proceder al proceso preliminar de aislamiento y purificación anteriormente descrito. Las corrientes de producto se deben someter a la purificación final, la cual suele llevarse a cabo mediante cromatografía, precipitación, cristalización o ultrafiltración.

De manera similar, Tejeda *et al.* (2011), propone operaciones para cada tipo de proceso de bioseparación. Para la etapa de recuperación las operaciones recomendadas son: filtración, centrifugación y rompimiento celular. Para el proceso de concentración se proponen: extracción, adsorción, ósmosis inversa, ultrafiltración,

precipitación y destilación. Para la purificación se recomiendan: cromatografía, precipitación, ultrafiltración, ósmosis inversa, electroforesis, diálisis y electrodiálisis. Finalmente, para el acabado se presentan las opciones de secado, liofilización y cristalización.

A continuación, se presentará una fundamentación bibliográfica para cada una de las etapas involucradas en la recuperación de los lípidos producidos.

### 1.3.1 Etapa de cosecha celular

Según (Green y Southard, 2019), la centrifugación y la filtración por membranas (microfiltración o ultrafiltración) son las técnicas más utilizadas para la cosecha celular a gran escala. Sin embargo, la centrifugación puede conllevar disrupción celular y se recomienda para microorganismos densos con células que tengan diámetros mayores a 2  $\mu\text{m}$ . En cambio las técnicas de filtración operan con un esfuerzo de corte menor, por lo que no promueven la disrupción indeseada de las células y tienen tasas de recuperación de producto mayores. Mediante centrifugación se puede perder hasta un 50% de supernadante y mediante filtración se puede suponer que se da una recolección total de las células.

### 1.3.2 Etapa de recuperación

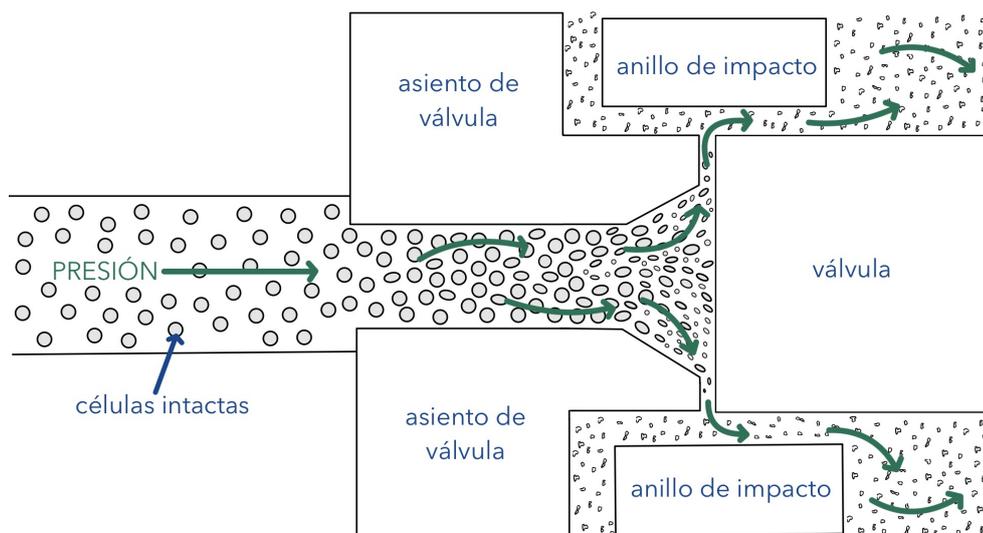
Para el proceso planteado en este trabajo, el producto de interés se encuentra almacenado en el interior de las células bacterianas, por lo tanto, la recuperación del mismo implica una disrupción o lisis celular. Según Yu *et al.* (2014), la disrupción celular puede realizarse mediante métodos mecánicos (severos) y no mecánicos. Los métodos no mecánicos consisten en procesos de lisis celular con ácido, álcali, enzimas o shock osmótico, sin embargo, resultan ser muy costosos y corrosivos para aplicarlos a nivel industrial. Por otro lado, los mecanismos mecánicos se consideran altamente escalables, eficientes y con bajos costos de operación, no obstante, suelen tener un alto consumo energético.

Kar y Singhal (2015) y Anand *et al.* (2007) indican que los principales métodos de disrupción celular que entran en la categoría de mecanismos severos son: ultrasonido, homogenizador de alta presión, prensa francesa y microesferas. Las desventajas

principales de estos métodos son la baja selectividad y liberación simultánea de diferentes componentes del citoplasma, lo que podría dificultar el procesamiento posterior. No obstante, para una escala industrial, los métodos mecánicos son los más apropiados (Peternel, 2013).

El uso de ultrasonidos consiste en inducir una intensa acción de corte a través de ondas sónicas de alta frecuencia (Liu *et al.*, 2013). Es necesario aplicar ciclos de refrigeración y baños de agua helada para evitar la degradación de productos termolabiles (Borthwick *et al.*, 2005; Tangtua, 2014). Esta técnica está siendo ampliamente estudiada debido a su alto potencial de escabilidad y bajos costos operativos (Ustun-Aytekin *et al.*, 2016), además, es una opción apropiada para aplicaciones alimenticias (Peralta *et al.*, 2019).

El homogenizador de alta presión se ha caracterizado por presentar altas eficiencias, sobre todo en muestras de volumen elevado. Además, a pesar de que esta tecnología no libera selectivamente el producto, es el método estándar para aplicaciones a nivel industrial (Balasundaram y Harrison, 2006). El homogenizador de alta presión Manton-Gaulin es el más común en la industria, está compuesto por una bomba pistón y un conjunto de válvulas homogenizadoras, tal como se muestra en la Figura 1.1.



**Figura 1.1.** Representación esquemática del homogenizador Manton-Gaulin usado para la disrupción de células microbianas. (Figura modificada de Gomes *et al.* (2020).)

[Drévillon et al. \(2019\)](#) afirma que en un homogenizador de alta presión, la suspensión celular se presuriza (20 MPa - 120 MPa) mediante una bomba de desplazamiento positivo, lo cual fuerza al fluido a atravesar una cavidad estrecha que provoca la liberación de la presión por parte de la disolución, promoviendo velocidades de flujo de aproximadamente 400 m/s. El esfuerzo cortante y la turbulencia son los causantes de la disrupción celular en este equipo. Además de la presión de operación, la cantidad de veces que se pase al fluido a través de la válvula, es una variable de operación de suma relevancia y depende del tipo de célula microbiana ([Drévillon et al., 2019](#); [Harrison, 2011](#)).

Un reto operativo que presenta la homogenización a alta presión corresponde al aumento de temperatura que se puede presentar debido a que entre el 40% y el 60% de la energía suministrada mediante la presión se transforma en calor de fricción ([Cortés-Muñoz et al., 2009](#)), lo que ocasiona en promedio un aumento de 0,15°C - 0,20°C por cada MPa ([Donsi et al., 2013](#)). [Middelberg \(2000\)](#) presenta otra relación, la cual determina que por cada 10 MPa la suspensión se calienta 2,5°C.

Una ventaja que presenta la operación de homogenización a alta presión es que el caldo de fermentación se puede introducir al equipo sin haber sido pretratado o preconcentrado ([Middelberg, 2000](#)), ya que se ha logrado determinar que las viscosidades bajas son favorables para obtener una mayor disrupción ([Coccaro et al., 2018](#)).

El molino de perlas es otro equipo utilizado para la disrupción celular. No obstante, el control de parámetros operativos como diámetro, densidad y empaquetamiento de las perlas, velocidad de agitación y tasa de alimentación, es muy complejo. La cámara de molienda puede ser tanto vertical como horizontal ([Carevic et al., 2015](#); [Günerken et al., 2015](#)). En este tipo de tecnología, el eje del molino está equipado con agitadores, los cuales se encargan de impartir energía cinética al sistema, promoviendo la colisión entre las perlas y las células y, consecuentemente, la disrupción celular ([Middelberg, 1995](#)). Otras condiciones que afectan la disrupción celular en este método son: tamaño de perlas, densidad de perlas, concentración de biomasa, flujo y capacidad de carga ([Montalescot et al., 2015](#)). [Kula y Schüte](#)

(1987) recomiendan una carga de perlas del 80% al 85% para mejorar la eficiencia y evitar el calentamiento de la suspensión celular, ya que cuantas más perlas se tengan, mayor probabilidad de colisionar con ellas de parte de las células y por lo tanto, mayor liberación de energía (la cual se libera, entre otras posibles formas, como energía calórica).

La selección del diámetro de las microesferas se realiza con base en el tipo de célula. Para el caso de disrupción de células microbianas se recomiendan diámetros de 0,1 mm (Goldberg, 2015; Postma *et al.*, 2017). La biomasa celular debe ser mezclada en un buffer refrigerante antes de ser sometida al proceso de disrupción, esta es una medida que ayuda a resguardar la estabilidad de ciertas condiciones de la mezcla (como el pH) que pueden verse afectadas por la liberación de compuestos intracelulares y por la energía liberada por las colisiones a las que se someterá la biomasa. Además, se recomienda que las perlas de vidrio sean pretratadas con ácido clorhídrico concentrado durante unas horas, seguidamente enjuagadas y secadas durante 16 horas a 150°C y finalmente enfriadas hasta 4°C antes de la operación (Gomes *et al.*, 2020), con el fin de velar por el funcionamiento óptimo de la operación, evitar el sobrecalentamiento y resguardar la integridad de las perlas y de la mezcla a disrumpir. Otros materiales como arena de cuarzo, zirconio y mallas cerámicas, pueden ser utilizadas para la lisis celular en agitadores tipo vórtex o cámaras de molienda, sin embargo son tecnologías menos eficientes que los molinos de perlas (Carevic *et al.*, 2015; Günerken *et al.*, 2015).

Los métodos no severos o suaves tienen una demanda energética menor que los métodos mecánicos, actúan mediante la permeabilización de la membrana celular y se pueden dividir en: métodos físicos (shock osmótico, congelación-descongelación, termolisis), métodos químicos y métodos enzimáticos. Los métodos físicos son opciones de poca viabilidad para el caso específico de disrupción celular de las especies *Rhodococcus opacus*. En el caso del shock osmótico, la no viabilidad se debe a que se ha demostrado que las bacterias *Gram-positivas* no son susceptibles a este método (Gomes *et al.*, 2020), en el de congelación-descongelación, porque su aplicabilidad es limitada debido a que requiere tiempos elevados de operación y un alto consumo energético (Peralta *et al.*, 2019) y en el de termolisis, porque es mayoritariamente

utilizado para la liberación de enzimas, no de compuestos intracelulares bacterianos como lípidos (Ren *et al.*, 2007).

Los métodos químicos consisten en utilizar disolventes de tipo orgánico, álcalis o detergentes para romper la pared celular. En general, los disolventes orgánicos utilizados para este fin (etanol, tolueno, cloroformo, acetona, éter, etc.) no suelen ser de grado alimenticio. Esta es una característica importante a considerar dependiendo de la aplicación que se le dará al producto de interés. Adicionalmente, el uso de estos disolventes implica una mayor complejidad para la separación final del producto, lo cual se traduce también en costos más elevados (Geciova *et al.*, 2002). Gomes *et al.* (2020), indican que los álcalis o bases solo pueden ser utilizados para recuperar biomoléculas con una alta resistencia a pH elevados, lo cual limita significativamente su aplicación tanto a nivel de industria como a nivel de laboratorio y, por otro lado, el uso de detergentes para la disrupción celular tiene aplicabilidad si las bacterias son del tipo *Gram-negativas*.

A escala de laboratorio, uno de los métodos más utilizados es el de Folch. La técnica consiste en una primera etapa de homogenización del tejido con cloroformo: metanol [2:1], seguido de una filtración. La segunda etapa consiste en limpiar el filtrado utilizando un volumen de agua al menos 5 veces mayor al del filtrado, durante este proceso se reporta la pérdida del 1% de los lípidos de interés (Folch *et al.*, 1957). Por otra parte, el método Bligh y Dyer es similar al método Folch, utiliza también cloroformo y metanol como solventes, pero en una proporción diferente, sin embargo, este método solo es capaz de extraer una porción de los lípidos (Bligh y Dyer, 1959).

Cabe destacar que el uso de solventes orgánicos puede presentar algunas desventajas como: degradación de constituyentes de los aceites microbianos debido a las altas temperaturas requeridas y a la remoción del solvente y solubilización de otros componentes de la pared celular de los microorganismos. Se ha investigado respecto a pretratamientos que se puedan aplicar para evitar las desventajas mencionadas, tal como: adición de base, ácido y enzimas y uso de microondas (Yu *et al.*, 2014).

La disrupción de células microbianas utilizando enzimas, es una tecnología prometedora y con una alta eficiencia energética (Zheng *et al.*, 2016). Las enzimas pueden sustituir métodos mecánicos en los casos en que la biomolécula puede afectarse fá-

cilmente por presión y fuerzas de velocidad. Entre las ventajas que presenta la lisis enzimática se encuentra la alta selectividad (De Carvalho *et al.*, 2017). Otro tipo de lisis enzimática consiste en la autólisis, la cual puede ocurrir naturalmente o ser inducida mediante la reducción o agotamiento de nutrientes o mediante el uso de altas temperaturas (Tanguler y Erten, 2008).

### 1.3.3 Etapa de concentración

Una vez que el producto es liberado de la célula, se debe proceder a la remoción de desechos celulares antes de someterlo a procesos de concentración. Esto se puede llevar a cabo mediante una o varias operaciones, como centrifugación o separación con tecnología de membranas (Tejeda *et al.*, 2011). La etapa de concentración también puede llevarse a cabo utilizando tecnología de membranas, como ultrafiltración y ósmosis inversa, o bien, se pueden emplear procesos de extracción, adsorción, precipitación y destilación.

La microfiltración es un proceso capaz de permear partículas desde los 10  $\mu\text{m}$  hasta los 100 nm, este rango, para el caso específico de productos lácteos, abarca: células somáticas, glóbulos grasos, bacterias, hongos, levaduras, esporas y micelas de caseína (Chacón-Villalobos, 2006). Esto es ventajoso ya que las células obtenidas en la biorreacción que se encuentran mezcladas con medio de cultivo residual, podrían ser separadas mediante una etapa de microfiltración.

Las membranas de tipo cerámica empleadas en la microfiltración de productos lácteos han demostrado ser las que presentan mejor relación entre rendimiento y durabilidad para procesos que se encuentran entre los 20°C y 50°C (Adisson-Korat y Rizvi, 2004). Además, según Adisson-Korat y Rizvi (2004) y Baruah y Belfort (2004) este tipo de proceso de separación suele emplearse con flujos de trabajo bajos, entre los 4  $\text{kg/h}\cdot\text{m}^2$  y 15  $\text{kg/h}\cdot\text{m}^2$  y con presiones transmembranarias uniformes, por lo general, menores a los 10 psi.

Otro parámetro operativo de suma importancia en la microfiltración es el pH, ya que el incremento del mismo provoca el aumento de la viscosidad relativa del fluido. Por lo tanto, se suele recomendar un ajuste constante del pH durante la operación, práctica que además de mantener controlada la viscosidad, promueve la

obtención de retenidos de adecuada concentración y reducidos en calcio (Solanki y Rizvi, 2001).

Con respecto a las limitaciones operacionales que se pueden generar en las tecnologías de separación por medio de membranas, la principal y de mayor interés para los procesamientos de productos lácteos, según Brans *et al.* (2004), es el colmataje, dicho fenómeno consiste en la formación de una capa de material sobre la membrana mientras transcurre la operación, la cual afecta la eficiencia del proceso, ya que puede generarse la adsorción de los materiales acumulados en la membrana y el bloqueo superficial y/o profundo de los poros. El colmataje es el factor limitante, tanto técnica como económicamente en la aplicación de membranas a nivel de industria de productos lácteos, ya que provoca tanto la reducción del flujo de permeado (corriente que por su peso molecular y tamaño de partícula es capaz de atravesar la membrana) como la pérdida de selectividad en la membrana del equipo.

En la industria láctea, el colmataje se ocasiona mayoritariamente por la interacción, adsorción y deposición de proteínas (caseína y agregados, lactalbúminas, lactoglobulinas) (James *et al.*, 2003). Dichas proteínas pueden absorberse y presentar interacciones entre ellas que ocasionen la obstrucción de los poros y, de esta manera, generar un incremento en el rechazo de partículas por parte de la membrana. Esto, a su vez, puede originar un problema de polarización de la concentración.

Para evitar estos problemas operativos, se recomienda aplicar tratamientos químicos periódicos al final de la operación o bien, cada 6 o 7 horas si el proceso es continuo (Tong *et al.*, 1988). Theodore (2014) establece que la limpieza requerida para este tipo de operación, se puede llevar a cabo primero con agua y seguidamente con alguna disolución adecuada (por ejemplo hipoclorito), sin embargo, la limpieza química no debería de ser necesaria durante la operación normal. Otros factores que ayudan a controlar los problemas de colmataje son: adecuada selección de la membrana y tamaño de poro, regulación de tipo de flujo y velocidad y un adecuado manejo de la presión (Chacón-Villalobos, 2006).

Al igual que Chacón-Villalobos (2006), Slater y Hollein (1993), explican que el flujo cruzado o tangencial es la mejor configuración en procesos de microfiltración para la remoción de microorganismos. Cuando el flujo tiene una dirección paralela

a la membrana, se reduce la formación de torta y, a su vez, es capaz de arrastrar depósitos en la misma.

La ósmosis inversa o hiperfiltración, es un proceso mediante el cual se lleva a cabo la separación del agua. Es por esto que se utiliza con frecuencia como un proceso de concentración (Chacón-Villalobos, 2006). Según Benoit *et al.* (2019), la ósmosis inversa presenta mayor eficiencia (producto útil obtenido con respecto a los recursos invertidos) que los procesos de eliminación de agua tradicionales, como la evaporación. Incluso, se estima que utiliza únicamente un 10% de la energía que requieren los procesos industriales de evaporación por termocompresión (Schuck *et al.*, 2015). Sun *et al.* (2011) y Ramirez *et al.* (2006), estiman que la hiperfiltración tiene un consumo entre los 0,014 MJ y los 0,036 MJ por kilogramo de agua removida. En general, esta operación está tomando fuerza como una buena alternativa en diversos tipos de procesos gracias a su costo competitivo, simplicidad de operación y buenos rendimientos (Malaeb y Ayoub, 2011; Ravikumar *et al.*, 2014).

Los procesos de ósmosis inversa son capaces de generar retenidos con un contenido máximo de 30% en sólidos (Chacón-Villalobos, 2006). Por lo general, se utilizan 100 daltons (unidad de peso molecular) como punto de corte, una presión de 700 psig y temperaturas menores a 40°C si se utilizan membranas celulósicas o temperaturas entre los 70°C y 90°C cuando se tienen membranas inorgánicas o poliméricas (Chacón-Villalobos, 2006; Dewani y Jayaprakasha, 2004). Los parámetros de mayor importancia, en términos económicos, son el flujo de permeado y la tasa de retención (hace referencia a la cantidad de compuesto de interés que puede retener) (Lin y Chen, 1990). Asimismo, se ha reportado que la ósmosis inversa presenta un mejor rendimiento con fluidos diluidos, como lo es el suero láctico (Chamberland *et al.*, 2015).

Según OSVER Fluids Engineering (2013), las presiones de trabajo para la hiperfiltración rondan entre los 25 bar y 35 bar, la duración de las limpiezas es de 2,5 horas, las membranas son de menor costo que las de otras tecnologías de separación por membranas y el pH está relacionado con la calidad del permeado que se obtendrá. Adicionalmente, la empresa expone varios usos alternativos que se le pueden brindar al permeado como: limpieza del equipo, unidad Clean In Place (CIP) y

primera limpieza de suelos.

De manera similar a la situación expuesta para la microfiltración, el colmataje es un problema operativo que puede surgir durante el procesamiento de fluidos en equipos de ósmosis inversa (Chacón-Villalobos, 2006). El mayor impulsor de que dicho fenómeno se presente, suele ser la gelificación de proteínas lácteas que presentan atrapamiento de fosfato de calcio. En general, siempre hay posibilidad de que se presenten problemas debidos al colmataje, más aún cuando se tratan compuestos orgánicos. Como se mencionó anteriormente, esta situación puede conllevar a una reducción del flujo, daño irreversible en la membrana y aumento de costos de operación debido a la necesidad de limpiar con químicos frecuentemente (Bódalo-Santoyo *et al.*, 2004; Radjenović *et al.*, 2008).

#### 1.3.4 Etapa de purificación

Como se mencionó anteriormente, la purificación del producto en un proceso de bioseparación se puede llevar a cabo mediante una operación de cromatografía, precipitación, ultrafiltración, ósmosis inversa, electroforesis, diálisis, electrodiálisis, entre otras (Tejeda *et al.*, 2011).

Según Tejeda *et al.* (2011), la ultrafiltración es una operación que se usa con frecuencia para la concentración de proteínas. El principio de funcionamiento es que la membrana evite el paso del producto y permita el paso de las impurezas. La presión típica de operación se encuentra entre los 100 kPa y los 500 kPa y el flujo promedio de trabajo está entre los 10 L/m<sup>2</sup>h y 200 L/m<sup>2</sup>h.

Dicha tecnología es apta para compuestos con pesos moleculares superiores a los 1000 Da (Wang *et al.*, 2019). Además, tiene un límite comercial por operación simple de 0,45x10<sup>6</sup> kg/año de flujo de agua por módulo, con varios módulos por unidad (Tejeda *et al.*, 2011). Este tipo de membranas son capaces de retener partículas de 1 nm a 10000 nm de tamaño (Tejeda *et al.*, 2011).

En las operaciones de ultrafiltración se suelen utilizar membranas microporosas asimétricas o anisotrópicas, ya que su limpieza es más sencilla que la de las membranas microporosas convencionales. El diámetro de los poros de este tipo de membranas varía entre 0,001μm y 0,1μm (Tejeda *et al.*, 2011).

Otra posible técnica es la electroforesis. La electroforesis es el movimiento de las partículas cargadas contenidas en un medio debido a la influencia de un campo eléctrico. Si bien la electroforesis no está limitada a una escala analítica, no tiene la misma presencia en la industria que otras técnicas como la cromatografía y la ultrafiltración (Tejeda *et al.*, 2011).

La electroforesis tiene un límite comercial por operación simple de 1000 kg por año de producto (Tejeda *et al.*, 2011). Esta operación se realiza a pequeña escala, por lo que la única manera de tener confiabilidad a nivel industrial es utilizando múltiples etapas en paralelo (Tejeda *et al.*, 2011). Sin embargo, el autor la presenta como una de las técnicas más poderosas (rendimiento) de purificación.

Adicionalmente, se tiene la técnica de cromatografía, según Tejeda *et al.* (2011), la cromatografía es una operación que se realiza al final del proceso planteado, ya que corresponde a una de las separaciones más caras y difíciles. Existen diferentes tipos de cromatografía: de intercambio iónico, de filtración por gel, de afinidad, entre otras. Por lo general, se requiere de una secuencia de varias etapas cromatográficas para alcanzar la pureza deseada del producto.

Green y Southard (2019) explica que para lograr obtener la pureza deseada a través de un proceso de cromatografía, se requieren varias etapas de dicha operación, por lo que usualmente se debe contar con múltiples columnas. Esto puede llegar a traducirse en costos de implementación, mantenimiento y operación. Además, esta tecnología se describe como una de las más costosas (Green y Southard, 2019; Tejeda *et al.*, 2011).

Según Tejeda *et al.* (2011) una metodología de gran utilidad para el diseño de procesos es el empleo de heurísticos, sin excepción al diseño de procesos de purificación, ya que estas etapas suelen ser de las más complicadas de lograr de manera eficiente y rentable. Los heurísticos son reglas desarrolladas a partir de diseños anteriores y la experiencia acumulada de síntesis de procesos. Estas reglas se encargan de limitar las alternativas y facilitar el proceso de selección de las etapas y operaciones a realizar para un proceso en específico. En el caso de la bioseparación correspondiente a este trabajo, algunos de los heurísticos que se pueden aplicar son:

- Remover primero la impureza más abundante.

- Remover primero la impureza que sea más fácil.
- Hacer las separaciones más caras y difíciles al final.
- Seleccionar el esquema de bioproceso que permita aprovechar al máximo las diferencias entre las propiedades del producto y los contaminantes.

### 1.3.5 Etapa de acabado

La última etapa de purificación, según (Green y Southard, 2019), depende del grado de pureza que se requiera para el producto. Los productos farmacéuticos requieren elevada pureza, mientras que los productos de tipo *commodity* (productos con alto nivel de comercialización que constituyen una materia prima de otro bien) requieren un nivel inferior de pureza. Para los productos con niveles de pureza relativamente bajos o moderados, la última etapa de purificación suele ser deshidratación. Para productos con altos niveles de pureza, se suelen tener procesos de cromatografía en conjunto con filtraciones y deshidrataciones. Esto también depende del estado en el cual se requiera tener el producto, ya sea en forma sólida, líquida, o bien, en alguna disposición como fibras, láminas, entre otras.

Hasta este punto se han abarcado todas las etapas operativas que componen al bioproceso. Sin embargo, no es suficiente contar con información técnica para sustentar la viabilidad de un proceso productivo, es necesario también tomar en consideración el contexto legal que lo circunda.

## 1.4 Legislación

En esta sección se hace un repaso de reglamentos, leyes y trámites legales que tienen implicación sobre el proceso productivo planteado en este informe. El objetivo es brindarle a las partes interesadas del proyecto, un marco y guía de restricciones, parámetros de diseño, criterios de seguridad y demás factores que se deben cumplir para la puesta en marcha.

Al tratarse de un proceso biotecnológico, es necesario revisar la Ley de Biodiversidad, ya que es la que define las aplicaciones y extensiones de lo que se puede realizar desde la ingeniería genética en microorganismos con fines de comercialización.

#### **1.4.1 Ley de Biodiversidad 7788**

Esta ley tiene el objeto de conservar la biodiversidad, el uso sostenible de los recursos y distribuir en forma justa los beneficios y costos derivados. Dentro de esta Ley, se define bioprospección como la búsqueda sistemática, clasificación e investigación para fines comerciales de nuevas fuentes de compuestos químicos, genes, proteínas, microorganismos y otros productos con valor económico actual o potencial, que se encuentran en la biodiversidad. Además, se define biotecnología como cualquier aplicación tecnológica que use sistemas biológicos, organismos vivos o derivados de ellos para hacer o modificar productos o procesos de un uso específico. La Ley también define manipulación genética como el uso de la ingeniería genética para producir organismos genéticamente modificados, de manera en que los organismos genéticamente modificados son cualquier organismo alterado mediante la inserción deliberada, la delección, el rearrreglo u otra manipulación de ácido desoxirribonucleico, por medio de técnicas de ingeniería genética. Se define el recurso transgénico como el recurso natural biótico que haya sido objeto de manipulaciones por ingeniería genética, que le alteran la constitución genética original.

#### **1.4.2 Reglamento para el Acceso a los Elementos y Recursos Genéticos y Bioquímicos de la Biodiversidad en Condiciones ex situ N°33697**

La Ley de Biodiversidad refiere al Reglamento para el Acceso a los Elementos y Recursos Genéticos y Bioquímicos de la Biodiversidad en Condiciones ex situ N°33697. Entre las definiciones que se establecen en este reglamento, está la de colección ex situ sistematizada, la cual especifica que es cualquier colección sistemática de especímenes, ya sean partes de ellos, tanto vivo como muertos, que sean representativos de plantas, animales microorganismos u otros seres vivos. Por lo tanto, esta definición incluye colecciones de ADN y de microorganismos, por lo que le compete al proyecto en cuestión. El registro de estas colecciones se estipula en el Artículo 6, el cual especifica que los propietarios o responsables (tanto personas físicas como jurídicas, públicas, privadas o sus representantes) deben proceder con el registro en la Oficina Técnica, en donde se debe completar un formulario elaborado y suministrado por dicha institución.

El formulario a completar contiene la siguiente información: nombre e identificación del propietario o representante legal y medio y lugar para notificaciones, tipo de colecciones, ubicación exacta, material de las colecciones, sistema de conservación o permanencia de las accesiones (conjunto de uno o más especímenes mantenidos en una colección), número de accesiones, especímenes o muestras, listados de especies, declaración de la veracidad de la información suministrada, fecha y firma del propietario, responsable o representante legal e información técnica adicional que la Oficina Técnica considere necesario.

Una vez presentada esta información, la Oficina Técnica tiene un plazo de 15 días para indicar si se debe aclarar o completar información y el interesado tendrá un plazo de 10 días para realizar los aportes que solicitó la Oficina Técnica.

El Reglamento también especifica los requisitos generales para solicitar el permiso para bioprospección o aprovechamiento económico. Estos requisitos, establecidos en el artículo 7, señalan que se debe proceder a presentar los documentos que se establecen en los artículos 8 y 9 del Decreto Ejecutivo N°31514-MINAE. Estos artículos describen que lo primero que se debe realizar es registrarse ante la Oficina Técnica, para lo cual se debe presentar un formulario. Este formulario debe contener: nombre, identificación, lugar para notificaciones y documentación legal que lo acredite como representante legal (en caso que aplique). Una vez que esté registrado, deberá completar el formulario que se describe en el artículo 9. Otro de los aspectos que se debe realizar antes de iniciar la implementación, es el Permiso Sanitario de Funcionamiento.

### **1.4.3 Permiso Sanitario de Funcionamiento**

El Permiso Sanitario de Funcionamiento (PSF) corresponde a uno de los primeros requisitos con los que se debe cumplir para la puesta en marcha de la planta. Por lo tanto, tener conocimiento respecto a los requisitos para solicitar y obtener dicho permiso es de primera prioridad. Para esto, se tiene el Reglamento General para Autorizaciones y Permisos Sanitarios de Funcionamiento Otorgados por el Ministerio de Salud. Dicho Reglamento tiene el objetivo de establecer los requisitos y trámites que deben cumplir los establecimientos que desarrollan actividades indus-

triales, comerciales o de servicios.

Los establecimientos se clasifican según su riesgo sanitario y ambiental y con base en dicha clasificación se tienen distintos lineamientos a seguir para poder obtener el PSF. Si el trámite que se debe realizar es el de PSF por primera vez, independientemente del grupo de riesgo al que se pertenezca, se deben cumplir las siguientes condiciones:

1. Resolución Municipal de Ubicación.
2. Planos constructivos del establecimiento incluyendo el sistema de tratamiento de aguas residuales siempre que se trate de una construcción nueva, modificación o ampliación. Los planos deben estar tramitados y revisados conforme el Reglamento para el Trámite de Revisión de los Planos para la Construcción.
3. Viabilidad (Licencia) ambiental, únicamente para aquellos proyectos nuevos y que no se encuentren en operación.
4. Nota de disponibilidad de alcantarillado sanitario del Ente Administrador del Alcantarillado Sanitario (EAAS) correspondiente si el establecimiento vierte aguas residuales directamente a la red del alcantarillado sanitario.
5. Permiso de vertido otorgado por el MINAE (Ministerio de Ambiente y Energía), si corresponde, según Reglamento del Canon Ambiental por Vertidos.
6. Concesión de aprovechamiento del agua otorgada por el MINAE, si corresponde, según el Reglamento de canon por concepto de aprovechamiento de agua.
7. Permiso de instalación y de funcionamiento para calderas otorgado por el Ministerio de Trabajo y Seguridad Social, cuando el establecimiento utilice calderas, según Reglamento de Calderas.
8. Cuando utilicen emisores de radiaciones ionizantes deben contar para su funcionamiento con autorización por parte del Ministerio de Salud (MS) para el uso del emisor, según el Reglamento sobre protección contra las radiaciones ionizantes.

9. Estar inscrito y estar al día con la Caja Costarricense de Seguro Social (CCSS).
10. Regencia autorizada por el colegio profesional respectivo, cuando la Ley General de Salud o alguna ley especial lo requiere según el tipo de establecimiento y la actividad que desarrolle.
11. Autorización y registro del establecimiento extendido por el colegio profesional correspondiente, cuando así lo establezca la Ley General de Salud u otra ley especial.
12. Las pequeñas y micro empresas deberán estar inscritas en el Sistema de Información Empresarial Costarricense (SIEC).

Una vez que se tengan todas las condiciones enumeradas anteriormente, según el Reglamento General para Autorizaciones y Permisos Sanitarios de Funcionamiento Otorgados por el Ministerio de Salud, el responsable de ejecutar el PSF por primera vez debe presentar los siguientes documentos en la Dirección Académica de Responsabilidad Social (DARS) correspondiente o mediante el sistema informático:

1. Formulario de solicitud de PSF.
2. Declaración Jurada.
3. Copia del comprobante de pago de servicios, otorgado por el banco recaudador según lo establece el Reglamento de Registro Sanitario de Establecimientos Regulados por el Ministerio de Salud.
4. Calificación del IMAS (Instituto Mixto de Ayuda Social) como beneficiario, en caso de solicitar exoneración del pago por trámite de PSF.
5. Copia de la cédula de identidad o DIMEX (libre condición) del responsable legal. O bien, certificación registral o notarial de la personería jurídica vigente con no más de un mes de emitida.

Cabe destacar que cuando en una misma edificación se desarrollan distintas actividades de naturaleza distinta, y que consecuentemente se identifican con códigos

Clasificación Industrial Internacional Uniforme (CIIU) diferentes, el permisionario deberá indicar en la solicitud de PSF los códigos correspondientes a cada actividad y se otorgará un único permiso. Por lo general, el PSF es otorgado con una vigencia de 5 años.

En el caso en que el procedimiento a seguir sea el de la modificación de un PSF, se tienen definidos los siguientes escenarios en la sección II del Reglamento General para Autorizaciones y Permisos Sanitarios de Funcionamiento Otorgados por el Ministerio de Salud: modificaciones sustanciales (art. 32), modificaciones no sustanciales por cambios en el proceso (art. 33), modificaciones no sustanciales por cambios de calidad de empresa permisionaria (art. 34), modificaciones no sustanciales por cambio de permisionario (art. 35), modificaciones no sustanciales por cambio de propietario del inmueble (art. 36), pérdida del PSF (art. 37), exclusión del pago del servicio (art. 38) y traslado de actividades (art. 39).

El caso de modificaciones sustanciales (art. 32) aplica cuando se den modificaciones en las condiciones operativas del establecimiento que impliquen una clasificación bajo otro código CIIU o adicione actividades con distinto código CIIU. En este caso, el administrado debe solicitar por escrito a la DARS correspondiente la autorización para realizar dicha modificación y el Ministerio se reserva el derecho de solicitar los requisitos legales y reglamentarios conforme al tipo de modificación y el grupo de riesgo resultante.

Otro reglamento que se debe considerar, es el de Vertido y Reuso de Aguas Residuales, ya que se tendrán corrientes residuales de suero láctico y se debe tener claridad de cómo asegurar una debida disposición del mismo.

#### **1.4.4 Reglamento de Vertido y Reuso de Aguas Residuales N°33601-MINAE-S**

El Reglamento N°33601-MINAE-S establece límites máximos permisibles para parámetros universales de análisis obligatorio de aguas residuales vertidas en alcantarillados sanitarios. Para el caso específico de suero láctico los parámetros que aplican son los que se muestran en el Cuadro **1.1**. Cabe destacar que no hay límites fijados para la lactosa, proteína y minerales, es decir, estos compuestos no apli-

can dentro de los análisis de agua. Sin embargo, se debe tomar en consideración que son compuestos que tienen un efecto directo sobre los límites que se muestran en el Cuadro 1.1, por lo que tienen la capacidad de alterar la cantidad de sólidos suspendidos totales, la demanda bioquímica de oxígeno y la demanda química de oxígeno.

**Cuadro 1.1.** Límites máximos permisibles para parámetros universales de análisis obligatorio para el vertido de aguas residuales según el Reglamento N°33601-MINAE-S.

Parámetro	Límite máximo
Grasas, (g/L)	0,05
Sólidos Suspendidos Totales, <i>SST</i> /(g/L)	0,3
Demanda Bioquímica Oxígeno, <i>DBO</i> /(g/L)	0,3
Demanda Química de Oxígeno, <i>DQO</i> /(g/L)	0,75
Sólidos Sedimentables <i>SS</i> /(mL/L)	5
Sustancias activas al azul de metileno, (mg/L)	5

Otro trámite que se debe ejecutar en la primera etapa es el de la viabilidad ambiental del proyecto. Este trámite se ejecuta mediante el Formulario D1 de la Secretaría Técnica Nacional Ambiental (SETENA).

#### 1.4.5 Permiso de viabilidad ambiental otorgado por la Secretaría Técnica Nacional Ambiental

El formulario D1 es un requisito para obtener los permisos de Viabilidad Ambiental en Costa Rica y se gestiona ante la Secretaría Técnica Nacional Ambiental (SETENA). El objetivo del formulario es servir como instrumento de medición y supervisión durante la primera fase del Estudio de Impacto Ambiental. Los propósitos del documento son demostrar la viabilidad ambiental del proyecto y determinar si se requiere de otros medios de evaluación más detallados para el proyecto (OSD Consultoría Integral, 2020).

El formulario D1 implica un alto compromiso legal, ambiental y de desarrollo nacional. Por lo tanto, debe ser firmado por el desarrollador del proyecto y por un consultor ambiental debidamente inscrito ante la Secretaría Técnica Nacional Ambiental (Secretaría Técnica Nacional Ambiental, 2020).

El formulario está compuesto por varios apartados que pretenden determinar todos los posibles impactos del proyecto sobre los distintos componentes ambientales y los riesgos asociados a cada fase de implementación. Los aspectos que se evalúan son: situación ambiental inicial; consumo y afectación de agua, suelo y energía; impacto en los biotipos de flora y fauna, suelos, agua, aire y seres humanos (Secretaría Técnica Nacional Ambiental, 2020).

El proceso para completar el formulario consiste en una valoración previa del proyecto y del espacio geográfico donde se desarrollará, con el fin de determinar la viabilidad ambiental potencial (VAP). En caso de que se verifique la viabilidad, se determinará el tipo de evaluación de impacto ambiental que deberá efectuarse, en caso de ser necesario (OSD Consultoría Integral, 2020).

#### 1.4.6 Documentación legal y técnica adicional

En el caso de que el desarrollador sea una persona jurídica, deberá presentar una certificación notarial o registral de la personería jurídica, una copia de la cédula jurídica y una copia de la cédula de identidad, pasaporte u otro documento de identidad del representante legal. En el caso de que el desarrollador sea una persona física debe presentar una copia de la cédula de identidad, pasaporte u otro documento de identidad. Adicionalmente, se debe aportar una certificación notarial o registral de la propiedad, una copia del certificado del plano catastrado, una matriz básica de identificación de impactos ambientales acumulativos y, en caso de que el desarrollador no sea el propietario del inmueble, deberá presentar la autorización del propietario (Secretaría Técnica Nacional Ambiental, 2020).

Como documentación técnica complementaria, se deben presentar los siguientes insumos (Secretaría Técnica Nacional Ambiental, 2020):

- Diseño de sitio de la actividad, obra o proyecto.

- Hoja cartográfica con la localización del área del proyecto (AP).
- Estudio de ingeniería básica del terreno del AP, conforme el protocolo que se indica en el Manual de EIA.
- Estudio de geología básica del terreno del AP, conforme al protocolo que se indica en el Manual de EIA.
- Reporte arqueológico rápido del terreno del AP, conforme al protocolo que se indica en el Manual de EIA.
- Certificación sobre el monto de inversión global del proyecto, que incluya el monto de las erogaciones por compra de terrenos, construcción de instalaciones, caminos de acceso, obras de electrificación, agua potable e industrial, compra de maquinaria y equipo y personal calificado y no calificado. Se debe indicar la vida útil del Proyecto y valor de rescate estimado del mismo. No deben incluirse los costos hundidos. El desglose del monto global de la inversión deberá ser presentado por medio de una declaración jurada.
- Registro fotográfico de las condiciones actuales del AP.
- Estudio biológico rápido, conforme al protocolo que se indica en el Manual de EIA.

Toda la documentación legal que ha sido expuesta anteriormente, se debe tomar en consideración para la puesta en marcha del proyecto. Más adelante se expondrá un análisis respecto a las implicaciones que tienen estos reglamentos y formularios específicamente para el proyecto planteado, con el fin de definir acciones necesarias que se deben considerar para que la implementación sea factible.

Adicional a los análisis técnicos, ambientales y legales, está el análisis financiero del proyecto. El objetivo de dicho estudio yace en determinar los escenarios de rentabilidad del proceso productivo propuesto, con el fin de tomar decisiones de inversión que favorezcan la viabilidad económica del proyecto. En la siguiente sección se presentarán conceptos generales y fundamentales de lo que es un análisis financiero o bien la ingeniería económica de un proyecto.

## 1.5 Viabilidad económica

El análisis de rentabilidad se encarga de estudiar los costos, gastos y beneficios del proyecto, con el fin de determinar cuál es el escenario de la inversión. A continuación, se presenta un repaso de los principales puntos de estimación para realizar el análisis financiero del proyecto y lograr determinar si es o no rentable.

### 1.5.1 Inversiones

Las inversiones de un proyecto, según [Peters \*et al.\* \(2003\)](#), pueden estar constituidas por activos fijos, activos intangibles y capital de trabajo. Las inversiones por concepto de activos fijos corresponden a bienes como terreno, infraestructura, equipo de la planta, inmobiliario, entre otros. Cabe destacar que este tipo de activos está sujeto a depreciación, la cual deberá de contemplarse en el flujo neto de efectivo del proyecto. Por otro lado, las inversiones en activos intangibles son todas aquellas que se realizan sobre activos constituidos por los servicios o derechos adquiridos necesarios para la puesta en marcha del proyecto. Los principales rubros que entran dentro de este tipo de inversión son: gastos de organización, patentes y licencias, gastos de puesta en marcha, capacitación, bases de datos y sistemas de información preoperativos ([Sapag y Sapag, 2008](#)). Este tipo de egreso se realiza una única vez al inicio del proyecto.

### 1.5.2 Gastos

Los gastos de organización incluyen todos los desembolsos originados por la dirección y coordinación de las obras de instalación y por el diseño de los sistemas y procedimientos administrativos de gestión y apoyo, como el sistema de información, así como los gastos legales que implique la constitución jurídica de la empresa que se creará para operar el proyecto. Los gastos de puesta en marcha son todos aquellos que deben realizarse al iniciar el funcionamiento de las instalaciones, tanto en la etapa de pruebas preliminares como en las del inicio de la operación, y hasta que alcancen un funcionamiento adecuado. Aunque constituyan un gasto de operación, muchos rubros requerirán un desembolso previo al momento de puesta en marcha

del proyecto, por lo tanto, se diferencia dicho gasto bajo el concepto de gastos pre-operativos (Sapag y Sapag, 2008). Bajo este rubro, se contemplan los gastos por material de oficina, software administrativo, inscripción en la Caja Costarricense de Seguro Social, licencia de operación (municipalidad), permisos de funcionamiento (Ministerio de Salud), inscripción como contribuyentes del Ministerio de Hacienda, capacitaciones, prueba piloto y sueldos previos (Blank y Tarquin, 2002).

Por otro lado, se tienen los gastos operativos. Estos gastos corresponden a los desembolsos que se deben hacer como parte de la operación. Cualquier gasto que esté categorizado bajo este rubro, no está directamente relacionado con la elaboración del producto, sino con la operación de la planta. Bajo esta categoría se contempla: mantenimiento, personal, servicios básicos para personal, costes de laboratorio, supervisión, dirección de la planta, carga de capital, seguros, impuestos y royalties (Peters *et al.*, 2003).

### 1.5.3 Costos

Otro tipo de inversión que se realiza y considera en los proyectos, son los costos. Esta categoría incluye todos los desembolsos que son necesarios y se relacionan directamente con la elaboración del producto, es decir, que se requieren para el debido funcionamiento de la o las líneas de producción. Por lo tanto, los costos operativos están constituidos por: mano de obra, servicios, materias primas y alquiler de la planta (Peters *et al.*, 2003).

### 1.5.4 Beneficios del proyecto

Además de las inversiones, se deben comprender las ganancias o beneficios, que a su vez, se pueden clasificar en diferentes tipos. Entre estos tipos se encuentran los ingresos directos, los cuales son los beneficios generados por la venta del producto.

Además de los ingresos directos, se tienen una serie de beneficios adicionales que deben incluirse, si aplican, en el flujo de caja para determinar la rentabilidad del proyecto de inversión de manera precisa. Algunos de estos son: la venta de los activos que se reemplazarán una vez que cumplan su vida útil y la venta de subproductos o residuos. En ambos casos, el beneficio se da como consecuencia de

un ahorro de costos. De manera similar sucede con los gastos tributarios (Sapag y Sapag, 2008).

### 1.5.5 Indicadores financieros

Estimar costos, gastos y beneficios no es suficiente para completar un análisis financiero, es necesario saber traducirlo a términos de rentabilidad y beneficios para los inversionistas. Para esto, es posible utilizar indicadores financieros, que relacionen los resultados obtenidos con el fin de comprender su efecto sobre el proyecto. Dos indicadores financieros sumamente utilizados y que se aplican en este proyecto son el valor actual neto (VAN) y la tasa interna de retorno (TIR), los cuales se describen a continuación.

El criterio del valor actual neto (VAN) plantea que el proyecto debe aceptarse si el VAN es igual o superior a cero. El VAN es la diferencia entre los ingresos y egresos. En caso de obtener un resultado negativo, se debe interpretar que dicho valor corresponde a lo que falta para que el proyecto rente lo exigido por el inversionista (Blank y Tarquin, 2002; Sapag y Sapag, 2008). El cálculo del VAN se realiza mediante la resta del beneficio neto actualizado, lo cual corresponde al valor actualizado del flujo neto de efectivo, y la inversión inicial.

El criterio de la tasa interna de retorno (TIR) evalúa el proyecto en función de una única tasa de rendimiento por periodo, con la cual la totalidad de los beneficios actualizados son exactamente iguales a los desembolsos. Básicamente, representa la tasa de interés más alta que un inversionista podría pagar sin perder dinero, si todos los fondos para el financiamiento de la inversión se tomaran prestados y el préstamo (principal e interés acumulado) se pagara con las entradas en efectivo de la inversión a medida de que se van produciendo. La TIR se compara con la tasa de descuento de la empresa. Si la TIR es igual o mayor que ésta, el proyecto debe aceptarse, de manera contraria, debe rechazarse (Sapag y Sapag, 2008).

La TIR es la tasa de descuento con la que el valor actual neto (VAN) se iguala a cero o, es decir, es la tasa que iguala la suma del valor actual de los gastos con la suma del valor actual de los ingresos previstos. Por lo tanto, para calcular el valor de la TIR debemos igualar la fórmula de cálculo del VAN a cero.

$$VAN = -I_0 + \sum_{n=1}^N \frac{C_n}{(1+r)^n} = 0 \quad (1)$$

Dónde:

- $I_0$  Inversión inicial, USD.  
 $C_n$  Flujo de caja, USD.  
 $N$  Número total de períodos, adim.  
 $n$  Año en el que se van obteniendo los beneficios de cada período, año.  
 $r$  TIR, adim.

# Diseño del bioproceso

El presente capítulo aborda el diseño técnico del bioproceso. En este apartado se explica tanto la metodología empleada para llevar a cabo dicho diseño como los procesos y análisis que guiaron la definición de las etapas de transformación requeridas para obtener el producto deseado.

## 2.1 Metodología

Para cumplir con el objetivo del capítulo fue necesario llevar a cabo una investigación con el fin de definir cuáles etapas debían considerarse en el diseño. De esta manera, se logró definir una secuencia de procesos que lleva a la obtención de aceites microbianos: acondicionamiento de suero, biorreacción, cosecha celular, disrupción celular y purificación del producto.

A partir de este punto, se llevaron a cabo investigaciones robustas de cada etapa planteada, con el fin de establecer parámetros operativos y la tecnología a utilizar. Lo primero consistió en definir cuál equipo se iba a utilizar en cada una de las etapas, los criterios de selección utilizados para esto fueron: viabilidad del proceso para ser escalado (en términos de costo y consumo energético) y favorecimiento de acumulación de lípidos. Es decir, se seleccionó la tecnología que se determinó como la mejor opción para la escala requerida y la que se presentó como más favorable para el bioproceso de acumulación de triacilgliceroles. Cabe destacar que para tomar estas decisiones, también se contó con el criterio experto de la parte interesada creadora de la bacteria bioingenierizada, ya que es quien más se ha dedicado a estudiar, conocer, caracterizar y estimular el crecimiento de este microorganismo.

Para las etapas de disrupción celular y purificación se procedió a realizar una matriz de decisión, con el objetivo de seleccionar la tecnología más apta. Para esto, se definieron criterios de selección y opciones de tecnología. Seguidamente, se procedió a determinar los pesos ponderados para cada criterio mediante una matriz en L. La calificación se realizó con base en la siguiente distribución de puntos:

- 10: El criterio de la columna es mucho más importante que el criterio de la fila.

- 5: El criterio de la columna es más importante que el criterio de la fila.
- 1: Ambos criterios son igual de importantes.
- 0,2: El criterio de la columna es menos importante que el criterio de la fila.
- 0,1: El criterio de la columna es mucho menos importante que el criterio de la fila.

Sobre esta misma línea, una vez que se tuvieron definidas los equipos a utilizar en cada una de las etapas, se procedió a definir los parámetros operativos de cada equipo (tiempo de retención, pH, temperatura, concentraciones y demás parámetros según aplique para cada etapa del proceso). Nuevamente, estas decisiones se basaron en los criterios de selección anteriormente expuestos. Una vez que se contó con toda la información necesaria, se realizaron balances de masa y de energía, de esta manera se finalizó la definición técnica del proceso y los resultados se plasmaron en un diagrama de flujo del proceso.

Adicionalmente, se realizó una investigación de la legislación que le compete al proceso en cuestión. La investigación consistió en un repaso de reglamentos, leyes y trámites legales que tienen implicación sobre el proceso productivo planteado en este documento. El objetivo fue el de brindarle a las partes interesadas del proyecto, un marco y guía de restricciones, parámetros de diseño, criterios de seguridad y demás factores que se deben cumplir para la puesta en marcha.

## **2.2 Diseño del bioproceso**

En esta sección se documenta el proceso de diseño que se llevó a cabo para definir el bioproceso productivo de aceites microbianos. La secuencia de la información expuesta corresponde a la secuencia de las etapas productivas que se llevan a cabo: evaporación, mezcla, biorreacción, cosecha celular, disrupción celular y purificación del producto. El diseño abarca procesos de decisión para seleccionar la tecnología y definir parámetros operativos y la elaboración de balances de masa y de energía. A continuación, se expone el diseño de la primera etapa del proceso: evaporación.

### 2.2.1 Etapa de evaporación

La etapa de evaporación tiene el objetivo de concentrar el suero láctico para aumentar su contenido de lactosa de un 4,45% m/m a un 15% m/m. Este dato fue definido por la parte interesada creadora de la bacteria bioingenierizada y se ha definido como el ideal para favorecer el crecimiento de la bacteria y la acumulación de lípidos. Para esto, se planteó el uso de un evaporador de película descendente al vacío de simple efecto, ya que el proceso de concentración es factible según las estimaciones realizadas con solo una etapa de evaporación. Cabe destacar que la selección de este equipo para llevar a cabo dicha operación no solo se realizó con base en las necesidades operativas y en las ventajas que ofrece esta tecnología, sino también en las disposiciones indicadas por la empresa, ya que cuentan con esta tecnología y, consecuentemente, con mano de obra capacitada para su operación.

Para poder definir los parámetros operativos, se procedió a realizar una investigación en la literatura de operaciones de evaporación de leche y de suero de leche. De esta manera, se logró determinar el rango de temperaturas de entrada y de salida, la presión del evaporador, el tiempo de operación y el coeficiente global de transferencia de calor. Los principales resultados se muestran en el Cuadro [2.1](#).

En este cuadro podemos ver que la temperatura de entrada al evaporador está entre los 65°C y 82°C. Sin embargo, para el caso del evaporador de simple efecto se tiene un rango más limitado, entre los 65°C y 70°C. Por lo tanto, se recomienda seleccionar una temperatura dentro de este rango, ya que el evaporador a utilizar es de simple efecto. Adicionalmente, se define que la presión dentro del evaporador será de aproximadamente 31,064 kPa, con base en lo definido por [Murillo \(2011\)](#) para la presión de vacío de la primera etapa.

A partir de estos datos, se seleccionó también la temperatura de salida. Los siguientes autores [Jimenez \(2015\)](#), [Castrillon \(2019\)](#) y [Murillo \(2011\)](#) exponen como la temperatura decrece conforme avanza el proceso de evaporación y [Jimenez \(2015\)](#), quien estudió el evaporador de simple efecto, definió la temperatura de salida en 45°C cuando la temperatura de entrada está dentro del rango seleccionado para este proyecto. Por lo tanto, la temperatura de entrada se define en 69°C.

**Cuadro 2.1.** Condiciones operativas de dos procesos de evaporación realizados por (Murillo, 2011) y (Jimenez, 2015) respectivamente.

Parámetro	Valor
<b>Evaporación de leche con evaporador de dos etapas</b>	
Diámetro, $D/(m)$	1
Altura, $A/(m)$	3 a 10
Temperatura primer efecto, $T_1/(^{\circ}C)$	70
Tiempo de operación primer efecto, $t_1/(h)$	1 a 1,5
Presión de vacío primera etapa, $P_1/(kPa)$	31,064
Presión suministro de vapor, $P_v/(kg/cm^2)$	10 a 12
Temperatura segundo efecto, $T_2/(^{\circ}C)$	Entre 52 y 60
Presión de vacío segunda etapa, $P_2/(kPa)$	19,865
Líquido a concentrar	Leche
<b>Concentración de lactosuero con evaporador al vacío de un efecto</b>	
Temp. entrada al evaporador, $T_e/(^{\circ}C)$	Entre 65 y 70
Volumen lactosuero entrada, $V_e/(L)$	350
Temp. de salida del evaporador, $T_s/(^{\circ}C)$	45
Tiempo de retención, $t/(min)$	10
Líquido a concentrar	Lactosuero

El resumen de los parámetros operativos seleccionados se muestran en el cuadro 2.2. El coeficiente global de transferencia de calor (U) se seleccionó con base en lo expuesto por Harriott *et al.* (1991) y Castrillon (2019), quienes determinan que un rango típico para el coeficiente global de evaporadores de tubos verticales largos de circulación natural se encuentra entre los 1000 W/m<sup>2</sup>°C y 2500 W/m<sup>2</sup>°C. Adicionalmente, se realizaron las siguientes suposiciones; el vapor de agua para realizar

la operación estará a una presión de 200 kPa, el vapor entra como vapor saturado y sale como líquido saturado y la densidad, la capacidad calorífica y el calor latente de vaporización del suero láctico es igual al del agua. De esta manera, fue posible estimar los flujos de entrada y de salida y se definió el tiempo de retención promediando los datos expuestos por [Castrillon \(2019\)](#) y por [Jimenez \(2015\)](#).

**Cuadro 2.2.** Condiciones operativas seleccionadas para el proceso de evaporación.

Parámetro	Valor
Temp. entrada al evaporador, $T_e/(\text{°C})$	69
Flujo lactosuero entrada $F_e/(\text{kg/h})$	1 867
Temp. de salida del evaporador, $T_s/(\text{°C})$	82
Presión dentro del evaporador $P/(\text{kPa})$	31,064
Coefficiente global de transferencia $U/(\text{W/m}^2 \text{ °C})$	1 750
Calor latente de evaporación, $L/(\text{kJ/kg})$	2 201,96
Tiempo de retención, $t/(\text{min})$	15

Para definir la operación, se realizaron balances de masa y de energía. Así se definió la cantidad de agua a evaporar, el flujo de la corriente de lactosuero concentrado, la cantidad de vapor de agua y el área de intercambio calórico que se necesita. Partiendo de un flujo de entrada de 1866,96 kg/h de suero (45000 L diarios), se determinó que la corriente de agua a evaporar debe ser de 1318,75 L/h para obtener una corriente de 553,86 kg/h de lactosuero al 15% m/m de lactosa. Además se estimó que se requieren 1332,59 kg/h de vapor de agua y un área de intercambio de 12,13  $m^2$  para un tiempo de retención (tiempo de operación) de 15 minutos.

Seguido de la etapa de evaporación, el suero láctico concentrado se mezcla con nutrientes y se incorpora a los biorreactores. Estas etapas se explican a continuación.

### 2.2.2 Etapa de biorreacción

El suero láctico que proviene de la etapa de acondicionamiento ingresa a dos tanques de almacenamiento (agitados) que corresponden a la alimentación que se le suministra a los biorreactores. A dichos tanques, además del suero, ingresan disoluciones que funcionarán como sales, vitaminas y fuente de nitrógeno. Una vez que se tiene la mezcla de suero con los nutrientes (medio de cultivo), está lista para pasar a la matriz de tres biorreactores en paralelo e iniciar el bioproceso. La necesidad de contar con dos tanques de alimentación, se debe al tipo de configuración que fue seleccionado para los biorreactores y a los requerimientos de nutrientes que tiene el microorganismo. Estos aspectos se explicarán con más detalle en breve.

Las condiciones operacionales en el biorreactor y la tecnología a utilizar se determinaron mediante la información suministrada por la empresa (ver Cuadro 2.3) y el análisis de publicaciones de bioprocesos similares al planteado en este proyecto (ver Cuadro 2.4). El criterio de selección para cada parámetro consistió en el favorecimiento de la acumulación de lípidos. Además, se consideró la viabilidad del proceso para ser escalado, en términos de costo y consumo energético. Las condiciones que fueron definidas son: pH, tiempo de fermentación, temperatura, cantidad de oxígeno disuelto, cantidad de nutrientes y agitación y mezclado.

**Cuadro 2.3.** Condiciones operativas del bioproceso suministradas por la empresa.

Parámetro	Valor
pH	7
Razón C:N	28,6
Temperatura, T/(°C)	30
Tiempo de operación, t/(h)	72
Tamaño del inóculo, ( $OD_{660}$ )	1,2
Cantidad de lactosa consumida, (%)	75

En el Cuadro 2.3 se muestra la información de los parámetros que suministró la empresa. Ellos definen el pH, la razón entre carbono y nitrógeno, la temperatura del

proceso, el tiempo de operación, el tamaño del inóculo y el porcentaje de la cantidad de lactosa que se consume en el proceso. Estos datos son de gran utilidad ya que se han obtenido mediante métodos experimentales con el microorganismo específico que se utilizará en este proyecto.

**Cuadro 2.4.** Condiciones operativas de bioprocesos productivos de lípidos a partir de *Rhodococcus opacus* reportados en la literatura.

Parámetro	Saisriyoot <i>et al.</i> (2019)	Kurosawa <i>et al.</i> (2010)	Kumar <i>et al.</i> (2015)	Voss y Stein- büchel (2001)	Saisriyoot <i>et al.</i> (2016)
Fuente de carbono	Melaza	Glucosa	Glucosa	Melaza y sacarosa	Melaza
pH	7	6,9	7	7	6,8
Temperatura, $T/(^{\circ}\text{C})$	30	30	30	30	30
Concen. C, $Cn_C/(\text{g/L})$	80	120	10	30	20
Concen. N, $Cn_N/(\text{g/L})$	2,14	7,5	0,1	2	1
Razon C:N	45,45	16	-	15	20
Agitación, (rpm)	200	300-1200	250	100-350	100-400
Lípidos biomasa, (%)	18,8	38	48,5	51,9	54,4
Tiempo, $t/(\text{h})$	168	59,9	96	51	96
Tipo de proceso	Batch	Batch	Batch	Fed-batch	Fed-batch

Adicionalmente, se investigaron casos de estudio de bioprocesos productivos con el fin de definir parámetros que no fueron dados por la empresa como: agitación, tipo de proceso (batch, continuo, semi-batch) y porcentaje de lípidos en la biomasa.

El resumen de esta investigación se muestra en el Cuadro [2.4](#).

En dicho resumen se puede ver que el pH, el cual fue dado por la empresa, suele encontrarse en 7 o en 6,8. Sin embargo, la razón C:N es un parámetro que presenta mayor variación, en la investigación bibliográfica se determinó un rango entre 15 C:N y 45,45 C:N, mientras que la empresa indicó que para la bacteria en cuestión el valor ideal es 28,6 C:N. Por otro lado, hay un consenso respecto a la temperatura de operación (30°C). Los parámetros de concentración de carbono y de nitrógeno, se vinculan con el radio entre estos dos compuestos y las investigaciones presentan un rango amplio de posibilidades. Los valores recomendados de agitación se encuentran entre los 100 rpm y los 400 rpm, sin embargo, existe también un estudio que amplía el rango hasta los 1200 rpm. El porcentaje de lípidos en biomasa presenta también un amplio rango de posibilidades desde 18,8% hasta 54,4%. Finalmente, se analiza el tiempo de operación y el tipo de proceso. El tiempo de operación fue dado por la empresa, quienes se han encargado de realizar curvas de crecimiento en laboratorio para definirlo. Los tipos de procesos que se encuentran con mayor frecuencia en la literatura son de tipo batch o alimentado (fed-batch), siendo el semibatch el recomendado cuando se requiere una alta producción de biomasa ([Williams, 2002](#); [Yang y Sha, 2020](#)). Los parámetros seleccionados se discuten a continuación.

A continuación, se explican los rangos y valores seleccionados para las variables operativas que no fueron suministradas por la empresa. La primera decisión tomada fue que el tipo de configuración (o tipo de proceso) será reactor alimentado (fed-batch). La justificación de esta decisión yace en que el bioproceso en cuestión se beneficia cuando hay una alta producción de biomasa, ya que el producto de interés se almacena dentro de ella y como explicaron [Williams \(2002\)](#); [Yang y Sha \(2020\)](#), la configuración fed-batch es la indicada para cumplir con este objetivo. Adicionalmente, [Kurosawa et al. \(2010\)](#) llevaron a cabo una fermentación batch de *R.opacus* PD630 y se concluyó que el bioproceso se puede mejorar acortando la fase de latencia, lo cual se puede llevar a cabo mediante la implementación de un sistema fed-batch. Otro criterio que ayudó a tomar la decisión es que este tipo de configuración, es la más utilizada en la industria ([Yang y Sha, 2020](#)), lo que implica que ya ha sido ampliamente utilizada, estudiada y adaptada para volúmenes y procesos de

dicha escala. Esto es favorecedor, ya que es menos el camino que se debe recorrer para trasladar la tecnología a la magnitud industrial, lo cual se traduce en menos inversión económica.

Para la agitación, se recomienda un rango entre los 100 rpm y los 350 rpm ya que es lo que se especifica para los casos de procesos fed-batch mostrados en el Cuadro 2.4. El porcentaje de lípidos en la biomasa, se definió mediante un consenso de lo que se muestra en la literatura y de lo que ha obtenido la empresa en pruebas de laboratorio. La decisión de definirlo de esta manera se fundamentó sobre varios criterios. El principal, es que el porcentaje de lípidos en biomasa es crítico para la viabilidad del proyecto, ya que diseñar y realizar estimaciones con un valor muy optimista implica un riesgo en caso de que no se logren alcanzar los resultados esperados y de estos dependiera la rentabilidad del proyecto. Por otro lado, tampoco se puede utilizar un valor demasiado modesto, ya que podría afectar el diseño de etapas de procesamiento posterior del producto obtenido. Si se definía una cantidad muy cautelosa de lípidos producidos y se diseñaban las etapas de purificación (las cuales suelen ser costosas) para volúmenes muy inferiores, podría luego significar un encarecimiento de los costos o bien, dar escenarios de rentabilidad desfavorables que no reflejaran la realidad y afectar así las decisiones de inversión. Por lo tanto, se estimó el promedio de lo que se presenta en la literatura (ver Cuadro 2.4) y el resultado obtenido se promedió con el dato reportado por la empresa en sus estudios de laboratorio.

Para definir el oxígeno disuelto en el medio, se analizaron casos de estudio. Kurosawa *et al.* (2010) llevaron a cabo una fermentación batch de *r.opacus* PD630 a 30°C, con un pH controlado con 2M NaOH a  $6,9 \pm 0,1$  y se mantuvo el oxígeno disuelto por encima del 80% de la saturación de oxígeno mediante ajustes del flujo de la mezcla de aire y oxígeno puro y de la velocidad de agitación (entre 300 rpm y 1200 rpm). Los autores reportaron la máxima producción de ácidos grasos con una relación C/N de 17,8 a partir de 240 g/L de glucosa y 13,45 g/L de sulfato de amonio. Sin embargo, el rendimiento máximo (ácidos grasos totales por gramo de glucosa) se obtuvo con una relación C/N de 16 (120 g/L de glucosa y 7,5 g/L de sulfato de amonio). Todo esto, con el oxígeno disuelto por encima del 80%.

Voss y Steinbüchel (2001) realizaron una fermentación en un biorreactor alimentado (fed-batch) de 30 L a 30°C con un rango de saturación de oxígeno en el medio entre 0% y 100% controlado mediante tasas de agitación desde 100 rpm hasta 400 rpm y tasas de aireación entre 0,6 vvm (volumen de aire entre volumen de medio por minuto) y 1,0 vvm y con un pH controlado mediante la adición de HCl o de NaOH según corresponda para mantenerlo entre 7 y 7,3. En este estudio, coinciden las variables seleccionadas anteriormente: el proceso es fed-batch, la temperatura se mantiene a 30°C, la agitación se encuentra dentro del rango definido y el pH también coincide con el seleccionado. Por lo tanto, este rango, es el que se recomienda como parte del diseño del bioproceso.

Una vez que se definieron los parámetros de operación, se procedió a realizar los balances de masa. Para esto, fue necesario contar con la composición de la corriente de suero láctico y del medio de cultivo. Estas dos composiciones fueron dadas por la empresa, quienes previamente se encargaron de caracterizarlas. El resumen de estos datos se muestra en los cuadros 2.5 y 2.6.

**Cuadro 2.5.** Composición del suero láctico a utilizar en el bioproceso antes del acondicionamiento.

Componente	Concentración, Cn/(%m/v)	Concentración, Cn/(%m/m)
Proteína	0,233	0,232
Grasa	0,055	0,0547
Lactosa	4,45	4,43
Sólidos totales	4,97	4,95

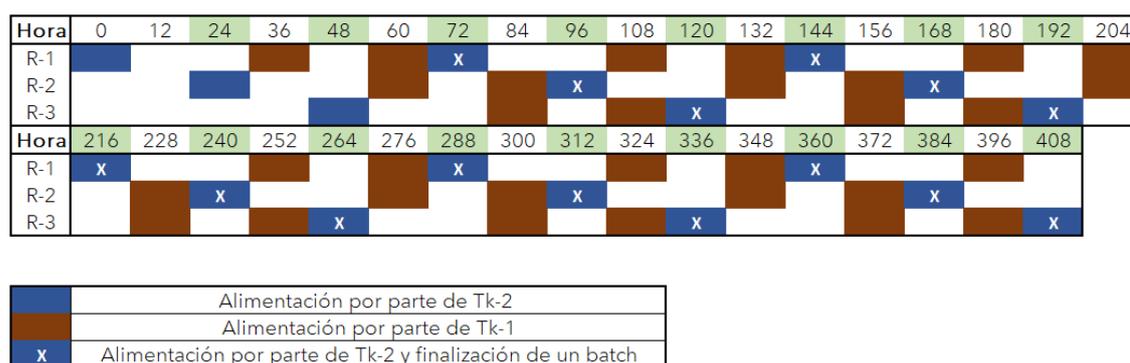
La corriente de suero láctico debe mezclarse con nutrientes para poder llegar a satisfacer las composiciones que se muestran en el Cuadro 2.6. Para esto, se utilizan dos tanques de almacenamiento, los cuales son los que alimentan a los biorreactores. La necesidad de contar con dos tanques se debe a que inicialmente el medio de cultivo debe incluir nitrógeno y posteriormente se debe crear una deficiencia de dicho compuesto. Este dato (la necesidad de crear una deficiencia de nitrógeno en el medio) fue indicado por la empresa y tiene sustento en los estudios analizados, Voss y Steinbüchel (2001) confirman que la biosíntesis y acumulación de TAGs en la bacteria de interés en un proceso fed-batch es mayoritariamente influenciada por

un desequilibrio en los nutrientes y la relación C:N.

**Cuadro 2.6.** Composición del medio de cultivo a utilizar en el bioproceso.

Componente	Cantidad cada 800 mL
Sulfato de magnesio, (g)	0,8
Sulfato de amonio, (g)	4,2
Cloruro de calcio, ( $\mu$ L)	800
Stock A ( $\mu$ L)	80
Trazas ( $\mu$ L)	8

Por lo tanto, se plantea un esquema de alimentación que genere el desequilibrio deseado en el medio. El esquema consiste en 3 alimentaciones durante el período de operación, de las cuales únicamente la primera (hora cero) suministrará nitrógeno al medio. La segunda alimentación se realizará a la hora 36 y la tercera a la hora 60. El régimen de alimentación combinado para los tres biorreactores se muestra en la Figura 2.1 y el tiempo de retención (tiempo de operación) de la matriz de los tres biorreactores en paralelo es de 24 horas.



**Figura 2.1.** Régimen de alimentación al sistema de tres biorreactores (R-1, R-2 y R-3) paralelos por parte de dos tanques de almacenamiento que contienen medio de cultivo. (Elaboración propia).

Para este punto del análisis, ya se contaba con toda la información necesaria para realizar los balances de masa, los cuales se muestran en el Cuadro 2.7. Como

se tienen tres biorreactores en paralelo, se determinaron los flujos másicos para un biorreactor ya que los restantes dos serán iguales.

**Cuadro 2.7.** Balance de masa para un biorreactor durante los 3 días de operación.

Corriente	Volumen, V/(L)	Masa, m/(kg)
<b>Entrada</b>		
Suero	20025	19 939,09
Nutrientes	29,76	65,28
Sulfato de amonio	19,80	35,04
<b>Salida</b>		
Biomasa	-	907,17
Medio de cultivo	-	20039,42

La determinación de los componentes de entrada en el suero láctico (grasas, proteínas, lactosa, sólidos totales) se realizó con base en los datos suministrados por la empresa, los cuales se muestran en el Cuadro 2.5. Los cálculos correspondientes al medio de cultivo se realizaron con base en los datos que se muestran en el Cuadro 2.6. La estimación de la biomasa se realizó suponiendo un 44,7% de lípidos en biomasa. Los lípidos producidos se estimaron suponiendo un rendimiento del 18%, con base en Fei *et al.* (2015) y especificaciones de la empresa, y un consumo de lactosa del 75%, indicado también por la empresa.

De esta manera, se finaliza el diseño de la etapa de biorreacción y se procede al diseño de las etapas de recuperación y purificación.

### 2.2.3 Etapa de recuperación

La etapa de recuperación está compuesta por dos procesos: la cosecha celular y la disrupción celular. La cosecha celular tiene el objetivo de realizar una primera separación con el fin de concentrar en cierta medida el producto. La tecnología recomendada para esto es por lo general centrifugación, ultrafiltración o microfiltración. Sin embargo, la centrifugación presenta una menor tasa de recuperación de células y la ultrafiltración utiliza membranas con menor diámetro de poros que la

microfiltración y requiere presiones de operación un poco más elevadas (la microfiltración requiere menores a 69 kPa (Adisson-Korat y Rizvi, 2004) y la ultrafiltración requiere entre los 100 kPa y 500 kPa (Tejeda *et al.*, 2011)). Estas dos características pueden implicar mayores costos operativos (poros más pequeños con fluidos gruesos pueden ser más susceptibles al colmataje y presiones mayores implican mayor consumo de recursos para generarla) los cuales no es necesario asumirlos en este punto del proceso. Por lo tanto, se decide aplicar una operación de microfiltración.

Debido a que las membranas de microfiltración tienen un tamaño de poro entre 10  $\mu\text{m}$  y 100 nm, las partículas que se retienen del caldo de cultivo son bacterias y sólidos suspendidos (Chacón-Villalobos, 2006). Este porcentaje de retención, o bien, de rechazo, se supuso que corresponde a un 99,5% (suposición basada en fichas técnicas de membranas). Por lo tanto, el retenido estará compuesto por la biomasa (bacterias con lípidos acumulados) y un porcentaje bastante reducido de materia que se encuentre en suspensión en el caldo, esta cantidad se aproximó a un 0,1%. Los balances de masa correspondientes a esta etapa se reflejan en los Cuadros 2.8 y el tiempo de retención para este equipo es de 120 minutos. En dicho Cuadro se hace la debida diferenciación entre las corrientes de permeado y de retenido, siendo la de interés para esta etapa la de retenido, tal como se mencionó anteriormente, ya que es la que porta el compuesto de interés (biomasa).

**Cuadro 2.8.** Balances de masa de la microfiltración empleada para la cosecha celular.

Corriente	Flujo, F/(kg/h)	
	Entrada	Salida
		Permeado      Retenido
Biomasa	37,80	0,189      37,61
Medio de cultivo	834,96	834,14      0,835

La selección de la tecnología para llevar a cabo el proceso de disrupción celular, consistió en una comparación de tres opciones mediante una matriz de selección. Las tres alternativas se escogieron mediante una investigación bibliográfica. El primer paso fue determinar el peso ponderado de cada uno de los criterios de selección

(escalabilidad, costos operacionales, consumo energético y rendimiento).

Cada criterio se priorizó según los intereses de la empresa. Se determinó que la escalabilidad tiene la misma importancia que el rendimiento y que los costos operacionales, ya que si la tecnología no es escalable no tiene utilidad para el proyecto. Se definió que el rendimiento es más importante que los costos operacionales, ya que si los costos son sumamente bajos pero no se tiene un buen rendimiento, la viabilidad del proceso estaría en riesgo. Finalmente, se determinó que el consumo energético es menos importante que el resto de los criterios. El resumen de este análisis se muestra en la Figura [2.2](#).

	Rendimiento	Costos operacionales	Escalabilidad	Consumo energético	Total	Peso ponderado
Rendimiento		0.2	1	5	6.2	0.31
Costos operacionales	0.2		1	5	6.2	0.31
Escalabilidad	1	1		5	7	0.35
Consumo energético	0.2	0.2	0.2		0.6	0.03
Total					20	1

**Figura 2.2.** Comparación de los criterios de selección para determinar su peso ponderado.

El análisis del rendimiento de las tecnologías se hizo con base en las comparaciones presentadas en los artículos de [Gomes et al. \(2020\)](#) y [Geciova et al. \(2002\)](#). [Geciova et al. \(2002\)](#) realizaron una tabla comparativa de métodos mecánicos de disrupción en distintas bacterias, en la cual presentaron el porcentaje de eficiencia de disrupción celular basado en diferentes referencias bibliográficas. De dicha tabla se tomaron los datos reportados para bacterias gram positivas para los tres métodos analizados. La mayor eficiencia reportada fue de 99,9% y corresponde al molino de perlas con cuencas de vidrio, en segundo lugar con un 89% está la técnica de ultrasonidos y en tercer lugar con un 82% de eficiencia está el homogenizador de alta presión. Esto se muestra en la Figura [2.3](#), el mayor peso ponderado para el criterio de rendimiento lo presenta el molino de perlas.

La comparación de costos operacionales se llevó a cabo siguiendo el estudio realizado por [Ustun-Aytekin et al. \(2016\)](#), quienes contrastaron los costos involucrados

Rendimiento	Molino de perlas	Homogenización de alta presión	Ultrasonidos	Total	Peso ponderado
Molino de perlas		10	10	20	0.79
Homogenización de alta presión	0.1		0.2	0.3	0.01
Ultrasonidos	0.1	5		5.1	0.20
Total				25.4	1.00

**Figura 2.3.** Comparación de las opciones de tecnología en términos de rendimiento.

en la operación de un equipo de ultrasonidos y de un homogenizador de alta presión para un flujo de 10 ton/h. Las inversiones estimadas por los autores fueron: capital fijo, costos operacionales por consumo energético y capital de trabajo y se desglosan en el Cuadro 2.9. En dicho cuadro se expone que el capital energético reportado por los autores es considerablemente mayor para el homogenizador a alta presión. Esto significa, según especifican Ustun-Aytekin *et al.* (2016), que a largo plazo, la inversión por concepto de costos operativos será menor para el proceso de ultrasonidos que para el homogenizador a alta presión, debido al capital energético. Por lo tanto, se le asigna al equipo de ultrasonidos una calificación mayor que al homogenizador de alta presión por concepto de costos operacionales.

**Cuadro 2.9.** Comparación de costos operacionales de métodos de disruptión para un flujo de 10 ton/h (Ustun-Aytekin *et al.*, 2016).

Método	Capital fijo, (USD)	Capital energético, (USD/h)	Capital de trabajo, (USD/análisis)	Inversión total, (USD)
Homogenización a alta presión	297,600	40,56	0,003	297,640
Ultrasonidos	312,500	2,06	0,003	312,502

Si bien para el molino de perlas no se cuenta con datos específicos de costos operacionales, según la revisión bibliográfica, el control de los parámetros operativos involucrados es complejo y las perlas deben someterse a un pretratamiento que puede involucrar el uso de reactivos, enfriamiento y lavados (Gomes *et al.*, 2020). Estos aspectos encarecen el proceso y son rubros que los otros dos equipos ni siquiera contemplan. Además, se cuenta con información clara que determina que el con-

sumo energético específico del molino de perlas es considerablemente superior al del homogenizador de alta presión y al del equipo de ultrasonidos (de Boer *et al.*, 2012; Günerken *et al.*, 2015). Por lo tanto, se determina que los costos operacionales del molino de perlas son mayores que los de los otros equipos analizados. El resumen de este análisis se muestra en la Figura 2.4.

Costos operacionales	Molino de perlas	Homogenización de alta presión	Ultrasonidos	Total	Peso ponderado
Molino de perlas		0.2	0.2	0.4	0.03
Homogenización de alta presión	5		0.2	5.2	0.33
Ultrasonidos	5	5		10	0.64
	Total			15.6	1.00

**Figura 2.4.** Comparación de las opciones de tecnología en términos de costos operacionales.

Con respecto a la escalabilidad, se tiene que los tres métodos analizados tienen potencial para ser escalados y trasladados a un nivel industrial. Sin embargo, el homogenizador de alta presión sobresale entre las otras dos opciones, ya que es el más utilizado en la industria y suele ser parte de las operaciones de la industria láctea. Por lo tanto, todos los parámetros involucrados para su escalabilidad ya han sido extensivamente estudiados, definidos y hasta optimizados. Por esto y con base en lo determinado por Balasundaram y Harrison (2006), se asignó la mayor calificación en el rubro de escalabilidad al homogenizador de alta presión.

Adicionalmente, Günerken *et al.* (2015) realizan un análisis de escalabilidad práctica y determinan la superioridad en dicho aspecto del homogenizador de alta presión y del molino de perlas con respecto al equipo de ultrasonidos. Por lo tanto, el segundo mayor puntaje se le asignó al molino de perlas y el menor puntaje se le asignó a la técnica de ultrasonidos, tal como se muestra en la Figura 2.5.

Finalmente, se analizó el consumo energético. Cabe destacar que este aspecto tiene una naturaleza variante, ya que depende de las condiciones de operación que se requieran para cada equipo y los modelos a utilizar. Los autores Ustun-Aytekin *et al.* (2016) esperaban un consumo energético del equipo de ultrasonidos 33 veces mayor que el de homogenización a alta presión, ya que es lo que suele encontrarse en

Escalabilidad	Molino de perlas	Homogenización de alta presión	Ultrasonidos	Total	Peso ponderado
Molino de perlas		0.2	5	5.2	0.25
Homogenización de alta presión	5		10	15	0.73
Ultrasonidos	0.2	0.1		0.3	0.01
	Total			20.5	1.00

**Figura 2.5.** Comparación de las opciones de tecnología en términos de escalabilidad.

comparaciones realizadas por varios autores, como [Save et al. \(1994\)](#). Sin embargo, según el experimento planteado por [Ustun-Aytekin et al. \(2016\)](#) se determinó que en dicho caso el consumo energético del ultrasonidos era 20 veces menor al del homogenizador. El análisis realizado por [Günerken et al. \(2015\)](#) comparte los resultados presentados por [Ustun-Aytekin et al. \(2016\)](#), en los cuales se establece a la técnica de ultrasonidos como el equipo con menor consumo energético, seguido del homogenizador de alta presión. Por consiguiente, como se mencionó con anterioridad y como se muestra en la [Figura 2.6](#), el molino de perlas es el equipo que presenta un mayor consumo energético.

Consumo energético	Molino de perlas	Homogenización de alta presión	Ultrasonidos	Total	Peso ponderado
Molino de perlas		0.2	0.1	0.3	0.01
Homogenización de alta presión	5		0.2	5.2	0.25
Ultrasonidos	10	5		15	0.73
	Total			20.5	1.00

**Figura 2.6.** Comparación de las opciones de tecnología en términos de consumo energético.

Una vez que se analizó cada criterio y se determinaron los pesos ponderados para cada equipo, se procedió a unificar los resultados (ver [Figura 2.7](#)). Para esto, se multiplicó el peso ponderado obtenido de cada equipo y de cada criterio por el peso ponderado asignado a cada criterio. De esta manera, se determinó que la mejor opción corresponde al homogenizador de alta presión, el cual obtuvo una calificación de 0,37 en contraste con el molino de perlas que obtuvo un 0,34 y el ultrasonido con un 0,29. Una ventaja adicional del homogenizador de alta presión que no se

incorporó en el análisis matricial, corresponde a que este es un equipo utilizado con frecuencia en la industria láctea, por lo tanto, a la hora de incorporarse a la línea de operación de producción de aceites microbianos, la empresa no deberá invertir mayores costos en capacitación para su uso y mantenimiento.

	Rendimiento	Costos operacionales	Escalabilidad	Consumo energético	Total
Molino de perlas	0.24	0.01	0.09	0.00	0.34
Homogenización de alta presión	0.00	0.10	0.26	0.01	0.37
Ultrasonidos	0.06	0.20	0.01	0.02	0.29

**Figura 2.7.** Ponderación final de los pesos asignados a cada criterio para cada una de las tecnologías evaluadas.

De esta manera, se procedió a diseñar la etapa de homogeneización. Para esto, se llevó a cabo una investigación en la literatura de procesos similares que utilizaran esta tecnología para promover la disrupción celular de microorganismos. Uno de los casos de estudio analizados fue el de [Drévillon \*et al.\* \(2019\)](#), quien logró determinar que la mayor eficiencia de la disrupción celular de levaduras para recuperar aceites, se obtuvo mediante 20 pases de homogenización a alta presión (150 MPa) manteniendo una temperatura de 298 K. Por otro lado, [Bernaerts \*et al.\* \(2019\)](#), evaluaron el uso de presiones más elevadas (100 MPa - 250 MPa), denominando el sistema como homogenización de ultra alta presión. De esta manera, logró disminuir significativamente la cantidad de veces que se debe pasar la suspensión celular a través de la válvula. Sin embargo, se debe considerar que estos sistemas, si bien presentan altas eficiencias, tienen una alta demanda energética, sobre todo la homogenización de ultra alta presión. Otra desventaja es el calentamiento que se presenta en este tipo de equipo, situación que genera la necesidad de incorporar un sistema de refrigeración ([Bernaerts \*et al.\*, 2019](#); [Tanaka, 2015](#)).

Los principales resultados de esta investigación se resumen en el Cuadro [2.10](#). Para la presión se recomienda un rango entre 100 MPa y 300 MPa, ya que es el que se muestra en la literatura y para poder definirlo más, se debe proceder a realizar pruebas de laboratorio. La temperatura se estableció bajo el criterio que es la más utilizada según los estudios analizados y por ser cercana a la temperatura ambiente,

no requiere mayor acondicionamiento. La temperatura de ajuste entre pases se definió en 5°C ya que es el único dato reportado que se encontró en la literatura. El número de pases se definió entre 4 y 10 ya que es el rango que se muestra para bacterias. Antes de la disrupción celular se recomienda diluir el concentrado con un buffer de lisis, con el fin de minimizar la desnaturalización del producto y maximizar su solubilidad (Green y Southard, 2019; Middelberg, 1995).

**Cuadro 2.10.** Condiciones de operación de proceso productivos de lípidos por *Rhodococcus opacus* encontrados en la literatura.

Referencia	Bernaerts <i>et al.</i> (2019)	Drévilion <i>et al.</i> (2019)	Coccaro <i>et al.</i> (2018)	Spiden <i>et al.</i> (2013)	Wuytack <i>et al.</i> (2002)
Presión de operación, $P/(\text{MPa})$	100	150	200	10 a 150	100 a 300
Temperatura entrada, $T_e/(\text{°C})$	25	25	20	10	25
Tmp. entre pases, $T/(\text{°C})$	No reporta	No reporta	5	No reporta	No reporta
Número de pases	4	20	1 a 10	10	4
Micro-organismo	Microalga	Levadura	Bacteria	Levadura	Bacteria

Estos buffers son de carácter orgánico, utilizan un detergente iónico suave y sales que ayudan a eliminar la acumulación de viscosidad, lo cual simplifica las lisis mecánicas ya que coadyuva a la disrupción y por lo tanto se pueden aplicar fuerzas centrífugas (o cualquier otra fuerza mecánica aplicada) más bajas (Científica Senna, 2022). La proporción de buffer que se debe añadir suele ser entre el 5% y el 10% en peso del flujo total a homogenizar (Green y Southard, 2019). El resumen de los parámetros seleccionados se muestra en el Cuadro 2.11

El caldo de cultivo procedente de la etapa de biorreacción se introducirá al homogenizador impulsado por una bomba de desplazamiento positivo. A la salida del homogenizador, la suspensión se acondicionará a una temperatura de 5°C con un intercambiador de calor y pasará a un tanque de almacenamiento para poder ser

**Cuadro 2.11.** Condiciones operativas seleccionadas para el proceso de disrupción celular mediante un homogenizador a alta presión.

Parámetro	Valor
Presión de operación, $P$ /(MPa)	100 - 300
Temperatura entrada suspensión, $T_e$ /(°C)	25
Temp. de ajuste entre pases, $T_{aj}$ /(°C)	5
Número de pases	4-10

introducida nuevamente al sistema, ya que para lograr una disrupción de aproximadamente el 90% de las células, es necesario llevar a cabo varios pases.

En el Cuadro [2.12](#) se muestra el balance de masa correspondiente a esta unidad operativa. En este caso, la corriente que entra es la misma que la que sale, con la diferencia de que las bacterias sufrieron disrupción durante su paso por el equipo. Cabe destacar que el tiempo que invierte el fluido atravesando el equipo es sumamente reducido, el homogenizador presenta un tiempo de retención de 0,0833 min ([Coccaro et al., 2018](#)).

**Cuadro 2.12.** Flujo de entrada y de salida del homogenizador.

Corriente	Flujo, $F$ /(kg/h)
Biomasa entrante	37,61
Medio de cultivo entrante	0,835
Buffer entrante	3,84
Lípidos salientes	16,81

#### 2.2.4 Etapa de purificación

La etapa de purificación se conceptualizó mediante investigación en la literatura y un análisis de la información recolectada. De esta manera se determinó que es necesario contar con varias operaciones para llegar al resultado esperado de pureza del producto final. La primera operación a utilizar, después del rompimiento celular, corresponde a una microfiltración, los balances de masa de esta etapa se muestran

en el Cuadro 2.13. En dicho cuadro se muestran los flujos de entrada y de salida, los cuales se dividen en dos: permeado y retenido. La corriente principal (la que carga al producto de interés) corresponde al permeado.

**Cuadro 2.13.** Resultados del balance de masa de la microfiltración de la etapa de purificación.

Corriente	Flujo, (kg/h)		
	Entrada	Salida	
		Permeado	Retenido
Biomasa	20,80	0,104	20,69
Lípidos	16,8	16,79	0,0168
Medio de cultivo	0,835	0,834	0,000835
Buffer	3,844	3,84	0,00384

Se seleccionó la microfiltración ya que tiene la capacidad de rechazar bacterias y sólidos suspendidos gracias a su tamaño de poro, mientras que la ósmosis inversa lo que rechaza son iones monovalentes y la ultrafiltración coloides y macromoléculas (Chacón-Villalobos, 2006). En este caso, interesa que se rechacen bacterias y sólidos suspendidos mediante el permeado. El objetivo de esta operación es el de remover los restos celulares que quedan en la suspensión. De igual manera que para la microfiltración planteada para la etapa de cosecha celular, se supuso un porcentaje de retención de 99,5% (porcentaje definido mediante revisión de fichas técnicas de membranas) y un tiempo de operación de 120 minutos.

Seguidamente, se planteó una matriz de decisión para definir la última etapa de purificación, la cual se realizó con base en los siguientes criterios de selección: rendimiento, costos, escalabilidad y pureza. Las opciones consideradas fueron: ultrafiltración, cromatografía y electroforesis, ya que corresponden a las tecnologías más referenciadas para la etapa de purificación en bioprocesos.

Los criterios de selección se ponderaron entre sí con el fin de determinar el peso de cada uno de ellos. Esta ponderación consideró el favorecimiento de los objetivos de la empresa, quienes desean obtener un producto de alta pureza a bajo costo. Por lo tanto, se determinó que la pureza, los costos de implementación y la escalabilidad tienen igual peso ponderado, ya que si el proceso no es escalable o rentable no es factible, además de que se requiere una pureza adecuada para poder colocar el pro-

ducto en el mercado de manera competitiva. El rendimiento es el factor que tiene menor peso. El resumen de estas decisiones se muestra en la Figura 2.8.

	Costos de implementación	Escalabilidad	Pureza	Rendimiento	Total	Peso ponderado definido
Costos de implementación		1	1	5	2	0.30
Escalabilidad	1		1	5	2	0.30
Pureza	1	1		5	2	0.30
Rendimiento	0.2	0.2	0.2		0.6	0.09
Total					6.6	1

**Figura 2.8.** Comparación de los criterios de selección para determinar su peso ponderado.

Los costos considerados fueron los de implementación, los cuales abarcan tanto la inversión como los recursos requeridos para la puesta en marcha. En este criterio, la menor puntuación la obtuvo la cromatografía, ya que los autores [Green y Southard \(2019\)](#) y [Tejeda \*et al.\* \(2011\)](#) especifican que es una tecnología considerablemente costosa. En segundo lugar se estableció la electroforesis, ya que si bien es una operación con mucho potencial, su implementación en la industria aún no es tan fuerte como la de la ultrafiltración. Esta situación hace que se encarezcan los costos de implementación, ya que se deben realizar más estudios para determinar su debido funcionamiento. Este análisis se refleja en la Figura 2.9.

Costos de implementación	Ultrafiltración	Cromatografía	Electroforesis	Total	Peso ponderado definido
Ultrafiltración		5	5	5	0.78
Cromatografía	0.2		1	0.2	0.03
Electroforesis	0.2	1		1.2	0.19
Total				6.4	1.00

**Figura 2.9.** Comparación de las opciones de tecnología en términos de costos de implementación.

Con respecto a la escalabilidad, se definió que tanto la ultrafiltración como la cromatografía tienen gran potencial, ya que ambas operaciones se utilizan ampliamente en la industria. La desventaja en este criterio la presenta la electroforesis,

ya que como se mencionó anteriormente, no tiene una presencia tan preponderante como las otras dos tecnologías (Tejeda *et al.*, 2011). Los criterios ponderados para la escalabilidad de cada tecnología evaluada se muestran en la Figura 2.10, siendo la electroforesis la que presenta el menor peso para este criterio.

Escalabilidad	Ultrafiltración	Cromatografía	Electroforesis	Total	Peso ponderado definido
Ultrafiltración		1	5	6	0.48
Cromatografía	1		5	6	0.48
Electroforesis	0.2	0.2		0.4	0.03
Total				12.4	1.00

**Figura 2.10.** Comparación de las opciones de tecnología en términos de escalabilidad.

En términos de pureza, Green y Southard (2019) las define a las tres como aptas para obtener altos niveles, por lo tanto las tres se determinan igualmente competentes en este aspecto. Sin embargo, con respecto al rendimiento si se tiene una diferencia. Tejeda *et al.* (2011) define a la electroforesis como una operación sumamente poderosa (debido a sus buenos rendimientos), mientras que Green y Southard (2019) establece que para obtener un elevado nivel de pureza mediante cromatografías, es necesario la implementación de varias etapas (columnas). Por lo tanto, en términos de rendimiento, en una escala de más adecuada a menos adecuada, se determinó el siguiente orden: electroforesis, ultrafiltración y cromatografía. Los resultados de este análisis se muestran en la Figura 2.11, donde se muestra que las tres tecnologías tienen el mismo peso ponderado para el criterio de pureza.

Pureza	Ultrafiltración	Cromatografía	Electroforesis	Total	Peso ponderado definido
Ultrafiltración		1	1	2	0.33
Cromatografía	1		1	2	0.33
Electroforesis	1	1		2	0.33
Total				6	1.00

**Figura 2.11.** Comparación de las opciones de tecnología en términos de pureza.

De esta manera se llegó a la conclusión que la tecnología más adecuada para el procesamiento final de purificación corresponde a una ultrafiltración, tal como se muestra en la Figura 2.12. Una vez definido esto se procedió a realizar los balances de

masa correspondientes, los cuales se pueden ver en el Cuadro 2.14. De igual manera que para la microfiltración, las membranas de ultrafiltración son tecnologías de las cuales se puede llegar a obtener porcentajes de retención muy cercanos a un 100%, por lo tanto se realizó la suposición de que se retendrá un 99,5% de los compuestos para los que está diseñada retener, en este caso, macromoléculas y coloides.

	Costos de implementación	Escalabilidad	Pureza	Rendimiento	Total
Ultrafiltración	0.24	0.15	0.10	0.03	0.51
Cromatografía	0.01	0.15	0.10	0.00	0.26
Electroforesis	0.06	0.01	0.10	0.06	0.23

**Figura 2.12.** Ponderación final de los pesos asignados a cada criterio para cada una de las tecnologías evaluadas.

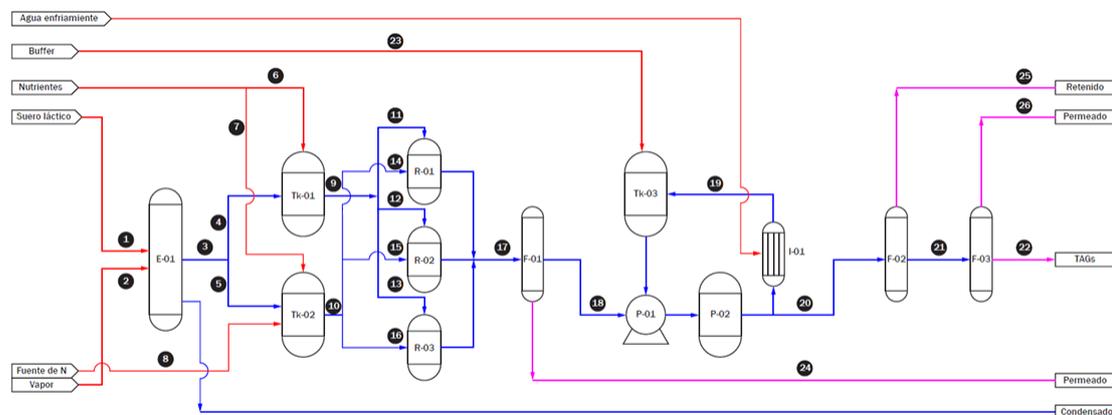
Los lípidos que provienen del permeado de la microfiltración, serán retenidos por la ultrafiltración en conjunto con los restos de biomasa que habían quedado como contaminantes en la suspensión. De esta manera, se llega a obtener un producto con un 99% de pureza, ya que como se puede ver en el Cuadro 2.14, la cantidad de biomasa que queda en la corriente del retenido (que es donde se encuentra el producto de interés) corresponde a un 1% del flujo total. Cabe destacar que este equipo presenta un tiempo de retención de 120 minutos según fichas técnicas.

**Cuadro 2.14.** Resultados del balance de masa de la ultrafiltración de la etapa de purificación.

Corriente	Flujo, (kg/h)		
	Entrada	Salida	
		Permeado	Retenido
Biomasa	0,104	0,00052	0,103
Lípidos	16,79	0,0168	16,77
Medio de cultivo	0,833	0,833	0,00083
Buffer	3,84	3,84	0,00384

Por lo tanto, la planta sugerida para la producción de aceites microbianos está constituida por una primera etapa de concentración de lactosa en el suero mediante evaporación, seguida de una etapa de mezclado del suero láctico concentrado con nutrientes, un proceso de biorreacción mediante un sistema de tres biorreactores

en paralelo, una etapa de cosecha celular mediante microfiltración, una disrupción celular mediante un homogenizador de alta presión y dos etapas de separación y purificación realizadas mediante una microfiltración y una ultrafiltración respectivamente. El diagrama de flujo del proceso se muestra en la Figura 2.13



**Figura 2.13.** Diagrama de flujo del proceso productivo de aceites microbianos.

En este punto del informe ya se completó la totalidad del diseño del bioproceso. Se definieron operaciones que transformarán el suero láctico en aceite microbiano a partir de la bacteria bioingenierizada. Sin embargo, aún no se ha abordado el tema de la aplicación que tendrán los aceites producidos. La razón de esto es que la empresa productora de los aceites está sosteniendo varios procesos de negociación para posibles aplicaciones, siendo una de las más latentes, la transformación de TAGs en biodiesel. Por lo tanto, para enriquecer el diseño del proceso propuesto y poder llevar a cabo un análisis financiero que responda a un segmento de mercado, se presentará a continuación una propuesta de dos etapas adicionales (posterior a la ultrafiltración) para convertir los aceites obtenidos en biodiesel.

### 2.2.5 Elaboración de biodiesel a partir de aceites microbianos

Se plantearon dos etapas adicionales al proceso de producción de aceites microbianos, correspondientes a una etapa de reacción y a una separación por decantación para obtener biodiesel. El planteamiento de estas dos etapas incluye la definición de la tecnología a utilizar y los balances de masa respectivos. Antes de empezar a describir el proceso de definición, se explica qué es el biodiesel y cómo se obtiene.

Según [Reategui y Salas \(2013\)](#), el biodiesel es un combustible producido a partir de aceites vegetales y/o grasas animales y es obtenido mediante un proceso de transesterificación. La transesterificación consiste en la reacción entre triglicéridos con un alcohol de cadena corta (generalmente metanol o etanol) dando como productos los ésteres (biodiesel) y la glicerina. El proceso de transesterificación en forma general se muestra en las ecuaciones [2](#), [3](#) y [4](#). Este proceso se desarrolla en tres etapas: un mol de triglicéridos es convertido consecutivamente en diglicéridos, monoglicéridos y glicerina, y en cada una de estas reacciones se consume un mol de alcohol y se libera un mol de éster.



Por lo tanto, es necesario definir una etapa en donde ocurra la reacción y otra en la que se dé un proceso de separación del éster (biodiesel) de los demás compuestos (diglicéridos, monoglicéridos y glicerina). La etapa de reacción se llevará a cabo en un reactor agitado de configuración batch y el tiempo de reacción será aproximadamente de 60 minutos ([Reategui y Salas, 2013](#)), se definió de esta manera ya que fue el caso de estudio que se encontró con mayor frecuencia en la literatura.

Una vez definida la operación, se procedió a realizar balances de masa, con el fin de determinar cuánto biodiesel se produciría a partir de los aceites microbianos obtenidos. Los resultados principales de los balances de masa se muestran en el Cuadro [2.15](#).

Seguidamente, se debe aplicar un proceso de decantación para separar el biodiesel obtenido de la glicerina y los diglicéridos y monoglicéridos que quedan en la mezcla. Este proceso puede durar aproximadamente 12 horas y se finaliza con dos lavados del producto utilizando agua fría. De esta manera, es posible recuperar la gran mayoría del producto y obtener una pureza del 98% ([Cesare et al., 2010](#)).

**Cuadro 2.15.** Flujos de entrada de TAGs y alcohol etílico y flujo de biodiesel de salida correspondientes al reactor en donde se lleva a cabo el proceso de transesterificación.

Corriente	Flujo, $F / (\text{kg/h})$
TAGs	16,77
Alcohol etílico	46,38
Biodiesel	147,08

### 2.2.6 Variación del proceso productivo planteado

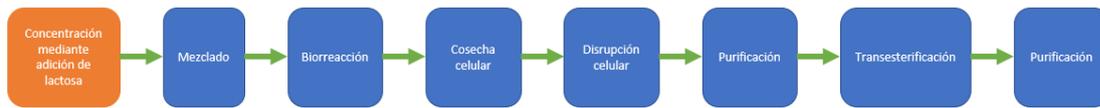
Los resultados obtenidos hasta este punto del proyecto, fueron revisados detalladamente con la empresa. A partir de estas revisiones, surgió la propuesta de evaluar un segundo escenario de producción. El proceso originalmente planteado, el cual se muestra en la Figura 2.14, consiste de una primera etapa de concentración mediante evaporación, una segunda etapa de mezclado del medio de cultivo, una etapa de biorreacción, una etapa de cosecha celular mediante microfiltración, una etapa de disrupción celular mediante un homogenizador de alta presión, dos etapas de purificación de aceites microbianos y la producción de biodiesel (transesterificación seguido de purificación mediante decantación). La propuesta de evaluar un segundo escenario se basó en la poca cantidad de aceites microbianos obtenidos y, consecuentemente, en la poca cantidad de biodiesel obtenido (1 464 704 L/año correspondiente al 20% de la demanda potencial) mediante la primera opción planteada.



**Figura 2.14.** Diagrama representativo de las etapas que componen al proceso productivo de biodiesel a partir de aceites microbianos.

La cantidad de biodiesel producido (1 464 704 L/año) resulta bajo para la empresa ya que actualmente sostiene negociaciones que les permite posicionar al año hasta 7 380 000 L de biodiesel. Por lo tanto, se procedió a realizar un análisis para determinar cómo aumentar la producción y se encontró una oportunidad valiosa mediante la sustitución de la etapa de evaporación por una concentración directa

mediante adición de lactosa. De esta manera, el proceso aumenta su capacidad productiva a 4 935 083 L/año. Esta variación del proceso productivo se diagrama en la Figura 2.15.



**Figura 2.15.** Diagrama representativo de las etapas que componen al proceso productivo de biodiesel a partir de aceites microbianos del Escenario B.

En este escenario alternativo, la producción se plantea de manera escalonada. Es decir, en el primer año se va a producir menos que en el tercer año. Esta decisión se tomó ya que con el Escenario B se va a cubrir el 66% de la demanda del mercado con el cual está negociando la empresa y es una decisión muy arriesgada para los compradores pasar el 66% de su consumo de combustibles a un nuevo proveedor. Por lo tanto, se irá aumentando la producción en un 15% año tras año, de manera en que en el primer año se abarque un 36% del mercado, en el segundo un 51% y finalmente en el tercero un 66%. A continuación se presentará un resumen de los balances de masa realizados para este segundo escenario productivo planteado, el cual a partir de ahora, se denominará Escenario B. En el Cuadro 2.16 se muestra el resumen para el primer año productivo y en el Cuadro 2.17 se muestra el resumen para el tercer año productivo.

En el Cuadro 2.16 se parte de la etapa de concentración, la cual se llevará a cabo mediante adición directa de lactosa al suero láctico residual. Para el primer año productivo, no se aprovechará la totalidad de suero láctico disponible (45 000 L/día), ya que esta cantidad se aprovechará hasta el año 3, en donde se alcanza el máximo de la producción. La cantidad de lactosa añadida corresponde a la necesaria para lograr alcanzar el 15% m/m de concentración requerido.

En la etapa de biorreacción el flujo relevante es el de salida de biomasa, ya que es el que porta el compuesto de interés (lípidos), por lo tanto, en la primera microfiltración (cosecha celular) lo que se pretende hacer es separar la biomasa del resto de componentes. Debido a esto, en el Cuadro 2.16 solo se colocó la información del

**Cuadro 2.16.** Resultados del balance de masa para el escenario alternativo en el año 1 de producción.

Componente	Flujo entrada, (kg/h)	Flujo salida, (kg/h)
<b>Etapa de concentración</b>		
Suero	1348,87	1348,87
Lactosa	60,28	176,11
<b>Etapa de biorreacción</b>		
Suero	674,44	NA
Nutrientes	2,21	NA
Amonio	3,56	NA
Biomasa	NA	30,68
Medio de cultivo	NA	677,83
<b>Microfiltración</b>		
Biomasa	92,06	91,59
Medio de cultivo	2033,49	2,03
<b>Homogenizador</b>		
Biomasa	91,59	50,65
Medio de cultivo	2,03	2,03
Buffer	9,36	9,36
Lípidos	NA	40,94
<b>Microfiltración</b>		
Biomasa	50,65	0,25
Lípidos	40,94	40,90
Medio de cultivo	2,033	2,031
Buffer	9,36	9,35
<b>Ultrafiltración</b>		
Biomasa	0,25	0,25
Lípidos	40,90	40,86
Medio de cultivo	2,03	0,00203
Buffer	9,35	6,86
<b>Producción de biodiesel</b>		
TAGs	40,86	NA
Alcohol etílico	112,95	NA
Biodiesel	NA	358,19

flujo de retenido como flujo de salida, ya que por el permeado saldrá la mayoría del medio de cultivo, lo cual corresponde a una corriente residual.

En la etapa del homogenizador lo que sucede es que se liberan los lípidos de la biomasa, en los balances esto se refleja mediante la subdivisión de la corriente de biomasa de entrada en el flujo de salida en biomasa residual y en lípidos. En

**Cuadro 2.17.** Resultados del balance de masa para el escenario alternativo en el año 3 de producción.

Componente	Flujo entrada, (kg/h)	Flujo salida, (kg/h)
<b>Etapa de concentración</b>		
Suero	1866,96	1866,96
Lactosa	83,44	243,75
<b>Etapa de biorreacción</b>		
Suero	933,48	NA
Nutrientes	3,06	NA
Amonio	4,92	NA
Biomasa	NA	42,47
Medio de cultivo	NA	938,175
<b>Microfiltración</b>		
Biomasa	127,41	126,77
Medio de cultivo	2814,52	2,81
<b>Homogenizador</b>		
Biomasa	126,77	70,11
Medio de cultivo	2,81	2,81
Buffer	12,96	12,96
Lípidos	NA	56,66
<b>Microfiltración</b>		
Biomasa	70,11	0,35
Lípidos	56,67	56,61
Medio de cultivo	2,814	2,811
Buffer	12,95	12,95
<b>Ultrafiltración</b>		
Biomasa	0,35	0,25
Lípidos	56,61	56,55
Medio de cultivo	2,81	0,0028
Buffer	12,94	0,013
<b>Producción de biodiesel</b>		
TAGs	56,55	NA
Alcohol etílico	156,33	NA
Biodiesel	NA	495,76

la segunda microfiltración la corriente relevante (porque contiene el producto de interés) es la del permeado, por lo tanto en este cuadro solo se muestra dicha corriente.

Igualmente, en la ultrafiltración, solo se muestran los datos de la corriente que porta el compuesto de interés (lípidos) que salen por la corriente de retenido. Finalmente, se tienen los componentes relevantes de la producción de biodiesel (obviando

los subproductos diglicéridos, monoglicéridos y glicerina).

Los balances de masa para el año 2 corresponden a un 15% más de lo que se muestra para el año 1 y lo mismo sucede para el año 3 (es un 15% más que lo que se tiene para el año 2).

### **2.2.7 Legislación que le compete al proceso**

Una vez que se ha definido el proceso y se conocen las condiciones operativas, la tecnología que se utilizará, los reactivos y los flujos a procesar, se hará un repaso de lo que se expuso en el fundamento teórico del presente documento.

La primera ley que se abordó en el fundamento teórico fue la Ley de Biodiversidad 7788. Esta ley se relaciona con el Reglamento para el Acceso a los Elementos y Recursos Genéticos y Bioquímicos de la Biodiversidad en Condiciones ex situ. Estos cuerpos legales, se deben considerar para dos puntos muy importantes de lo que será la planta productiva de aceites microbianos: inventario de microorganismos y departamento de investigación y desarrollo. Esta normativa definen de manera detallada los procesos que se deben seguir para obtener permisos para contar con colecciones de microorganismos y, si bien la empresa desarrolladora de la bacteria bioingenierizada ya cuenta con este permiso, si para la nueva planta productiva se va a tener un espacio de almacenamiento de inventario de la bacteria, es necesario contar con este permiso para dicho sitio específico. Adicionalmente, si se va a colocar un laboratorio dentro de la planta en el cual se realicen procesos de investigación y desarrollo para optimizar o mejorar el proceso, se debe especificar también a la hora de solicitar estos permisos.

Por otro lado, el segundo documento analizado, el Permiso Sanitario de Funcionamiento, es un requisito indispensable desde las etapas iniciales de la implementación del proyecto. Por lo tanto, se deben seguir al pie de la letra los lineamientos que se establecen en la sección correspondiente del fundamento teórico.

Seguidamente, está el Reglamento de Vertido y Reúso de Aguas Residuales. Este reglamento debe considerarse para la disposición adecuada de los flujos residuales del caldo de cultivo (suero láctico con nutrientes y restos de biomasa). Es indispensable que a la hora de validar el diseño propuesto en este documento mediante

pruebas piloto en laboratorio, se caractericen las corrientes de salida de las tecnologías de membrana que no se aprovechan en el proceso (las que no contienen al producto de interés) con el fin de determinar si cumplen con los límites permitidos que se muestran en el Cuadro 1.1. Si las corrientes se encuentran dentro de los parámetros permitidos se pueden disponer al sistema de alcantarillado o bien pueden ser aprovechados para la limpieza de los equipos, sin embargo para cumplir satisfactoriamente con este fin, es posible que exista la necesidad de realizar algunas operaciones para acondicionarlo como agua de limpieza y remoción de sólidos suspendidos. Para esto, es necesario evaluar en laboratorio las condiciones de las corrientes residuales de las tecnologías de membranas. Si las corrientes no cumplen con los parámetros establecidos por la ley, será necesario enviarlas a una planta de tratamiento o bien, nuevamente, acondicionarlas para que puedan servir como agua de limpieza. En ambos escenarios existe la posibilidad de tener que plantear algunas etapas para acondicionar estas corrientes residuales para poder disponer de ellas.

A este análisis se añade el Reglamento de Biocombustibles N°35091-MAG-MINAE. Este reglamento establece al Ministerio Nacional de Ambiente y Energía, al Ministerio de Agricultura y Ganadería y a la Refinadora Costarricense de Petróleo, como las entidades responsables de promover, organizar, implementar, asegurar y fiscalizar el desarrollo y seguimiento del Programa Nacional de Biocombustibles. Esto incluye la producción, transporte, almacenamiento, distribución y comercialización mayorista y al detalle de biocombustibles.

En el artículo tres de este reglamento se declara de interés público y afín a los principios de desarrollo sostenible y protección del medio ambiente y de la salud, las actividades relacionadas a la producción de biocombustibles que incluyen investigación, desarrollo, industrialización y transformación de biocombustibles y la sustitución de combustibles fósiles. Asimismo, en el artículo 7 se establece que las personas tanto físicas como jurídicas podrán utilizar el consumo de biocombustibles, como parte de los atributos que las califiquen como contribuyentes a la carbono-neutralidad del país u organización correspondiente. Por lo tanto, queda expuesto a nivel legal el interés y disposición a colaborar con el fin comercial propuesto.

Este reglamento expone también algunas disposiciones que se deben acatar para

temas como el transporte de biocombustibles. Se establece que el transporte de biocombustibles deberá sujetarse a los requisitos exigidos por los Decretos Ejecutivos: 24813-MAE, 31502-MINAE-S, 24715-MOPT-MEIC-S y demás disposiciones establecidas por el ordenamiento jurídico. Sin embargo, en el presente proyecto se está definiendo que la producción de biodiesel se llevará a cabo en el mismo sitio en el que se utilizará, por lo tanto, lo más probable es que no sea necesario transportarlo.

Otro organismo que se debe involucrar en el proceso de investigación y desarrollo en bioenergía es el Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA), ya que actúa como ente rector de la investigación y desarrollo en bioenergía, y por lo tanto deberá integrar y coordinar con los centros académicos, instituciones de investigación, Gobierno Central, instituciones públicas y las iniciativas privadas, los esfuerzos sobre investigación y desarrollo en torno a la bioenergía.

Por lo tanto, antes de iniciar con el proceso de producción y comercialización de biodiesel a partir de los aceites microbianos producidos, es necesario atender las disposiciones indicadas por este reglamento y tocar base con las instituciones involucradas con el fin de velar por la debida legalidad del proyecto.

Otro requisito indispensable es el Estudio de Viabilidad Ambiental que se lleva a cabo a través de la Secretaría Técnica Nacional Ambiental. Este estudio se expondrá a detalle en el capítulo siguiente.



## Viabilidad ambiental y acciones de mitigación

En este capítulo se lleva a cabo un análisis respecto a la viabilidad ambiental del proyecto. En este apartado se presenta la metodología utilizada para ejecutar el análisis mencionado y se proponen acciones de mitigación con base en los resultados obtenidos.

### 3.1 Metodología

El objetivo del presente capítulo fue realizar una evaluación del impacto ambiental (EIA) que implica la puesta en marcha del proyecto y así poder definir acciones requeridas para mitigar dicho impacto. El alcance de la EIA, según los objetivos planteados, es el análisis para el Escenario A. Para cumplir este objetivo, se realizó la evaluación del impacto ambiental mediante el formulario D1 de SETENA, este documento es requisito obligatorio para la ejecución del proyecto. En dicho formulario se analizó el consumo de agua y energía y su posible afectación, además se analizaron los posibles impactos sobre el suelo, el aire y el recurso humano. Una vez completado el formulario, el archivo macro emite resultados que catalogan la gravedad de los impactos analizados, de esta manera se identificaron y definieron las acciones de mitigación necesarias a implementar para que el proceso industrial propuesto sea viable.

Para completar el documento se utilizó el Manual de Instrumentos Técnicos para el Proceso de Evaluación de Impacto Ambiental (Manual de EIA) N° 32712-MINAE así como la información obtenida del estudio técnico.

### 3.2 Evaluación de impacto ambiental

Como se mencionó anteriormente, la evaluación del impacto ambiental se llevó a cabo mediante el formulario D1 de SETENA. Este formulario, el cuál se explica en detalle en el fundamento teórico de este proyecto, está constituido por cinco secciones: consumo afectación, impacto en aire, impacto en suelo, impacto humano y otros riesgos. A continuación se presentarán los análisis y resultados que se llevaron a cabo en cada una de estas secciones. Dichos análisis son los que permitieron asignar

una calificación al proyecto en términos de viabilidad ambiental y definir acciones de mitigación.

### 3.2.1 Consumo afectación

En la sección de consumo y afectación, el primer componente que se evalúa corresponde al agua. El impacto sobre dicho componente se determina según la manera en que se obtiene: acueducto público existente, agua superficial o agua subterránea. En el caso del proyecto planteado, el agua se obtendrá por medio del acueducto público y el consumo estimado se encuentra entre los 50 m<sup>3</sup>/mes y 200 m<sup>3</sup>/mes.

Dicho consumo corresponde al agua a utilizar en la limpieza de la planta, el agua requerida para cubrir los servicios básicos de la mano de obra y la necesaria para producir la cantidad requerida de vapor, estas estimaciones se explicarán con mayor detalle más adelante. En la Figura 3.1 se muestra un resumen de la matriz del formulario correspondiente a esta sección y este componente (agua), los números que se muestran en la columna con colores verdes y amarillos, corresponden a cálculos automáticos que realiza el archivo macro con base en el valor de los casos (columna superior celeste) que corresponda. Como se mencionó anteriormente, para el consumo afectación del agua, se seleccionó el caso 3 ya que es el que corresponde a un consumo de 200 m<sup>3</sup>/mes.

Componente/ Subcomponente		CASO 1	CASO 2	CASO 3	CASO 4	CASO 5	x=
2.1. Agua	2.1.1 Acueducto público existente.	Consumo de agua no supera los 50 m <sup>3</sup> /mes.		Consumo de agua entre 50 y 200 m <sup>3</sup> /mes.		Consumo de agua mayor a los 200 m <sup>3</sup> /mes.	9
	2.1.2 Superficial.		Consumo de agua no supera el 25% del caudal remanente.	Consumo de agua es mayor al 25% y menor al 50% del caudal remanente	Consumo de agua es mayor al 50% y menor al 100% del caudal remanente.	Consumo mayor que el caudal remanente.	0
	2.1.3 Subterránea.		Consumo de agua no supera los 50 m <sup>3</sup> /día.	Consumo de agua entre 50 y 200 m <sup>3</sup> /día.	Consumo de agua mayor a los 200 y menor a 500 m <sup>3</sup> /día.	Consumo de agua mayor a los 500 m <sup>3</sup> /día.	0

**Figura 3.1.** Sección de matriz del Formulario D1 en donde se realiza la evaluación del consumo afectación de agua.

La cantidad de agua para limpieza se estimó calculando primero el volumen de cada equipo. Dicha estimación se realizó considerando tanto el volumen a procesar como el tiempo de retención. La suma total de los volúmenes de cada equipo fue

de 85 m<sup>3</sup>. Sin embargo, la limpieza mensual no incluirá todos los equipos, ya que la totalidad de la planta se destinará siempre a la producción de un mismo producto, y equipos como los tanques de almacenamiento, el homogenizador de alta presión, los biorreactores y el evaporador, no requieren de una limpieza tan regular como los de membranas. La suma de los volúmenes de los equipos de membranas es de 4 m<sup>3</sup>. Dicha cantidad corresponde también al volumen de agua necesario al mes para limpiar los equipos. La limpieza total se realizará con una periodicidad más extensa.

La limpieza CIP (clean in place) se pretende realizar con el agua de permeado, por lo tanto, no significará un consumo adicional. Por otro lado, si se debe considerar un consumo de agua de enfriamiento, el cual se estima que será máximo de 70 m<sup>3</sup> según los requerimientos de la planta.

La cantidad de agua necesaria para cubrir los servicios básicos de higiene y de consumo para la mano de obra se estimó a partir de la información suministrada en la Guía Práctica para el Uso Eficiente del Agua en el Sector Público Costarricense, elaborada por el MINAET y la Embajada Británica. La guía especifica que, en promedio, por el uso del servicio sanitario se consumen 10 L/descarga y por el uso de lavamanos, se consumen cerca de 6 L/min. Suponiendo 6 descargas al día y 10 minutos de uso de lavamanos, se tiene un consumo promedio de 120 L/día por persona.

Adicionalmente, se estimó la cantidad de mano de obra que requerirá la planta. Esta estimación se realizó utilizando los valores típicos de mano de obra requerida según tipo de equipo que se exponen por Peters *et al.* (2003). Los detalles de esta estimación se muestran en el Cuadro 3.1. En dicho cuadro, la primera columna especifica el tipo de equipo, la segunda columna muestra la cantidad de cada uno de esos equipos que se tiene en la planta, la tercer columna muestra la cantidad de mano de obra que se requiere por cada uno de los equipos y la cuarta columna consiste en la multiplicación de la cantidad de equipos por la cantidad de mano de obra requerida, es decir, el total de mano de obra por cada equipo. Para esta estimación, además de considerar la cantidad de personas requeridas por equipo, se consideró la presencia de ingenieros, encargados de limpieza y otras posibles funciones que podrían requerirse (por ejemplo, algún administrador). Estos datos se reflejan en

las últimas tres filas del cuadro antes del total. De esta manera, se obtuvo que la planta tiene un requerimiento de 12 trabajadores. Por lo tanto, se tienen 12 personas con un consumo promedio de 120 L/día, esto representa un total de 3,96 m<sup>3</sup>/mes.

**Cuadro 3.1.** Resumen de la estimación de la mano de obra (MO) requerida para el debido funcionamiento de la planta.

Equipo	Cantidad de equipos	MO por un equipo	MO total
Evaporador	1	0,25	0,25
Biorreactor	3	1	3
Homogenizador	1	0,15	0,15
Microfiltración	2	0,1875	0,375
Ultrafiltración	1	0,1875	0,1875
Tanque de almacenamiento	4	0,35	1,4
Ingenieros	NA	NA	2
Limpieza	NA	NA	2
Otros	NA	NA	2
Total	NA	NA	11,36

Las estimación del agua requerida para producir el vapor se estimó a partir de la cantidad requerida de vapor en la etapa de evaporación. La cantidad de vapor que se utiliza es de 1463,68 kg/h, lo que equivale a 1053,85 m<sup>3</sup>/mes. Sin embargo, en la misma operación se tiene una corriente de salida de 1313,09 kg/h de vapor. La corriente residual de vapor se puede recircular para disminuir la cantidad que se requiere generar a 124,61 m<sup>3</sup>/mes.

Esto significa que se tiene un requerimiento de 3,96 m<sup>3</sup>/mes para consumo, 124,61 m<sup>3</sup>/mes para generar vapor y 70 m<sup>3</sup>/mes para enfriamiento, generando un total de 200 m<sup>3</sup>/mes. Dicha cantidad hacen que el impacto se catalogue como significativo. Por lo tanto, es necesario plantear acciones de mitigación para el componente de consumo de agua.

Seguidamente, se evalúa el componente del suelo, los casos que expone el formulario son: no se produce modificación de uso y se produce modificación de uso. El proyecto planteado no produce modificación, ya que se ubicará en una zona industrial existente. Por lo tanto, el impacto se clasifica como no significativo (ver Figura

**3.2).**

Componente/ Subcomponente		CASO 1		CASO 2	CASO 3	CASO 4	CASO 5	x=
2.2. Suelo	2.2.1 Modificación de uso	No se produce modificación de uso.					Se produce modificación de uso.	3
	2.3. Energía	2.3.1 Autoabasteci- miento.	2.3.1.1 Bio-combustibles.	Se generarán menos de 240 Mwh/año.	Se generarán más de 240 y menos de 2500 Mwh/año.	Se generarán más de 2500 y menos de 5000 Mwh/año.	Se generarán más de 5000 y menos de 10000 Mwh/año.	Se generarán más de 10000 Mwh/año.
		2.3.1.2 Combustibles fósiles.	Se generarán menos de 240 Mwh/año.	Se generarán más de 240 y menos de 500 Mwh/año.	Se generarán más de 500 y menos de 1200 Mwh/año.	Se generarán más de 1200 y menos de 2400 Mwh/año.	Se generarán más de 2400 Mwh/año.	3
2.3.2 Abastecimie- nto externo.		Se consumirán menos de 240 Mwh/año, o 360.000 litros de combustible por año, o 12 TJ/año.		Se consumirán más de 240 y menos de 1200 Mwh/año, o más de 360.000 L y menos de 1800.000 L de combustible por año, o más de 12 o menos de 60 TJ/año.		Se consumirán más de 1200 Mwh/año, o 1.800.000 L de combustible por año, o de 60 TJ/año.		0

**Figura 3.2.** Sección de matriz del Formulario D1 en donde se realiza la evaluación del consumo afectación de suelo y energía.

En la Figura 3.2 se evalúa el componente energía. Los casos que expone la matriz se dividen en dos categorías: autoabastecimiento y abastecimiento externo, dichas categorías a su vez presentan casos según cantidad de combustible consumido, por lo tanto se estimó el requerimiento de combustible. Para cumplir con los requerimientos energéticos del proyecto, se supuso que se va a hacer uso de combustible fósil (abastecimiento externo) tipo búnker. Seguidamente, se procede a estimar la cantidad de combustible a utilizar, el cual corresponde al requerido por la caldera. Para poder estimar dicha proporción, se partió de la cantidad de vapor que se debe generar, con el fin de determinar los HP de la caldera (34,5 HP por cada libra de vapor). Una vez que se cuenta con el dato de los HP (horse power), se determina la correspondencia en galones por hora (0,28 gal por cada HP). Los galones se pasan a BTU y los BTU a Mwh/año. De esta manera, se obtuvo que se requieren 21,377 Mwh/año, lo cual implica un impacto no significativo.

En la sección de consumo y afectación, se evalúan el impacto sobre los biotopos (flora y fauna). Los casos que se plantean son: hay y no hay afectación. Como se mencionó anteriormente, el proyecto se ubicará en una zona industrial, por lo tanto no habrá afectación de fauna. Para el componente flora, la matriz plantea casos con base en la eliminación o no eliminación de árboles, situación que no ocurrirá en este proyecto por los motivos anteriormente expuestos. El resumen de esto se muestra en la Figura 3.3.

Componente/ Subcomponente		CASO 1	CASO 2	CASO 3	CASO 4	CASO 5	x=
2.4. Biotopos	2.4.1 Fauna.	No hay afectación.		Hay afectación.		Hay afectación a especies en peligro, indicadoras o con poblaciones reducidas.	4
	2.4.2 Flora.	No hay afectación.	Si hay afectación de flora pero no eliminación de árboles.	Se eliminan árboles aislados en área sin cobertura boscosa.	Se eliminan parches arbóreos en sitios menores de 2 ha.	El desarrollo de la actividad, obra o proyecto implica la corta de árboles en áreas con cobertura boscosa.	4

**Figura 3.3.** Sección de matriz del Formulario D1 en donde se realiza la evaluación del consumo afectación de biotopos.

### 3.2.2 Impacto en aire, agua, suelo y humano

Seguidamente, se evalúa el impacto en aire, agua, suelo y humano del proyecto. Iniciando con el aire (ver Figura 3.4), se determina el impacto ocasionado por emisiones de tres tipos: fuentes fijas, fuentes móviles y radiaciones ionizantes. Las fuentes fijas corresponden a hornos, calderas y chimeneas.

Componente/ Subcomponente		CASO 1	CASO 2	CASO 3	CASO 4	CASO 5	x=	
3.1. Aire	3.1.1 Emisiones	3.1.1.1 Fuentes fijas.		Hay emisiones controladas.		Hay emisiones no controladas.	0	
		3.1.1.2 Fuentes móviles.			Se utilizan equipos móviles.		0	
		3.1.1.3 Radiaciones ionizantes.					Hay emisiones controladas.	0
	3.1.2 Contribución de las emisiones generales a la contaminación atmosférica con olores, gases y otros efectos.				Las emisiones del proyecto contribuyen a la generación de contaminación atmosférica, pero están controladas.		Las emisiones del proyecto contribuyen a la generación de contaminación atmosférica, pero no están controladas.	6
	3.1.3 Ruidos y vibraciones.				Hay producción de ruido o vibraciones y la producción total es cercana al límite de la regulación vigente, se puede confinar.		Hay producción de ruido o vibraciones y la producción total es cercana al límite de la norma, no es confinable.	9

**Figura 3.4.** Sección de matriz del Formulario D1 en donde se realiza la evaluación del impacto en aire.

En este caso, el vapor a utilizar se obtendrá de la red de vapor existente de la planta dentro de la cual se ubicará el proyecto, por lo tanto, no se contemplan este tipo de emisiones. Las fuentes móviles corresponden a la flota vehicular y cualquier tipo de transporte que se requiera. Sin embargo, si dicho transporte es contratado, no se contemplan las emisiones. Por lo tanto, este punto tampoco se considera.

Finalmente, se tiene que el proceso tampoco genera radiaciones ionizantes. Aún así, el proyecto si generará emisiones, ruidos y vibraciones controladas durante la construcción, ya que la evaluación de impacto ambiental contempla también la puesta en marcha del proyecto. Esto genera un impacto significativo.

El impacto sobre el agua se determina según la generación de efluentes y afluentes, como se muestra en la Figura 3.5. En el proyecto planteado, no se generarán aguas de escorrentía y las aguas residuales ordinarias generadas se gestionarán mediante una planta de tratamiento o alcantarillado sanitario. Por lo tanto, no hay impacto significativo asociado. En esta sección se evalúa además la cantidad de aguas residuales de tipo especial generadas. El bioproceso se encarga de acondicionar el suero láctico de manera en que sus parámetros estén dentro de los límites permisibles para el vertido de aguas, por lo tanto no hay generación de aguas residuales tipo especial.

Componente/ Subcomponente		CASO 1	CASO 2	CASO 3	CASO 4	CASO 5	x=
3.2. Agua	3.2.1 Aguas de escorrentía superficial.	El aumento del caudal superficial neto es menor a un 10% referido al área de desfogue.	El aumento del caudal superficial neto es mayor al 10% y menor al 25% referido al área de desfogue.	El aumento del caudal superficial neto es mayor al 25% y menor al 50% referido al área de desfogue.	El aumento del caudal superficial neto es mayor al 50% y menor al 75% referido al área de desfogue.	El aumento del caudal superficial neto es mayor al 75% referido al área de desfogue.	0
	3.2.2 Aguas residuales ordinarias.	Producción de aguas residuales ordinarias y se utilizará una planta de tratamiento o alcantarillado sanitario con planta de tratamiento.	Producción de aguas residuales ordinarias y se dispondrán en alcantarillado sanitario con un sistema de tratamiento de probada eficiencia.		Producción de aguas residuales ordinarias y se dispondrán en un tanque séptico o similar.	Producción de aguas residuales ordinarias y dispondrán en alcantarillado sanitario sin planta de tratamiento.	4
	3.2.3 Aguas residuales de tipo especial.	Producción de aguas residuales de tipo especial en cantidad inferior a 50 m <sup>3</sup> /mes.		Producción de aguas residuales de tipo especial en cantidad superior a 50 y menor a 200 m <sup>3</sup> /mes.		Producción de aguas residuales de tipo especial en cantidad superior a 200 m <sup>3</sup> /mes.	4

**Figura 3.5.** Sección de matriz del Formulario D1 en donde se realiza la evaluación del impacto en agua.

### 3.2.3 Impacto en suelo

El impacto en suelo se determina mediante la evaluación de la disposición de los residuos sólidos, los residuos peligrosos, los movimientos de tierra, la pendiente del proyecto, la densidad de población y la densidad de construcción. Con respecto a los residuos sólidos, se determinan tres subclasificaciones: ordinarios, especiales y escombros. Estos tres residuos se van a clasificar para recuperarlos, reciclarlos, reutilizarlos y disponerlos finalmente en un relleno sanitario o el lugar debidamente autorizado por la ley. Por lo tanto, el impacto ambiental que presentan corresponde

al menor posible según el formulario, aún así, se clasifica como un impacto significativo, como se muestra en la Figura 3.6.

Componente/ Subcomponente		CASO 1	CASO 2	CASO 3	CASO 4	CASO 5	x=
3.3.1 Residuos sólidos	3.3.1.1 Ordinarios.		Se clasifica para recuperar, reutilizar, reciclar y su disposición final en un relleno sanitario propio o lugar debidamente autorizado por autoridad competente.	Se clasifica para recuperar, reutilizar, reciclar y disposición final en un relleno sanitario o lugar debidamente autorizado por autoridad competente.	Se dispone finalmente en un relleno sanitario o lugar debidamente autorizado con clasificación por autoridad competente.	Disposición final en relleno sanitario o lugar debidamente autorizado por autoridad competente.	6
	3.3.1.2 Especiales.		Se clasifica para recuperar, reutilizar, reciclar y disposición final en un relleno sanitario propio o lugar debidamente autorizado por autoridad competente.	Se clasifica para recuperar, reutilizar, reciclar y disposición final en un relleno sanitario especializado o lugar debidamente autorizado por autoridad competente.	Se dispone finalmente en un relleno sanitario o lugar debidamente autorizado con clasificación.	Disposición final en relleno sanitario o lugar debidamente autorizado por autoridad competente.	6
	3.3.1.3 Escombros.		Se dispone finalmente en una escombrera dentro del AP o a un tercero sin fines comerciales, de conformidad con el reglamento de construcciones y el reglamento para el control nacional de fraccionamiento y urbanizaciones.		Se dispone finalmente en un relleno sanitario con clasificación o una escombrera debidamente autorizada fuera del AP.		6

**Figura 3.6.** Sección de matriz del Formulario D1 en donde se realiza la evaluación del impacto en suelo por residuos sólidos.

Los residuos peligrosos se subdividen a su vez en tres tipos: químicos, radioactivos y biológicos. El Reglamento General para la Clasificación y Manejo de Residuos Peligrosos N° 37788-S-MINAE define los residuos peligrosos como aquellos que debido a su reactividad química, características tóxicas, corrosivas, explosivas, radioactivas, biológicas, bioinfecciosas, inflamables, ecotóxicas o de persistencia ambiental puedan causar daños a la salud o al ambiente.

En el Anexo I de dicho reglamento se enlista la totalidad de residuos que se clasifican como peligrosos, este anexo fue revisado y se determinó que en este proyecto no se van a generar residuos de esta categorización, con la excepción de lo que se denomina como residuos resultantes de las operaciones de eliminación de desechos industriales, ya que inevitablemente por tratarse de una planta industrial productora de aceites microbianos y biodiesel, se generarán y se deberán eliminar residuos que resulten de su operación.

Este tipo de residuo biológico entra en el Caso 2 mostrado en la matriz de la Figura 3.7, lo cual significa que se asegurará su debida disposición en donde corresponda, ya sea en un relleno sanitario especializado o algún lugar debidamente autorizado por la autoridad competente, ya sea un centro de reciclaje, una planta de tratamiento, entre otros.

Componente/ Subcomponente		CASO 1	CASO 2	CASO 3	CASO 4	CASO 5	$\chi=$
3.3.2 Residuos peligrosos	3.3.2.1 Químicos.		Se clasifica in situ para recuperar, reutilizar, se trata y la disposición final se da en un relleno propio especializado o lugar debidamente autorizado por autoridad competente.	Se clasifica in situ para recuperar, reutilizar, se trata y la disposición final se da en un relleno especializado o lugar debidamente autorizado (sin tratamiento previo).	Se clasifica in situ para recuperar, reutilizar y la disposición final se da en un relleno especializado, o lugar debidamente autorizado para su tratamiento y disposición final.	Se clasifica in situ disposición final en un relleno sanitario o lugar debidamente autorizado para su tratamiento y disposición final.	0
	3.3.2.2 Radiactivos.		Se clasifica para recuperar, reutilizar, se trata y disposición final en un relleno propio especializado o lugar debidamente autorizado por autoridad competente.	Se clasifica para recuperar, reutilizar, se trata y disposición final en un relleno especializado o lugar debidamente autorizado por autoridad competente.	Se clasifica para recuperar, reutilizar y disposición en un relleno sanitario o lugar debidamente autorizado para su tratamiento y disposición final.	Se clasifica disposición final en un relleno sanitario o lugar debidamente autorizado, para su tratamiento y disposición final.	0
	3.3.2.3 Biológicos		Se clasifica, se trata y disposición final en un relleno sanitario especializado o lugar debidamente autorizado por autoridad competente.	Se clasifica, se trata y disposición final en un relleno especializado o lugar debidamente autorizado por autoridad competente.	Disposición en un relleno especializado o lugar debidamente autorizado, para su tratamiento y disposición final.	Se clasifica disposición final en un relleno sanitario o lugar debidamente autorizado, para su tratamiento y disposición final.	8

**Figura 3.7.** Sección de matriz del Formulario D1 en donde se realiza la evaluación del impacto en suelo por residuos peligrosos.

Los demás factores analizados para determinar el impacto en suelo (movimiento de tierra, pendiente, densidad de población y densidad de construcción) no presentan impacto ya que son acciones que no se llevarán a cabo.

### 3.2.4 Impacto humano

Otro componente sobre el cual se evalúa el impacto ambiental es el humano. Este impacto se determina mediante el análisis de tres factores (ver Figura 3.8): social, cultural y vialidad. El factor social se evalúa de dos maneras: analizando la generación de empleo y analizando la movilización, reubicación o traslado de personas. Se estima que para el proyecto planteado se generarán menos de 25 plazas nuevas, por lo que el impacto se considera significativo. Sin embargo, no se presentará movilización, reubicación o traslado de personas, por lo tanto el impacto sobre este factor no es significativo.

Seguidamente, se evalúa el factor cultural (ver Figura 3.8), sobre el cual se determina que no hay impacto significativo ya que la infraestructura se desarrolla en zona urbana y el proyecto no afecta el patrimonio cultural puesto a que, como se mencionó anteriormente, el proyecto se ubicará en una zona industrial. Por último, se establece que para el factor de vialidad también se tiene impacto no significativo, ya que no se genera tráfico nuevo en la zona en donde estará la nueva planta productiva.

Componente/ Subcomponente		CASO 1	CASO 2	CASO 3	CASO 4	CASO 5	x=		
3.4 Humano	3.4.1 Social	3.4.1.1 Generación de empleo.	Genera más de 100 plazas nuevas.	Genera entre 50 a 100 plazas nuevas.	Genera entre 25 a 50 plazas nuevas.	Genera menos de 25 plazas nuevas.	No genera nuevas plazas.	8	
		3.4.1.2 Movilización, reubicación, traslado de personas que habitan en el AP.	No se produce movilización, reubicación, traslado, etc. de personas que habitan en el AP, por efecto del proyecto.					Se produce movilización, reubicación, traslado, etc. de personas que habitan en el AP, por efecto del proyecto.	3
	3.4.2 Cultural	3.4.2.1 Paisaje.	Se desarrolla infraestructura en una zona urbana o rural y utiliza una infraestructura preexistente.	Se desarrolla infraestructura en una zona urbana y no provoca un desequilibrio en la textura del paisaje existente.	Se desarrolla infraestructura en una zona rural y no provoca un desequilibrio en la textura del paisaje existente.	Se desarrolla infraestructura en una zona urbana y provoca un desequilibrio en la textura del paisaje existente.	Se desarrolla infraestructura en una zona rural y provoca un desequilibrio en la textura del paisaje existente.		3
		3.4.2.2 Patrimonio.	El proyecto no afecta el patrimonio científico, arquitectónico o arqueológico.	El proyecto contempla la conservación y el mejoramiento del patrimonio científico, arquitectónico o arqueológico existente en el AP.	El proyecto contempla la conservación del patrimonio científico, arquitectónico o arqueológico existente en el AP.	El proyecto afecta de forma parcial y con autorización el patrimonio científico, arquitectónico o arqueológico existente en el AP.	El proyecto afecta de forma total y con autorización el patrimonio científico, arquitectónico o arqueológico existente en el AP.		4
	3.4.3 Vialidad		Genera tráfico nuevo en una proporción inferior al 25% de la capacidad vial instalada.		Genera tráfico nuevo en una proporción mayor al 25% y menor al 50% de la capacidad vial instalada.		Genera tráfico nuevo en una proporción mayor al 50% de la capacidad vial instalada.		0

**Figura 3.8.** Sección de matriz del Formulario D1 en donde se realiza la evaluación del impacto humano.

### 3.2.5 Otros riesgos

La última sección de evaluación del formulario estudia otros riesgos que pueda presentar el proyecto, específicamente: manejo de combustible fósil, manejo de agroquímicos, manejo de sustancias peligrosas, manejo de material radioactivo y manejo de bio riesgos. Para el proyecto planteado, solo aplica el manejo de combustibles fósiles, ya que se consume una cantidad mayor a 5000 L y menor a 50 000 L al mes. Esto se muestra en la Figura [3.9](#)

Componente/ Subcomponente		CASO 1	CASO 2	CASO 3	CASO 4	CASO 5	x=
4. Otros riesgos	4.1 Manejo de combustible fósil.	No consume, maneja o almacena.	Consumo, maneja o almacena una cantidad menor a 5.000 litros al mes.	Consumo, maneja o almacena una cantidad mayor a 5.000 y menor a 50.000 litros al mes.	Consumo, maneja o almacena una cantidad mayor a 50.000 y menor a 500.000 litros al mes.	Consumo, maneja o almacena una cantidad mayor a 500.000 litros al mes.	8
	4.2 Manejo de agroquímicos.	No consume, maneja o almacena.				Se usan, almacenan y consumen agroquímicos (fertilizantes, herbicidas, plaguicidas, insecticidas, etc.).	0
	4.3 Manejo de Sustancias peligrosas	No hay consumo, manejo o almacenamiento de sustancias peligrosas.				Si hay consumo, manejo o almacenamiento de sustancias peligrosas.	0
	4.4 Manejo de material radiactivo.	No hay consumo, manejo o almacenamiento de material radiactivo.				Si hay consumo, manejo o almacenamiento de material radiactivo.	0
	4.5 Manejo de Bio riesgos.	No hay consumo, manejo o almacenamiento de material biológico.				Si hay consumo, manejo o almacenamiento de material biológico.	0

**Figura 3.9.** Sección de matriz del Formulario D1 en donde se realiza la evaluación de lo que se denomina como otros riesgos.

Después de realizar el análisis detallado y completar la evaluación, se llegó a obtener una calificación final de la significancia de impacto ambiental de 119. Este valor, al ser menor a los 300 puntos, implica que para el proceso evaluado basta con

presentar una Declaración Jurada de Compromisos Ambientales. Esta declaración consiste, según el Artículo 3 del Decreto 34536, en una manifestación bajo juramento, otorgada en escritura pública ante notario público, en la que el desarrollador del proyecto se compromete a cumplir íntegramente con los términos y condiciones estipuladas en su Plan de Gestión Ambiental, o bien los lineamientos definidos mediante el proceso de Evaluación de Impacto Ambiental (Formulario D1).

El presente proyecto propone acciones para mitigar los efectos más significativos que se detectaron mediante la evaluación.

### **3.3 Acciones de mitigación**

Los puntos del proceso que se demarcaron con un impacto medio o significativo (casilla amarilla) son:

- El consumo de agua supera los 50 m<sup>3</sup> al mes.
- Contribución de las emisiones a la contaminación atmosférica.
- Se producen ruidos y vibraciones en la etapa constructiva.
- Se generan y clasifican residuos sólidos.
- Se generan menos de 25 plazas laborales.
- Se consumen, manejan o almacenan combustibles fósiles.

Por lo tanto, se plantean acciones de mitigación orientadas específicamente a colaborar con la reducción de la significancia del impacto ambiental asociado a los puntos del proceso listados anteriormente. El primer punto, correspondiente al consumo de agua, depende mayoritariamente del agua necesaria para alimentar el vapor requerido para la etapa de evaporación y pasteurización. Por lo tanto, se plantea la opción de invertir recursos en un análisis de la red de intercambio calórico que se tiene en la totalidad de la planta productiva (la planta de producción de aceites se ubicará en el mismo sitio en el que se ubica la planta que produce el suero láctico residual). Un análisis de este tipo es de suma utilidad para optimizar los

recursos e inversiones energéticas, lo que puede conllevar a ahorros significativos con beneficios económicos y ambientales.

Como segunda opción para mitigar el consumo de agua, se propone sustituir el uso del evaporador por una adición de lactosa. Este cambio evitaría el uso de vapor, por lo que también evitaría el uso de los recursos que se requieren para generarlo, como combustibles fósiles.

El segundo rubro para el cual plantean acciones de mitigación corresponde a la contribución de las emisiones generales a la contaminación atmosférica. Si bien esta es una situación sumamente difícil de evitar por la naturaleza de los procesos productivos y los procesos en general, hay posibilidades para compensar dichas contribuciones. Las opciones utilizadas con mayor frecuencia para la compensación de emisiones, consisten en promover la fijación de dióxido de carbono mediante la compra y mantenimiento de áreas boscosas o algún otro tipo de sumidero de carbono.

Con respecto a la producción de ruidos y vibraciones en la etapa constructiva del proyecto, las acciones de mitigación que se plantean consisten básicamente en el uso de equipos adecuados y controladores de ruido. Además, los equipos y procedimientos más ruidosos se realizarán en horas en donde no perjudique a las comunidades circundantes.

Otro de los aspectos a mitigar consiste en la generación y clasificación de residuos sólidos. Para esto, el proyecto puede incorporar prácticas orientadas a la debida gestión de los residuos. Algunas de estas prácticas son: evitar el uso de materiales no reciclables o de difícil tratamiento posterior, reducir la cantidad de residuos generados, incentivar una rigurosa recolección de residuos, asegurar el tratamiento y la correcta disposición e identificar los residuos que se generan y los peligros y especificaciones respecto a su disposición, así como proponer e implementar un plan de gestión de residuos acorde a la normativa.

La poca cantidad de plazas laborales generadas es otro aspecto que presenta una significancia de impacto ambiental medio o significativo. Para compensar esta situación, se pueden plantear proyectos de acción social y estimular un ambiente de armonía con las comunidades circundantes a la planta productiva.

El consumo de combustibles fósiles no se puede evitar a un 100%, sin embargo,

debido a que se planteó la producción de biodiesel a partir de los aceites microbianos, se puede incentivar el uso de este combustible en la operación de la planta productiva. De esta manera, la naturaleza del proyecto en sí consistiría en la reducción del uso de combustibles fósiles. Por lo tanto, se propone plantear un plan y esquema de crecimiento en donde se planifique aumentar el porcentaje de utilización de biodiesel conforme pasan los años. Otra alternativa para enfrentar esta situación, corresponde a la misma planteada para reducir el consumo de agua. Sustituir la etapa de evaporación por una concentración mediante adición de lactosa, lo cual eliminaría el uso de vapor generado en caldera.



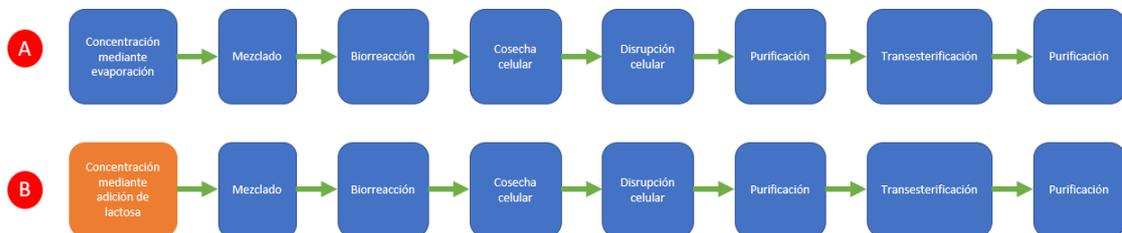
# Rentabilidad y análisis financiero

En este capítulo se realiza un análisis financiero para cada uno de los escenarios planteados, considerando la transformación de los aceites microbianos en biodiesel. En este apartado se estiman los costos, inversiones, gastos operativos y demás criterios que afectan el flujo neto de efectivo y la rentabilidad del proyecto.

## 4.1 Metodología

Uno de los objetivos por cumplir fue el de determinar la rentabilidad del proceso productivo. Por lo tanto, se procedió a realizar un análisis financiero para la producción de biodiesel a partir de aceites microbianos. En dicho análisis se estimó el tamaño del mercado, la demanda potencial, se realizó una fijación de precios e ingresos, se estimaron gastos preoperativos, gastos operativos, costos, capital de trabajo, punto de equilibrio, se efectuó el flujo neto de efectivo y se determinaron los indicadores financieros VAN y TIR. Adicionalmente, se analizaron dos escenarios diferentes y se realizó un análisis de sensibilidad mediante el método Montecarlo utilizando el Software @Risk de Palisade.

Los dos escenarios evaluados son: proceso de producción de biodiesel iniciando con evaporación de suero láctico (Escenario A) y proceso de producción de biodiesel iniciando con adición directa de lactosa (Escenario B). Esto se muestra en la Figura 4.1. La decisión de evaluar este escenario surgió como respuesta a revisiones realizadas con la empresa de los resultados obtenidos del Escenario A.



**Figura 4.1.** Diagrama representativo de las etapas involucradas en los dos escenarios evaluados en el análisis financiero. (Elaboración propia).

La estimación del tamaño de mercado se realizó con datos otorgados por la empresa. El proceso productivo de aceites planteado en este proyecto aprovecha un

residuo de la industria láctea para producir los aceites microbianos y se planteó la producción de biodiesel a partir de estos aceites. La parte interesada que aporta el residuo de suero láctico, es también la parte interesada en la compra del biodiesel. Por lo tanto, el tamaño de mercado para el análisis financiero de este proyecto corresponde a la cantidad requerida de biodiesel del comprador. Esta cifra corresponde también a la demanda potencial. Cabe destacar que el proyecto se analiza de esta manera debido a negociaciones entre las partes (creadores de bacteria y compradores de biodiesel).

La fijación de precios e ingresos se realizó con base en lo estipulado por RECOPE para la venta de biodiesel y se consideró la producción que se obtendrá a partir de cada escenario en los primeros 3 años. Para estimar los gastos preoperativos, gastos operativos y costos primero se identificaron todos los rubros que se debían considerar en cada uno de los costos y gastos mencionados. Una vez que se tenía la lista completa, se procedió a definir los montos monetarios que le correspondía a cada rubro. Esto se realizó mediante investigación bibliográfica, consultas en páginas de proveedores y consultas en compañías nacionales de servicios.

Cuando se contó con toda esta información, fue posible estimar el punto de equilibrio relacionando los ingresos, los costos totales y la utilidad (más adelante se detallará el cálculo). Todas las estimaciones realizadas se reflejaron en un flujo de caja, el cual permitió estimar los indicadores financieros VAN y TIR. Adicionalmente, se realizó un análisis de sensibilidad mediante el método Montecarlo utilizando el Software @Risk de Palisade variando el volumen de ventas, el precio unitario y el costo unitario.

## 4.2 Análisis financiero

Una vez que se diseñó el proceso productivo de aceites microbianos, que se planteó la producción de biodiesel como opción para comercializar dichos aceites y que se evaluó la viabilidad legal y ambiental del proyecto, se procedió a realizar un análisis financiero. En el análisis financiero que se presenta en este documento, se pretende determinar cuáles son los escenarios de rentabilidad del proyecto. Es decir, se consideraron todos los costos, gastos, inversiones y beneficios que genera

el proyecto, con el fin de tener claridad respecto a cuáles etapas, rubros y características del proyecto inciden con mayor significancia en la rentabilidad del proceso productivo. De manera en que los inversionistas posean información valiosa que les permita tomar decisiones respecto a sus desembolsos monetarios.

Como se mencionó anteriormente, se evaluaron dos escenarios distintos. Estos escenarios representan dos procesos productivos de biodiesel: uno con una etapa de concentración mediante evaporación (Escenario A) y otro con una etapa de concentración mediante adición directa de lactosa (Escenario B).

Lo primero que se realizó fue la definición del tamaño de mercado y la demanda. La empresa indicó que la parte interesada que funcionará como comprador del biodiesel y que por ahora es la única parte con la cual se mantienen negociaciones de este tipo, suele invertir 9 millones de dólares al año en la compra de combustibles, lo cual equivale a un consumo anual de 7 800 000 L. Este volumen corresponde al tamaño total del mercado y a la demanda total del proyecto en cuestión.

Seguidamente, se procedió a realizar la fijación de precios e ingresos. Para esto se consideró la producción que se obtendrá a partir de cada escenario en los primeros 3 años y se tomó como referencia el precio reportado por Recope para el diesel (CRC 527 por L de diesel en marzo del 2021) para estimar el precio de venta. El Escenario A implica una producción mucho más reducida de biodiesel, el máximo porcentaje que puede llegar a suministrar con respecto al consumo actual total de la empresa interesada es de 19,8%, por lo que se definió que el máximo que se llegará a alcanzar será el 19% del tamaño del mercado y se producirá dicho porcentaje desde el año 1 hasta el año 3 (año final del análisis realizado).

El Escenario B lograría satisfacer un 66,9% del tamaño total del mercado. Por lo tanto, se planteó que para el año 3 se llegara a cubrir un 66% del mismo, como resultado de un aumento gradual de un 15% al año. El Escenario B se planteó como un aumento gradual, ya que sería muy riesgoso para la empresa transicionar de manera inmediata a otro proveedor que les cubra más del 60% de su combustible, ya que es una materia prioritaria para su funcionamiento.

Por lo tanto, la estimación de los ingresos no varía para el Escenario A en los años 1, 2 y 3 y su cálculo corresponde a la multiplicación entre el precio de venta

(fijado por Recope) y la producción en litros de biodiesel. Para el Escenario B, los ingresos irán en aumento con respecto al paso de los años. Asimismo, su estimación corresponde a la multiplicación entre el precio de venta y la producción en litros de biodiesel. El resumen de los ingresos se muestra en el Cuadro [4.1](#)

**Cuadro 4.1.** Resumen de ingresos para los años 1, 2 y 3 para ambos escenarios.

Año	Escenario A, (CRC)	Escenario A, (USD)	Escenario B, (CRC)	Escenario B, (USD)
1	738 664 938	1 176 218	1 399 575 672	2 228 623
2	738 664 938	1 176 218	1 982 732 202	3 157 216
3	738 664 938	1 176 218	2 565 888 732	4 085 810

Para las estimaciones realizadas en este apartado, se utilizó un tipo de cambio de CRC 628 por cada dólar, esto correspondiente al estipulado el 22 de setiembre del 2021 y se consideró una tasa de inflación del 3,3%, según reportes del Banco Central de finales del 2021 en Costa Rica. Posterior a la estimación de ingresos se llevó a cabo la estimación de la inversión, la cual corresponde al mobiliario, equipo y maquinaria requerido para el proyecto así como las depreciaciones. El proceso para calcular estos montos consistió primero en levantar el listado de todo lo necesario, se tomó en cuenta el equipo de oficina: celulares, computadoras, sillas, mesas y toda la maquinaria que compone las operaciones unitarias propuestas. Para cada elemento de equipo, mobiliario y maquinaria se calculó su depreciación mediante el método lineal con base en sus años de vida útil. Los años de vida útil se determinaron según la directriz emitida por el Ministerio de Hacienda y Contabilidad Nacional.

En el Cuadro [4.2](#), se muestra la estimación de costos detallada para toda la maquinaria del escenario A. En la primera columna se encuentra la lista del total de equipos de la planta productiva, en la segunda el volumen de cada uno de estos equipos y en la tercera, cuarta, quinta y sexta, se muestran los costos unitarios, de envío, total (unitario más envío) y depreciación. Los costos unitarios se definieron consultando en páginas de proveedores y se consideró el tipo de equipo y el volumen. La mayoría de estos precios provienen de un rango dado por el proveedor, por lo que se procedió a seleccionar el límite superior con el fin de plantear el escenario más costoso y si se generan cambios por variaciones en el precio, que sean en beneficio

de los inversionistas. Cabe destacar que si bien se colocó el costo del evaporador en el Cuadro 4.2, este equipo ya lo posee la empresa, por lo que su compra no será necesaria y por lo tanto no se refleja en el balance final. Sin embargo, se consideró información relevante en caso de que se enfrenten a una sustitución en el futuro. El costo de envío se estimó como el 40% del costo total del equipo (Peters *et al.*, 2003).

**Cuadro 4.2.** Resumen de inversión y depreciación anual para el escenario A.

Equipo	Volumen, ( $m^3$ )	Costo unitario, (USD)	Costo envío, (CRC)	Costo total, (USD)	Deprecia- ción, (USD)
Evaporador	0,47	60 000	24 000	84 000	5 880
Intercambiador	0,56	500	200	700	70
2 tanques agitados	3,35	2 200	880	6 160	431,2
3 biorreac- tores	24,1	20 000	8 000	84 000	8 400
Microfiltración	2,11	10 750	4 300	15 050	1 053,5
Homogenizador	0,043	8 800	3 520	12 320	862,4
Tanque agitado	0,071	2 200	880	3 080	215,6
Intercambiador	0,045	500	200	700	70
Microfiltración	0,075	10 750	4 300	15 050	1 053,5
Ultrafiltración	1,82	5 375	2 150	7 525	526,75
Reactor	0,17	10 000	4 000	14 000	1 400
Decantación	0,17	30 000	12 000	42 000	2 940

De igual manera que para el escenario A, para el escenario B se consideró el volumen y el tipo de equipo para definir el precio. Adicionalmente, se consideró el costo de envío y el de depreciación. Estos costos coinciden con los del escenario A ya que solo se ahorra el costo correspondiente a la compra del intercambiador que se requiere antes de la operación de evaporación, ya que esta operación no se incluye en este escenario y la compra del evaporador no se consideró ni siquiera en el escenario A ya que es un activo que la empresa posee.

Además, al haber seleccionado los límites superiores de los rangos de precio para el escenario A, no hay mayor variación ahora en el escenario B, ya que dichos rangos de precio corresponden a su vez a rangos de volúmenes para cada equipo y los rangos dados por los proveedores abarcan los volúmenes de ambos escenarios. El haber considerado los valores máximos le aporta al proyecto mayor seguridad de inversión,

ya que si las decisiones de inversión se contemplan utilizando los datos expuestos, es posible que se generen ahorros en la puesta en marcha. De manera contraria si se hubieran considerado los valores inferiores, el proyecto podría haber parecido rentable y a la hora de ponerlo en marcha y empezar con el proceso de adquirir los equipos, se hubieran podido presentar problemas por elevación de costos. Además, es recomendable adquirir equipos que les permita ampliar su producción a futuro si esto está dentro de sus objetivos, ya que de manera contraria, si se compran equipos pequeños que están en su máximo volumen y la empresa quiere aumentar su producción, se tendrá que someter nuevamente a un proceso de inversión para la compra de maquinaria de mayor volumen. En el Cuadro 4.3 se muestran los costos de maquinaria del escenario B

**Cuadro 4.3.** Resumen de inversión y depreciación anual para el escenario B.

Equipo	Volumen, ( $m^3$ )	Costo unitario, (USD)	Costo envío, (CRC)	Costo total, (USD)	Deprecia- ción, (USD)
2 tanques agitados	11,3	2200	880	6160	431,2
3 biorreac- tores	81,2	20160	8064	84672	8467,2
Microfiltración	7,09	10750	4300	15050	1053,5
Homogenizador	0.14	8800	3520	12320	862,4
Tanque agitado	0,237	2200	880	3080	215,6
Intercambiador	0,14255	500	200	700	70
Microfiltración	0,252	10750	4300	15050	1053,5
Ultrafiltración	6,11	5375	2150	7525	526,75
Reactor	0.552	10000	4000	14000	1400
Decantación	0.552	30000	12000	42000	2940

Para la estimación de costos asociados a mobiliario se consideraron los siguientes artículos: dos celulares, tres computadoras, tres escritorios de oficina, tres sillas de oficina, una mesa de apoyo, un microondas, un router, una impresora, dos pizarras y cinco regletas. La adquisición de los productos listados representa un costo total de USD 4 027 y una depreciación anual de USD 614. Esta estimación se realizó consultando a proveedores y utilizando el método lineal de depreciación explicado anteriormente.

De esta manera, se logra definir que para ambos escenarios se debe asumir una inversión de USD 4 027 por concepto de maquinaria (celulares, computadoras, equipo de oficina) y un total de USD 200 585 por concepto de equipo (biorreactores, tecnología de membranas, etc.) para el escenario A y un total de USD 200 557 para el escenario B. De manera en que el análisis financiero, por ahora, se muestra bastante similar para ambos escenarios.

Seguidamente, se estimaron los gastos preoperativos, los cuales consisten en materiales auxiliares, gastos administrativos, gastos legales, sueldos previos y prueba piloto. Las estimaciones realizadas se resumen en el Cuadro 4.4. Los gastos de software, licencia de operación y permisos de funcionamiento se definieron mediante consultas a proveedores y a las instituciones del gobierno involucradas.

**Cuadro 4.4.** Desglose del balance de gastos preoperativos.

<b>Rubro</b>	<b>Monto, (USD)</b>
MRO's	10 732,79
Software	185,11
Inscripción CCSS	0
Licencia de operación	15,92
Permisos funcionamiento	100
Inscripción contribuyente	0
Capacitaciones	2 181,53
Prueba piloto	110 732,79
Sueldos previos	18 332,01

Lo que se define en el Cuadro 4.4 como MRO's contempla los siguientes materiales auxiliares: hidróxido de sodio, ácido nítrico, detergente no iónico, desinfectante, bolsas de basura, papel toalla, resmas de papel, lapiceros, marcadores, grapas y tinta de impresora. Nuevamente, estas estimaciones se realizaron mediante consultas con proveedores y definiendo un requerimiento mensual para cada uno de estos productos. El hidróxido de sodio, el ácido nítrico y el detergente no iónico son productos que se contemplan para la limpieza de las membranas. Para estimar el requerimiento mensual de los productos de limpieza se sumaron los volúmenes de las tres membranas (3,991  $m^3$  en total) y se consideraron dos limpiezas al mes con disoluciones al 30% m/m (Adisson-Korat y Rizvi, 2004). Los requerimientos mensuales

de los demás materiales se estimaron considerando la cantidad de colaboradores y el área de la sección de trabajo (la cual fue estimada mediante la suma del área de los equipos y un porcentaje adicional correspondiente al 50% para permitir una debida distribución).

Los costos de capacitación se estimaron bajo la suposición de que para esto se iba a contratar un ingeniero por un plazo de un mes. La estimación de costos de la prueba piloto fue dada por la empresa, ya que ya se han sometido a procesos de cotización para realizarla en un laboratorio privado.

La etapa siguiente del análisis financiero corresponde a la estimación de los gastos operativos, los cuales están compuestos por los siguientes rubros: mantenimiento, personal, servicios básicos para el personal, costes de laboratorio, supervisión, dirección de la planta, cargas de capital, seguros, impuestos y regalías. Para determinar el monto asociado a cada uno de estos rubros se calculó primero el valor asociado a la mano de obra, considerando cargas sociales, y el costo correspondiente a los servicios. Los demás rubros se determinaron a partir de porcentajes que establecen Peters *et al.* (2003). El balance de gastos operativos se muestra en el Cuadro 4.5.

**Cuadro 4.5.** Desglose del balance de gastos operativos.

<b>Gasto</b>	<b>Monto, (CRC)</b>	<b>Monto, (USD)</b>
Mantenimiento	5 648 370,61	8 994,22
Personal	29 771 858	47 407,42
Servicios básicos	94 032	149,73
Costes de laboratorio	11 039 702	17 579,14
Supervisión	12 713 326	20 244,15
Dirección de planta	12 713 32	20 244,15
Cargas de capital	11 296 741,22	17 988,44
Seguros	753 116,08	1 199,23
Impuestos	1 506 232,16	2 398,46
Regalías	753 116,08	1 199,23
<b>TOTAL</b>	<b>86 289 820</b>	<b>137 404,17</b>

El rubro de mantenimiento que se muestra en el Cuadro 4.5 se estimó como un 7,5% del capital fijo (Peters *et al.*, 2003). El personal se estimó considerando la contratación de: dos ingenieros licenciados jornada completa, dos colaboradores de limpieza media jornada, un licenciado en administración jornada completa, un

bachiller en recursos humanos media jornada, un contador media jornada y un mercadólogo media jornada. Los salarios respectivos se consultaron en el Ministerio de Trabajo y de Seguridad Social y se consideraron las cargas sociales respectivas. Los servicios básicos se estimaron mediante la consulta a las instituciones públicas. La cantidad de agua requerida había sido estimada en el capítulo en el que se analizó la viabilidad ambiental del proyecto y el consumo energético se estimó según lo que indicaron los proveedores de los equipos del consumo de cada máquina. Los costes de laboratorio se estimaron como un 20% de la mano de obra directa (Peters *et al.*, 2003). La supervisión y dirección de planta se estimó considerando el salario de un ingeniero licenciado. Finalmente, las cargas de capital, seguros, impuestos y regalías se estimaron también mediante porcentajes según establece la metodología Peters *et al.* (2003).

Seguidamente, se realizó el balance de costos para cada uno de los dos escenarios, los cuales se resumen en el Cuadro 4.6. En dichos cuadros se muestran los costos asociados a la materia prima, alquiler de la planta, los servicios y la mano de obra. Además, se consideró una tasa de inflación de 3,3%. El detalle de la estimación de cada uno de los rubros mencionados se explica a continuación.

La estimación de la mano de obra se realizó como se explicó en el capítulo de viabilidad ambiental. Se utilizaron los valores típicos de mano de obra requerida según tipo de equipo que se exponen en el libro de Peters *et al.* (2003) (Cuadro 3.1). De esta manera, se tiene para el Escenario A un total de 6 operarios, cada uno con un salario mensual de CRC 360 000. A estos salarios se le incluyó el monto de cargas sociales y se obtiene una inversión total de mano de obra de USD 63 836 al año.

Por otro lado, para el Escenario B se realizó el mismo procedimiento con la excepción de que se tienen 5 operarios en lugar de 6, ya que en este escenario se tiene un equipo menos (el evaporador). De esta manera, se destina a los salarios de mano de obra anuales un total de USD 53 196 en el escenario B.

Los servicios se cotizaron como se mencionó en el capítulo de viabilidad ambiental, mediante la consulta del costo del agua y de la electricidad en el AyA y en el Grupo ICE. Este rubro es el mismo para ambos escenarios, ya que los equipos tanto para el Escenario A como para el Escenario B comparten el rango de precios,

**Cuadro 4.6.** Desglose del balance de costos para los Escenarios A y B.

<b>Costo anual</b>	<b>Monto, (CRC)</b>	<b>Monto, (USD)</b>
<b>ESCENARIO A</b>		
<b>Año 1</b>		
Mano de obra	40 088 736	63 835,57
Servicios	55 110 491,88	87 755,56
Materias primas	150 775 252,2	240 087,98
Alquiler de planta	3 381 830,24	5 385,08
<b>TOTAL</b>	<b>249 356 310,3</b>	<b>397 064,19</b>
<b>Año 2</b>		
Mano de obra	41 411 664	65 942,14
Servicios	56 929 138	90 651,49
Materias primas	155 750 835	248 010,88
Alquiler de planta	3 493 431	5 562,79
<b>TOTAL</b>	<b>257 585 069</b>	<b>410 167</b>
<b>Año 3</b>		
Mano de obra	42 778 249,21	68 118,23
Servicios	58 807 799,67	93 642,99
Materias primas	160 890 613,05	256 195,24
Alquiler de planta	3 608 713,85	5 746,36
<b>TOTAL</b>	<b>266 085 375,79</b>	<b>423 702,83</b>
<b>ESCENARIO B</b>		
<b>Año 1</b>		
Mano de obra	33 407 280	53 196,31
Servicios	23 551 588,8	37 502,53
Materias primas	1 459 767 008	1 904 360,56
Alquiler de planta	3 381 830,24	7 347,88
<b>TOTAL</b>	<b>1 520 107 707</b>	<b>2 002 407,27</b>
<b>Año 2</b>		
Mano de obra	34 509 720,24	54 951,78
Servicios	24 328 791,23	38 740,11
Materias primas	1 593 026 493,42	2 228 641,58
Alquiler de planta	3 493 430,64	7 590,36
<b>TOTAL</b>	<b>1 655 358 435,53</b>	<b>2 403 469,01</b>
<b>Año 3</b>		
Mano de obra	35 648 541,01	56 764,19
Servicios	25 131 641,34	40 018,54
Materias primas	1 700 859 812,16	2 708 375,50
Alquiler de planta	3 608 713,85	7 840,84
<b>TOTAL</b>	<b>1 765 248 708,35</b>	<b>2 813 000,07</b>

volúmenes y demanda energética que dieron los proveedores.

La estimación de costos por concepto de materia prima difiere entre ambos escenarios. Ya que el escenario A no contempla la adición de lactosa, puesto a que realiza la concentración mediante evaporación. Por lo tanto, la lactosa es una materia prima que solo aplica para el escenario B. La lista de las materias primas cotizadas para el escenario A se muestra en el Cuadro 4.7.

**Cuadro 4.7.** Desglose de costos por concepto de materia prima para el escenario A.

<b>Materia</b>	<b>Requerimiento,</b> (kg/mes)	<b>Costo,</b> (USD/kg)	<b>Total anual,</b> (USD)
Sulfato magnesio	600,75	0,7	7 064,82
Sulfato de amonio	3 153,94	0,16	8 477,784
Cloruro de calcio	1 291,61	0,135	2 929,38
Suero láctico	NA	NA	NA
Alcohol etílico	18 468	1	221 616

El sulfato de magnesio, el sulfato de amonio y el cloruro de calcio, son los nutrientes que requiere el caldo de cultivo. Los requerimientos mensuales fueron dados por la empresa. El suero láctico no tiene costo ya que es una corriente residual. El alcohol etílico es para la transesterificación y su requerimiento se estimó mediante los balances de masa que se muestran en la sección de diseño. La columna del Cuadro 4.7 respectiva al total anual considera el costo de importación (40% del costo total de cada materia (Peters *et al.*, 2003)).

Para el Escenario B (ver Cuadro 4.8) las materias primas son las mismas, solo se debe incluir la lactosa y se debe contemplar un incremento anual del 15% en la producción. El requerimiento mensual del sulfato de magnesio, de amonio y el cloruro de sodio se estimó mediante especificaciones de la empresa y se consideró el costo de exportación en la estimación del total anual.

Para estimar el alquiler de la planta primero se consultó el área que ocupará cada equipo en las indicaciones de cada proveedor. Posteriormente, se sumó esta área y se le aumentó un porcentaje del 50% definido por la empresa para establecer una adecuada distribución de la planta. Seguidamente, se consultaron precios de bodegas en la zona industrial del Coyoil (que es donde la empresa colocará la planta) y se promediaron los costos encontrados por metro cuadrado. De esta manera se

**Cuadro 4.8.** Costos por concepto de materia prima para el Escenario B.

<b>Materia</b>	<b>Requerimiento, (kg/mes)</b>	<b>Costo, (USD/kg)</b>	<b>Total anual, (USD)</b>
<b>Año 1</b>			
Sulfato de magnesio	1 463,04	0,7	19 315,49
Sulfato de amonio	7 681,5	0,16	15 553,35
Cloruro de calcio	3 145,5	0,135	20 194,76
Suero láctico	NA	NA	NA
Alcohol etílico	44 971,2	1	755 516,16
Lactosa	43 404	1,5	1 093 780,8
<b>Año 2</b>			
Sulfato de magnesio	1 721,25	0,7	20 241,9
Sulfato de amonio	9 036,9	0,16	24 291,19
Cloruro de calcio	3 700,8	0,135	8 393,41
Suero láctico	NA	NA	NA
Alcohol etílico	52 905,6	1	888 814,08
Lactosa	51 067,5	1,5	1 286 901
<b>Año 3</b>			
Sulfato de magnesio	2 025	0,7	23 814
Sulfato de amonio	10 631,25	0,16	28 576,8
Cloruro de calcio	4 353,75	0,135	9 874,31
Suero láctico	NA	NA	NA
Alcohol etílico	62 244	1	1 045 699,2
Lactosa	60 075	1,5	1 513 890

determinó que la empresa deberá pagar USD 10 por metro cuadrado, lo que significa aproximadamente USD 7 000 al año para ambos escenarios.

Seguidamente, se estimó el capital de trabajo (ver Cuadro 4.9), restando los gastos operativos y los costos a los ingresos. Esto se calculó para cada año del análisis de ambos escenarios. Cabe destacar que el capital de trabajo fue siempre positivo, lo cual es favorable para el proyecto ya que significa que los ingresos son mayores que los costos y los gastos. Para este punto, ya se contaba con toda la información para realizar el flujo neto de efectivo (FNE).

Una vez que se contó con toda la información de las inversiones, gastos, costos y capital de trabajo requerido, se realizó el flujo neto de efectivo. Adicionalmente, con el flujo neto de efectivo (FNE) es posible determinar el valor actual neto (VAN) y la

**Cuadro 4.9.** Capital de trabajo para el Escenario A y para el Escenario B en los años 1, 2 y 3.

Escenario	Monto, (USD)
A año 1	641 749,69
A año 2	628 646,57
A año 3	615 111,054
B año 1	88 812,23
B año 2	616 343,6986
B año 3	1 135 405,84

tasa interna de retorno (TIR), que son los indicadores financieros que nos permiten comprender los resultados del FNE.

Para poder estimar el VAN, se requiere el costo capital, el cual es un valor que representa el porcentaje de inversión que se quiere recuperar del proyecto. En este caso, la empresa indica que sus inversionistas esperan recuperar un 6% de la inversión (en ambos escenarios). De esta manera, se obtiene para el Escenario A un VAN de USD 839 380,55. Este valor indica la viabilidad del proyecto, ya que el resultado positivo implica que esa es la cantidad que recibirían los inversionistas después de haber recuperado su inversión. Seguidamente se estima la TIR, para el cual se obtiene un valor de 115%, lo cual significa que el proyecto, bajo las condiciones analizadas, es rentable. En el Cuadro [4.10](#), se puede ver el resumen del flujo neto de efectivo (FNE) correspondiente al escenario A.

Por otro lado, el Escenario B presentó un VAN de USD 742 775,93 y una TIR de 69%. Esto significa que el proyecto es viable y rentable. Como se mencionó anteriormente, un VAN mayor a cero indica que el beneficio neto proyectado que se estimó considerando la tasa de rentabilidad que esperan los inversionistas se ha alcanzado y se generan ganancias.

La tasa interna de retorno se puede interpretar como la tasa máxima de rentabilidad que pueden esperar los inversionistas. Por lo tanto, el tener tanto un VAN como una TIR positivas, indican que el proyecto cubre la inversión, genera ganancias y tiene una tasa de rentabilidad favorable para los inversionistas. En el Cuadro [4.11](#) se puede ver que el flujo neto de efectivo desde el año 1 es superior a la inversión del año 0. Además, se puede ver que el crecimiento de la utilidad año tras año es

**Cuadro 4.10.** Resumen del flujo neto de efectivo para el Escenario A.

<b>Rubro</b>	<b>Año 0, (USD)</b>	<b>Año 1, (USD)</b>	<b>Año 2, (USD)</b>	<b>Año 3, (USD)</b>
Ingresos		1 176 218,05	1 176 218,05	1 176 218,05
Costos		397 064,19	410 167,31	423 702,83
Utilidad bruta		779 153,87	766 050,75	752 515,23
Gastos operativos		137 404,17	137 404,17	137 404,17
Gastos por depreciación		17 637,59	17 637,59	17 637,59
Gasto por intereses		0	0	0
Utilidad antes de impuesto		624 112,11	611 008,99	597 473,47
Impuesto (30%)		187 233,63	183 302,70	179 242,04
Utilidad después de impuestos		436 878,47	427 706,29	418 231,43
Gasto por depreciación		17 637,59	17 637,59	17 637,59
Financiamiento				
Amortización				
Inversión (año 0)	204 612,11			
Gastos preoperativos (año 0)	147 114,57			
Capital de trabajo (año 0)	641 749			
FNE	-351 726,68	454 516,06	445 343,88	435 869,01
Costo de capital	0.06			
VAN (USD)	839 380,55			
TIR (%)	115			

significativo. Estos números son los que reflejan que el escenario de inversión es beneficioso, un poco más para el Escenario A que para el Escenario B.

Los resultados expuestos en los flujos netos de efectivo o flujos de caja de ambos escenarios son los que evidencian que ambos casos propuestos son rentables y representan opciones factibles. Si bien el Escenario A presenta indicadores financieros

**Cuadro 4.11.** Resumen del flujo neto de efectivo para el Escenario B.

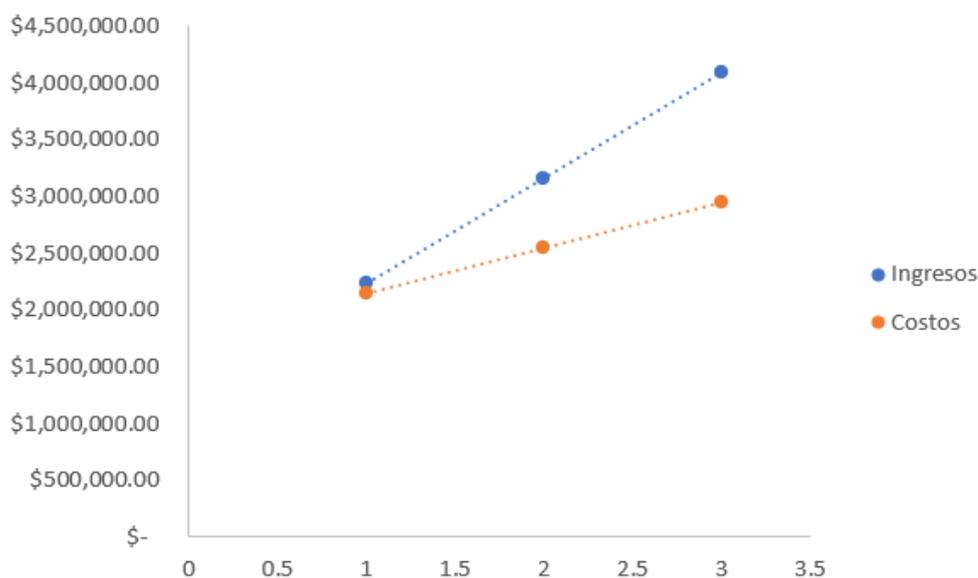
<b>Rubro</b>	<b>Año 0, (USD)</b>	<b>Año 1, (USD)</b>	<b>Año 2, (USD)</b>	<b>Año 3, (USD)</b>
Ingresos		2 661 967	3 590 560	4 519 153
Costos		2 002 407	2 403 469,01	2 813 000,07
Utilidad bruta		659 559	1 187 091,36	1 706 153,51
Gastos operativos		137 404,17	137 404,17	137 404,17
Gastos por depreciación		17 634	17 634	17 634
Gasto por intereses		0	0	0
Utilidad antes de impuesto		504 520,94	1 032 052,41	1 551 114,55
Impuesto (30%)		151 356,28	309 615,72	465 335,36
Utilidad post impuestos		353 164,66	722 436,68	1 085 780,18
Gasto por depreciación		17 634	17 634	17 634
Financiamiento				
Amortización				
Inversión	204 584			
Gastos preoperativos	147 114,57			
Capital de trabajo	88 812,24			
FNE	-351 698,68	67 459	436 731,03	764 804,95
Costo de capital	0,06			
VAN (USD)	742 775,93			
TIR (%)	69			

más favorables, el Escenario B tiene una mayor producción y posicionamiento en el mercado.

Seguidamente se procedió a estimar el punto de equilibrio. Para el Escenario A se calculó el punto de equilibrio para determinar la cantidad de litros de biodiesel que se deben vender al año. La estimación consiste en dividir los gastos operativos entre la sustracción del costo variable unitario al precio de venta del biodiesel. El resultado de esta operación fue de 242 065 L y se está proyectando una venta de

hasta 1 402 200 L, por lo tanto el punto de equilibrio se satisface para este escenario.

El punto de equilibrio para el Escenario B fue calculado para la utilidad bruta y se consideró su variación año tras año. La estimación consistió en calcular la utilidad (ingresos menos la suma entre los gastos operativos y los costos) para los años 1, 2 y 3. Los ingresos y los costos se graficaron (eje y) respecto a cada año operativo (eje x) y se definió la línea de tendencia. Tal como se muestra en la Figura 4.2, las dos rectas nunca intersecan, aunque bien en el año 1 están cerca de hacerlo. La no intersección se debe a que siempre se tiene una utilidad positiva. Es decir, el proyecto se ubica siempre por encima del punto de equilibrio.



**Figura 4.2.** Representación gráfica utilizada para estimar el punto de equilibrio del Escenario B. (Elaboración propia).

Parte del objetivo de este capítulo era el de realizar un análisis de sensibilidad. Por lo tanto, se utilizó el software @Risk de Palisade bajo el método Montecarlo. El análisis de sensibilidad se realizó tanto para el Escenario A como para el Escenario B. El análisis se llevó a cabo en la hoja de cálculo de Excel que estima el flujo neto de efectivo, se aplicó una distribución de tipo Pert a los datos de volumen de ventas (en litros), precio unitario y costo unitario (ambos en dólar por litro) y se seleccionaron como variables de salida el VAN y la TIR. El análisis se corrió para 10 000 iteraciones. En la Figura 4.3 se muestran los percentiles correspondientes a

las variables de salida del Escenario A.

En la Figura 4.3 se puede ver que del percentil 1% al 5% ambos indicadores financieros se mantienen con valores negativos, esto significa que el 5% de los resultados analizados presentan un escenario de inversión desfavorable. A partir del percentil del 10% la TIR se vuelve positiva, sin embargo el VAN se mantiene negativo.

Percentiles	VAN	TIR
1%	-\$601,634.49	-57.29%
2.5%	-\$462,369.83	-39.79%
5%	-\$324,727.31	-22.53%
10%	-\$143,957.65	0.211%
20%	\$110,298.82	33.78%
25%	\$230,425.63	47.78%
50%	\$738,873.31	107.62%
75%	\$1,393,769.25	180.70%
80%	\$1,565,225.91	199.90%
90%	\$2,040,240.77	251.40%
95%	\$2,439,750.33	294.53%
97.5%	\$2,808,927.49	335.00%
99%	\$3,250,901.78	382.19%

**Figura 4.3.** Percentiles de las variables de salida correspondientes al Escenario A. (Elaboración propia).

Por otro lado, en la Figura 4.4 se pueden ver los percentiles correspondientes a la estadística del Escenario B. Para el VAN, únicamente el 25% de los datos son negativos. Esto significa que de la totalidad de las iteraciones realizadas solo el 25% presentan un escenario desfavorable para la inversión. El caso de la TIR es aún más beneficioso, ya que únicamente el 5% de los casos conllevan la no rentabilidad del proyecto. Es decir, el 75% de los escenarios son de éxito bajo las condiciones estudiadas. Por lo tanto, comparando los resultados obtenidos en el análisis de sensibilidad respecto a percentiles, se puede afirmar que el Escenario A es más favorable.

Adicionalmente, se obtuvo la ponderación de las variables de entrada (volumen de ventas, precio y costo unitarios) según el efecto que ejercen sobre las variables de salida (VAN y TIR). En la Figura 4.5 se puede ver que la variable de entrada

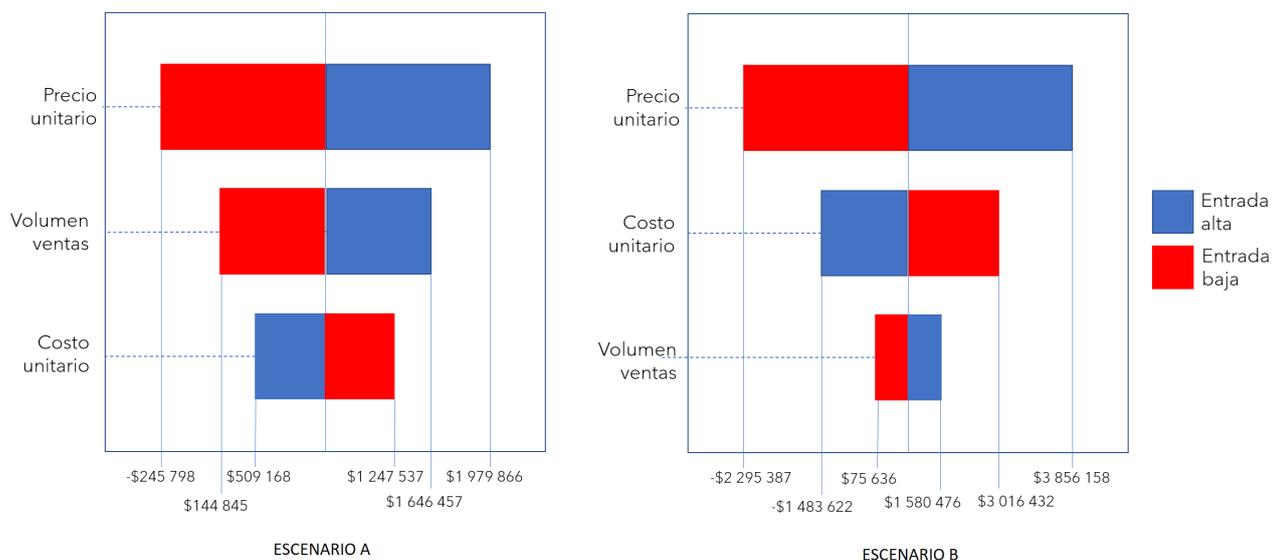
Percentiles	VAN	TIR
1%	-\$4,504,084.14	-54.88%
2.5%	-\$3,734,224.81	-38.45%
5%	-\$2,905,166.66	-20.10%
10%	-\$2,077,767.15	11.18%
20%	-\$1,127,366.61	57.08%
25%	-\$777,556.94	79.73%
50%	\$641,124.10	181.13%
75%	\$2,248,676.17	313.75%
80%	\$2,697,313.25	348.32%
90%	\$3,853,673.03	451.15%
95%	\$4,888,235.55	545.28%
97.5%	\$5,877,591.49	631.48%
99%	\$7,088,314.86	718.35%

**Figura 4.4.** Percentiles de las variables de salida correspondientes al Escenario B. (Elaboración propia).

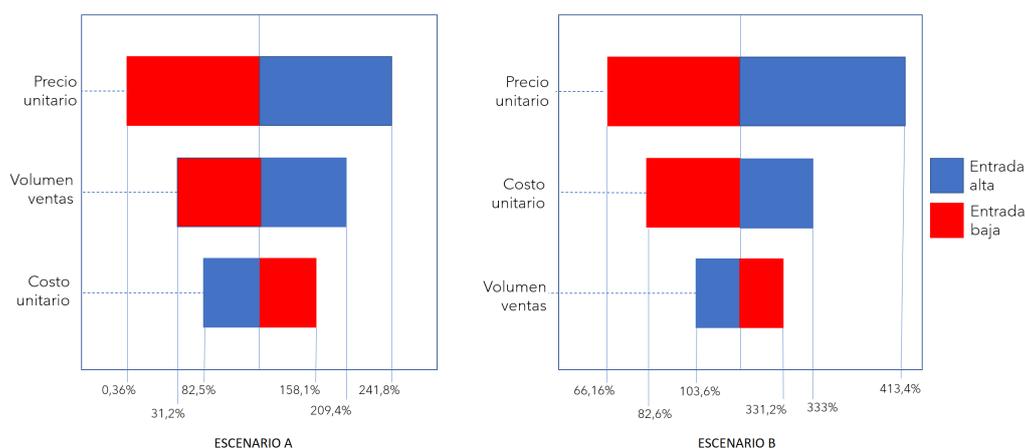
para el Escenario A y el B que tiene mayor influencia sobre el VAN es el precio unitario, en segundo lugar el costo unitario y en tercer lugar el volumen de ventas para el Escenario B y el costo unitario para el Escenario A. Dicha información es sumamente valiosa, ya que indica que el proyecto presenta mayor sensibilidad ante los cambios en el precio unitario.

Al realizar el mismo ejercicio para la TIR (ver Figura 4.6), se logra determinar que el precio unitario también es la variable de entrada con mayor incidencia sobre dicha variable de salida. De esta manera, se puede llegar a la conclusión de que la viabilidad del proyecto depende mayoritariamente del precio unitario.

Por lo tanto, se realizó una revisión de las 10 000 iteraciones de cada escenario con el fin de determinar cuál podría ser el precio unitario mínimo viable. Cabe destacar que el precio mínimo viable dependerá también de las otras variables: volumen de ventas y costo unitario. Por lo tanto, se presenta el escenario identificado en las 10 000 iteraciones del Escenario A como el que presenta el precio unitario mínimo viable: volumen de ventas de 946 868 L, costo unitario de USD 0,416 y precio unitario de USD 0,7569. Dicha iteración presenta un VAN de USD 8 776,41 y una TIR de



**Figura 4.5.** Gráfico de las variables de entrada jerarquizadas según su efecto en la salida media del VAN. (Elaboración propia).



**Figura 4.6.** Gráfico de las variables de entrada jerarquizadas según su efecto en la salida media del TIR. (Elaboración propia).

7%. Por otro lado, el caso determinado para el Escenario B es: precio unitario de USD 0,7968 con un volumen de ventas de 4 820 988 L y un costo unitario de USD 0,72664. Esta iteración presenta una TIR de 7% y un VAN de USD 5 131,86.

De esta manera, del análisis de sensibilidad se puede concluir que el Escenario A resulta más favorable en términos de VAN y TIR que el Escenario B, ya que presenta un 90% de posibilidades de éxito para obtener un retorno de la inversión y lograr

obtener ganancias, mientras que el Escenario B presenta un 75% de posibilidades de alcanzar las condiciones recientemente expuestas. Además, se logró determinar que el precio unitario, de las variables analizadas, es la que más incide en los resultados de los indicadores financieros y que los precios unitarios mínimos viables son de USD 0,7569 (CRC 475) y USD 0,7968 (CRC 500) para el Escenario A y B respectivamente, estos precios unitarios son menores a los que paga la empresa por combustible (USD 1,15 y CRC 722), ya que el dato reportado fue un consumo de 7 800 000 L al año por aproximadamente USD 9 000 000.

# Conclusiones y recomendaciones

## 5.1 Conclusiones

- Se concluye que para producir TAGs con un nivel de pureza del 99% se requiere una primera etapa de concentración de lactosa en el suero láctico mediante evaporación o adición de lactosa, seguido de una etapa de mezclado en tanques agitados, un proceso de biorreacción mediante un sistema de tres biorreactores en paralelo, una microfiltración para la cosecha celular, una homogenización a alta presión para promover la disrupción celular y una microfiltración seguida de una ultrafiltración para la purificación del producto.
- Las condiciones de operación de la evaporación para poder alcanzar la concentración del 15% m/m de lactosa en el suero deben ser: temperatura de entrada 69°C, flujo lactosuero de entrada 1 875 kg/h, temperatura de salida 82°C, presión dentro del evaporador 31,06 kPa, coeficiente global de transferencia 1 750 W/m<sup>2</sup> °C, calor latente de evaporación 2 201,96 L/(kJ/kg) y tiempo de retención de 15 min
- Para la acumulación de lípidos en la bacteria durante el proceso de biorreacción se requiere de una configuración de tres biorreactores semi-alimentados (fed-batch) en paralelo, agitación mecánica dentro del rango de los 100 rpm y 350 rpm, saturación de oxígeno en el medio entre 0% y 100%, pH entre 7 y 7,3, temperatura de 30°C y tiempo de retención 72 horas.
- La etapa de cosecha celular se debe llevar a cabo mediante una microfiltración, con presiones de operación cercanas o menores a 69 kPa, un porcentaje de retención cercano al 99,5% y un tiempo de retención de 120 minutos.
- Considerando consumo energético, escalabilidad, costos operacionales y rendimiento, la tecnología que se debe utilizar para la disrupción celular debe ser un homogenizador de alta presión, con una presión de operación entre los 100 MPa y 300 MPa, temperatura de 25°C, temperatura de ajuste entre pases de 5°C, número de pases entre 4 y 10 y tiempo de retención de 0,083 min.

- Tomando en cuenta los criterios de consumo energético, escalabilidad, costos operacionales y rendimiento, se determinó que la etapa de purificación debe estar compuesta por una microfiltración seguida de una ultrafiltración. Ambas operaciones con un tiempo de retención cercano a los 120 min y temperatura de operación de 25°C.
- Se concluye que los mayores impactos corresponden al consumo de agua, emisiones generales a la contaminación atmosférica, ruidos y vibraciones en etapa constructiva, generación y clasificación de residuos, impacto social y consumo de combustibles fósiles.
- Para mitigar el consumo de agua se debe realizar un análisis de red de intercambio calórico.
- Para mitigar las emisiones generales a la contaminación atmosférica se deben tomar acciones de compensación como promover la fijación de dióxido de carbono mediante la compra y mantenimiento de algún sumidero.
- Se debe hacer uso de equipos adecuados y controladores de ruido, así como realizar los procedimientos más ruidosos en horas en las que no se perjudique a la comunidad circundante para mitigar el efecto de ruidos y vibraciones durante la etapa constructiva.
- Para mitigar la generación y clasificación de residuos sólidos se debe diseñar un plan de gestión el cual establezca pautas como evitar el uso de materiales no reciclables o de difícil tratamiento posterior, reducir la cantidad de residuos generados, incentivar una rigurosa recolección de residuos, asegurar el tratamiento y la correcta disposición e identificar los residuos que se generan y los peligros y especificaciones respecto a su disposición.
- Para mitigar el impacto social de generar menos de 25 plazas laborales se deben plantear proyectos de ayuda social y estimular un ambiente de armonía con las comunidades circundantes.

- Para mitigar el consumo de combustibles fósiles se debe sustituir la etapa de evaporación con la aplicación del Escenario B en vez del A y aprovechar el biodiesel producido para operación interna de la planta.
- En términos de rentabilidad, ambos escenarios son viables, sin embargo, responden a diferentes objetivos: el Escenario A corresponde a una menor capacidad productiva y presenta un mayor consumo energético (66,3kW aproximadamente por consumo promedio de equipos reportado por proveedores), por otro lado, el Escenario B tiene una mayor capacidad productiva y un menor consumo energético (31,3kW aproximadamente por consumo promedio de equipos reportado por proveedores).
- De las variables de entrada analizadas (precio unitario, costo unitario y volumen de ventas), la que tiene mayor efecto sobre las variables de salida (indicadores financieros VAN y TIR) es el precio unitario.
- Se concluye que el precio mínimo viable del Escenario B corresponde precio unitario menor de las 10 000 iteraciones y tiene un valor de USD 0,7968 con un volumen de ventas de 4 820 988 L y un costo unitario de USD 0,72664. Esta iteración presenta una TIR de 7% y un VAN de USD 5 131,86.
- Se concluye que el precio mínimo viable del Escenario A corresponde al precio unitario menor de las 10 000 iteraciones y tiene un valor de USD 0,7569, un volumen de ventas de 946 868 L y costo unitario de USD 0,416. Dicha iteración presenta un VAN de USD 8 776,41 y una TIR de 7%.

## 5.2 Recomendaciones

- Se recomienda plantear una propuesta técnica de aprovechamiento de las corrientes residuales provenientes de las tecnologías de membranas para la operación CIP (Clean In Place).
- Se recomienda profundizar el análisis técnico y financiero del aprovechamiento de aceites microbianos para producción de biodiesel.

- Se recomienda realizar pruebas a nivel de planta piloto.

# NOMENCLATURA

## Mayúsculas

<i>A</i>	Altura	m
<i>C</i>	Flujo de caja	USD
<i>C<sub>n</sub></i>	Concentración	g/L
<i>D</i>	Diámetro	m
<i>DBO</i>	Demanda bioquímica de oxígeno	g/L
<i>DBO</i>	Demanda química de oxígeno	g/L
<i>E</i>	Tasa de evaporación	kg/s
<i>F</i>	Flujo	kg/s
<i>I</i>	Inversión	USD
<i>N</i>	Número total de períodos	adim.
<i>P</i>	Presión	kPa
<i>Q</i>	Calor	kW
<i>SS</i>	Sólidos sedimentables	mL/L
<i>SST</i>	Sólidos suspendidos totales	g/L
<i>ST</i>	Sólidos totales	g/L
<i>T</i>	Temperatura	°C
<i>TIR</i>	Tasa interna de retorno	%
<i>U</i>	Calor latente de evaporación	kJ/kg
<i>U</i>	Coefficiente global de transferencia	W/m <sup>2</sup> °C
<i>V</i>	Volumen	L

*VAN* Valor actual neto USD

### Minúsculas

*m* Masa kg

*r* TIR adim.

*t* Tiempo s

### Griegas

$\lambda$  Entalpía kJ

$\mu$  Micro adim.

### Subíndices

1 Primero

2 Segundo

3 Tercero

4 Cuarto

5 Quinto

6 Sexto

aj Ajuste

e Entrada

ext Exteriores

i Intercambiador de calor

p Pasteurizador

s Salida

v Vapor

## BIBLIOGRAFÍA

- Adisson-Korat, A. y Rizvi, S. (2004). Vatless manufacturing of low-moisture part-skim mozzarella cheese from highly concentrated skim milk microfiltration retentates. *Journal of Dairy Science*, 87(11):3601–3613. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73498-0.
- Anand, H., Balasundaram, B., Pandit, A. B., y Harrison, S. T. L. (2007). The effect of chemical pretreatment combined with mechanical disruption on the extent of disruption and release of intracellular protein from *E. coli*. *The Biochemical Engineering Journal*, 35:166–173. doi: 10.1016/j.bej.2007.01.011.
- Arce, J., Thompson, E., y Calderon, S. (2016). Incorporación de la proteína del suero lácteo en un queso fresco. *Agronomía Mesoamericana*, 27(1):61–71. doi:10.15517/AM.V27I1.21878.
- Balasundaram, B. y Harrison, S. T. L. (2006). Study of physical and biological factors involved in the disruption of *E. coli* by hydrodynamic cavitation. *Biotechnology Progress*, 22(3):907–913. doi: 10.1021/bp0502173.
- Barquero, M. (2016). Costa Rica produce cerca de 100 tipos de quesos. *La Nación*. Octubre 20:14A.
- Baruah, G. y Belfort, G. (2004). Optimized recovery of monoclonal antibodies from transgenic goat milk by microfiltration. *Biotechnology and Bioengineering*, 87(3):274–285. doi: 10.1002/bit.20112.
- Benoit, S., Margani, M., Bouchard, C., y Pouliot, Y. (2019). Eco-efficiency applied to dairy processing: from concept to assessment. *Environmental Management and Sustainable Development*, pp. 1–26. doi: 10.5296/emsd.v8i1.13607.
- Bernaerts, T. M. M., Gheysen, L., Foubert, I., Hendrickx, M. E., y Van Loey, A. M. (2019). Evaluating microalgal cell disruption upon ultra high pressure homogenization. *Algal Research*, 42. doi: 10.1016/j.algal.2019.101616.

- Bharathiraja, B., Sridharan, S., Sowmya, V., Yuvaraj, D., y Praveenkumar, R. (2017). Microbial oil – a plausible alternate resource for food and fuel application. *bioresource technology*. *Bioresource Technology*, 233:423–432. doi: 10.1016/j.biortech.2017.03.006.
- Blank, L. y Tarquin, A. (2002). *Ingeniería Económica*. McGraw-Hill, 6ta edición.
- Bligh, E. y Dyer, W. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *The Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37:911–917.
- Borthwick, K. A. J., Coakley, W. T., McDonnell, M. B., Nowotny, H. and Benes, E., y Gröschel, M. (2005). Development of a novel compact sonicator for cell disruption. *Journal of Microbiological Methods*, 60:207–216. doi: 10.1016/j.mimet.2004.09.012.
- Brans, G., Schröen, G., R., V. D. S., y Boom, R. (2004). Membrane fractionation of milk: State of the art and challenges. *Journal of Membrane Science*, pp. 263–272. doi: 10.1016/j.memsci.2004.06.029.
- Bylund, G. (2003). *Dairy Processing Handbook*. Tetrapak Processing Systems, Lund, Suecia.
- Bódalo-Santoyo, A., Gómez-Carrasco, J., Gómez-Gómez, E., Maximo-Martin, M., y Hidalgo-Montesinos, A. (2004). Spiral-wound membrane reverse osmosis and the treatment of industrial effluents. *Desalination*, 160(2):151–158. doi: 10.1016/S0011-9164(04)90005-7.
- Carevic, M., Vukasinovic-Sekulic, M., Grbavcic, S., Stojanovic, M., Mihailovic, M., Dimitrijevic, A., y Bezbradica, D. (2015). Optimization of beta-galactosidase production from lactic acid bacteria. *Hemijaska Industrija*, 69:305–312. doi: 10.2298/HEMIND140303044C.
- Castrillon, L. F. (2019). *Montaje y puesta a punto del evaporador de película descendente por recompresión térmica de vapor, para la planta de secado de suero y leche en la Cooperativa Colanta Sede San Pedro*. Universidad de Antioquia. Informe de práctica como requisito para optar al título de Ingeniero Mecánico.

- Castro, A., Rocha, I., Alves, M., y Pereira, M. (2016). *Rhodococcus opacus* b4: a promising bacterium for production of biofuels and biobased chemicals. *AMB Express*, 6. doi: 10.1186/s13568-016-0207-y.
- Cesare, M., Castillo, L., Beteta, V., Calle, J., y León, J. (2010). Evaluación de la purificación de biodiesel en la etapa final de producción. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 76:25–33.
- Chacón-Villalobos, A. (2006). Tecnologías de membranas en la agroindustria láctea. *Agronomía Mesoamericana*, 17(2):243–263. doi: 10.15517/am.v17i2.5164.
- Chamberland, J., Benoit, S., Doyen, A., y Pouliot, Y. (2015). Integrating reverse osmosis to reduce water and energy consumption in dairy processing: a predictive analysis for cheddar cheese manufacturing plants. *Drying Technology*, 33(2):176–184. doi: 10.1080/07373937.2014.942913.
- Científica Senna (2022). Buffer de lisis. *Científica Senna*. Consultado en: <https://www.cientificasenna.com/producto/buffers-para-lisis/>.
- Cinar, A., Parulekar, S., Undey, C., y Birol, G. (2003). *Batch Fermentation: Modeling, Monitoring and Control*. CRC Press.
- Coccaro, N., Ferrari, G., y Donsì, F. (2018). Understanding the break-up phenomena in an orifice-valve high pressure homogenizer using spherical bacterial cells (*Lactococcus lactis*) as a model disruption indicator. *Journal of Food Engineering*, 236:60–71. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2018.05.011.
- Cortés-Muñoz, M., Chevalier-Lucia, D., y Dumay, E. (2009). Characteristics of submicron emulsions prepared by ultra-high pressure homogenisation: effect of chilled or frozen storage. *Food Hydrocolloids*, 23:640–654. doi: 10.1016/j.foodhyd.2008.07.023.
- de Boer, K., Moheimani, N. R., Borowitzka, M. A., y Bahri, P. A. (2012). Extraction and conversion pathways for microalgae to biodiesel: a review focused on energy consumption. *Journal of Applied Phycology*, 24(6):1681–1698. doi:10.1007/s10811-012-9835-z.

- De Carvalho, J. C., Medeiros, A. B. P., Letti, L. A. J., Kirnev, P. C. S., y Soccol, C. R. (2017). Cell disruption and isolation of intracellular products. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, pp. 807–822. doi: 10.1016/B978-0-444-63662-1.00035-X.
- Dewani, P. y Jayaprakasha, H. (2004). Process optimization for production of peda from pre-concentrated milk by reverse osmosis and vacuum evaporation. *Elsevier Science*, 41(4):386–390. ISSN: 0022-1155.
- Donsì, F., Annunziata, M., y Ferrari, G. (2013). Microbial inactivation by high pressure homogenization: effect of the disruption valve geometry. *Journal of Food Engineering*, 115:362–370. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2012.10.046.
- Drévillon, L., Koubaa, M., Nicaud, J. M., y Vorobiev, E. (2019). Cell disruption pre-treatments towards an effective recovery of oil from *Yarrowia lipolytica* oleaginous yeast. *Biomass Bioenergy*, 128. doi: 10.1016/j.biombioe.2019. 105320.
- Farrar, S. (2018). Bacterias grampositivas. *News Medical Life Sciences*.
- Fei, Q., Wewetzer, S., Kurosawa, K., Rha, C., y Sinskey, A. (2015). High-cell-density cultivation of an engineered *Rhodococcus opacus* strain for lipid production via co-fermentation of glucose and xylose. *Process Biochemistry*, 50:500–506. doi: 10.1016/j.procbio.2015.01.008.
- Fellows, P. J. (2009). Pasteurisation. *Food Processing Technology*, pp. 381–395. doi:10.1533/9781845696344.3.381 .
- Folch, J., Lees, M., y Sloane-Stanley, G. (1957). A simple method for the isolation, purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226:497–505.
- Garbanzo, J. D., Moreira, E. G., y Rodríguez, J. R. (2015). *Diseño de un pasteurizador por lotes para la elaboración artesanal de quesos*. Universidad de Costa Rica. Trabajo final de graduación elaborado para optar por el título y grado de Licenciatura en Ingeniería Mecánica.

- Geciova, J., Bury, D., y Jelen, P. (2002). Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry - A review. *International Dairy Journal*, 12:541–553. doi: 10.1016/S0958-6946(02)00038-9.
- Goldberg, S. (2015). Mechanical/physical methods of cell distribution and tissue homogenization. *Proteomic Profiling*, pp. 1–20. doi: 10.1007/978-1-4939-2550-6\_1.
- Gomes, T. A., Zanette, C. M., y Spier, M. R. (2020). An overview of cell disruption methods for intracellular biomolecules recovery. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, pp. 1–20. doi: 10.1080/10826068.2020.1728696.
- González, V. (2018). *Estudio, caracterización y diseño de biorreactores para su incorporación en planta de abatimiento de arsénico y antimonio de ecometales*. Universidad de Chile. Memoria para optar por el título de Ingeniería Civil Química.
- Gourdon, M., Innings, F., Jongsama, A., y Vamling, L. (2015). Qualitative investigation of the flow behaviour during falling film evaporation of a dairy product. *Experimental Thermal and Fluid Science*, 60:9–19. doi:10.1016/j.expthermflusci.2014.07.017.
- Green, D. y Southard, M. (2019). *Perry's Chemical Engineers' Handbook*. McGraw-Hill Education, 9na edición.
- Günerken, E., D'Hondt, E., Eppink, M. H. M., Garcia-Gonzalez, L., Elst, K., y Wijffels, R. H. (2015). Cell disruption for microalgae biorefineries. *Biotechnology Advances*, 33:243–260. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.01.008.
- Hall, S. (2018). *Rules of Thumb for Chemical Engineers*. Elsevier.
- Harriott, P., McCabe, W. L., y Smith, J. C. (1991). *Operaciones unitarias en ingeniería química*. McGraw-Hill.
- Harrison, S. T. L. (2011). *Comprehensive Biotechnology*, volumen 128. Elsevier, Amsterdam.

- Hernandez, M. y Velez, J. (2014). Suero de leche y su aplicación en la elaboración de alimentos funcionales. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 8(2):13–22.
- James, B., Jing, Y., y Dong Cheng, X. (2003). Membrane fouling during filtration of milk: a microstructural study. *Journal of Food Engineering*, 60(4):431–437. doi: 10.1016/S0260-8774(03)00066-9.
- Jimenez, H. (2015). *Influencia del proceso de concentración por evaporación al vacío sobre la tensión superficial de leche y lactosuero*. Universidad de Córdoba. Tesis presentada como opción al Título Académico de Ingeniero de Alimentos.
- Jiménez, H. (2015). *Influencia del proceso de concentración por evaporación al vacío sobre la tensión superficial de leche y lactosuero*. Universidad de Córdoba.
- Kar, J. R. y Singhal, R. S. (2015). Investigations on ideal mode of cell disruption in extremely halophilic actinopolyspora halophila (MTCC 263) for efficient release of glycine betaine and trehalose. *Biotechnology Reports*, 5:89–97. doi: 10.1016/j.btre.2014.12.005.
- Kula, M. y Schüte, H. (1987). Purification of proteins and the disruption of microbial cells. *Biotechnology Progress*, 3:31–42. doi: 10.1002/btpr.5420030107.
- Kumar, S., Gupta, N., y Pakshirajan, K. (2015). Simultaneous lipid production and dairy wastewater treatment using rhodococcus opacus in a batch bioreactor for potential biodiesel application. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 3:1630–1636. doi: 10.1016/j.jece.2015.05.030.
- Kurosawa, K., Bocazzi, P., de Almeida, N., y Sinskey, A. (2010). High-cell-density batch fermentation of rhodococcus opacus pd630 using a high glucose concentration for triacylglycerol production. *Journal of Biotechnology*, 147(3):212–218. doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.04.003.
- Li, T., Chen, X., Chen, J., Wu, Q., y Chen, G. (2014). Open and continuous fermentation: products, conditions and bioprocess economy. *Biotechnology Journal*, 9:1503–1511. doi: 10.1002/biot.201400084.

- Lin, C. y Chen, M. (1990). Effect of concentrating milk by reverse osmosis. *Journal of the Chinese Agricultural Chemical Society*, 28(1):39–48.
- Liu, D., Zeng, X. A., Sun, D. W., y Han, Z. (2013). Disruption and protein release by ultrasonication of yeast cells. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 18:132–137. doi: 10.1016/j.ifset.2013.02.006.
- Malaeb, L. y Ayoub, G. (2011). Reverse osmosis technology for water treatment: state of the art review. *Desalination*, 267(1):1–8. doi: 10.1016/j.desal.2010.09.001.
- Middelberg, A. (2000). Microbial cell disruption by high-pressure homogenization. *Methods in Biotechnology*, pp. 11–21. doi: 10.1007/978-1-59259-027-8 .
- Middelberg, A. P. J. (1995). Process-scale disruption of microorganisms. *Biotechnology Advances*, 13:491–551. doi: 10.1016/0734-9750(95)02007-P.
- Montalescot, V., Rinaldi, T., Touchard, R., Jubeau, S., Frappart, M., Jaouen, P., Bourseau, P., y Marchal, L. (2015). Optimization of bead milling parameters for the cell disruption of microalgae: Process modeling and application to *Porphyridium cruentum* and *Nannochloropsis oculata*. *Bioresource Technology*, 196:339–346. doi: 10.1016/j.biortech. 2015.07.075.
- Morillo, A. (2018). *Evaluación de la operación de osmosis inversa para obtener fracciones aprovechables (permeado y retenido), a partir de suero lácteo*. Universidad de Costa Rica. Trabajo Final de Graduación para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos.
- Morison, K. R., Worth, Q. A. G., y O’Dea, N. P. (2006). Minimum wetting and distribution rates in falling film evaporators. *Food and Bioproducts Processing*, 84(4):302–310. doi: 10.1205/fbp06031.
- Murillo, A. (2011). *Automatización de dos lazos de control para el proceso evaporación de leche en una línea de producción de leche condensada*. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Trabajo final de graduación para optar por el título de Ingeniero en Electrónica con el grado académico de Licenciatura.

- OSD Consultoría Integral (2020). Objetivo del formulario d1. *OSD Consultoría Integral*. Consultado en: <https://osdconsultores.com/blog/formulario-d1-setena/>.
- OSVER Fluids Engineering (2013). Concentración de suero por nanofiltración y ósmosis inversa: Transformación de un residuo en un subproducto rentable. *OSVER Fluids Engineering*.
- Panda, T. (2011). *Bioreactors: Analysis and Design*. McGraw-Hill Education.
- Parra, R. (2009). Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. *Revista Facultad de Agronomía Medellín*, 62(1):4967–4982. ISSN 0304-2847.
- Peralta, G. H., Bergamini, C. V., y Hynes, E. R. (2019). Disruption treatments on two strains of *Streptococcus thermophilus*: Levels of lysis/permeabilization of the cultures, influence of treated cultures on the ripening profiles of cremoso cheese. *International Dairy Journal*, 92:11–20. doi: 10.1016/j.idairyj.2019.01.002.
- Peternel, S. (2013). Bacterial cell disruption: a crucial step in protein production. *New Biotechnology*, 30(2):250–254. doi: 10.1016/j.nbt.2011.09.005.
- Peters, M. S., Timmerhaus, K. D., y West, R. (2003). *Plant Design and Economics for Chemical Engineers*. McGraw-Hill, 5th edición.
- Postma, P. R., Suarez-Garcia, E., Safi, C., Yonathan, K., Olivieri, G., Barbosa, M. J., Wijffels, R. H., y Eppink, M. H. M. (2017). Energy efficient bead milling of microalgae: Effect of bead size on disintegration and release of proteins and carbohydrates. *Bioresource Technology*, 224:670–679. doi: 10.1016/j.biortech.2016.11.071.
- Radjenović, J., Petrović, M., Ventura, F., y Barceló, D. (2008). Rejection of Pharmaceuticals in Nanofiltration and Reverse Osmosis Membrane Drinking Water Treatment. *Water Research*, 42(14):3601–3610. doi: 10.1016/j.watres.2008.05.020.
- Rahman, S. (2007). *Handbook of food preservation*. CRC Press.

- Ramirez, C., Patel, M., y Blok, K. (2006). From fluid milk to milk powder: Energy use and energy efficiency in the european dairy industry. *Energy*, 31(12):1984–2004. doi: 10.1016/j.energy.2005.10.014.
- Ravikumar, Y., Kalyani, S., Satyanarayana, S., y Sridhar, S. (2014). Processing of pharmaceutical effluent condensate by nanofiltration and reverse osmosis membrane techniques. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 45(1):50–56. doi: 10.1016/j.jtice.2013.09.021.
- Reategui, W. y Salas, F. (2013). Estudio del proceso de transesterificación para la obtención de biodiesel a partir del aceite de palma en un reactor por lotes. *Producción + Limpia*, 8:119–134.
- Ren, X., Yu, D., Yu, L., Gao, G., Han, S., y Feng, Y. A. (2007). Study of cell disruption to release recombinant thermostable enzyme from *Escherichia coli* by thermolysis. *Biotechnology Journal*, 129:668–673. doi: 10.1016/j.jbiotec.2007.01.038.
- Robinson, R. K. (1993). *Modern Dairy Technology*, volumen 2. Elsevier, London.
- Saisriyoot, M., Sahaya, T., Thanapimmetha, A., Chisti, Y., y Srinophakun, P. (2016). Production of potential fuel oils by rhodococcus opacus grown on petroleum processing wastewaters. *Journal of Renewable and Sustainable Energy*, 8. doi: 10.1063/1.4971875.
- Saisriyoot, M., Thanapimmetha, A., Suwaleerat, T., y Chisti, Y. (2019). Biomass and lipid production by rhodococcus opacus pd630 in molasses-based media with and without osmotic-stress. *Journal of Biotechnology*, 297:1–8. doi: 10.1016/j.jbiotec.2019.02.012.
- Salvagnini, W. M. y Taqueda, M. E. S. (2004). A falling-film evaporator with film promoters. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 43:6832–6835. doi:10.1021/ie0307636.
- Sanchez, A. (2015). *Gestión de las aguas residuales de queseras artesanales utilizando producción más limpia y tratamiento anaerobio con RAFA-FAFA. El caso*

de Santa Cruz de Turrialba, Costa Rica. Tecnológico de Costa Rica. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Ambiental.

Sanz, V. (2017). *Diseño de un fermentador para la obtención de biomoléculas*. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial de Barcelona. Trabajo final de graduación para optar por el grado de Ingeniería en Tecnologías Industriales.

Sapag, N. y Sapag, R. (2008). *Preparación y evaluación de proyectos*. McGraw-Hill, 5th edición.

Save, S. S., Pandit, A. B., y Joshi, J. B. (1994). Microbial cell disruption: role of cavitation. *The Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal*, 55:67–72. doi:10.1016/0923-0467(94)06062-2.

Schuck, P., Jeantet, R., Tanguy, G., Méjean, S., Gac, A., Lefebvre, T., Labussière, E., y Maritneau, C. (2015). Energy consumption in the processing of dairy and feed powders by evaporation and drying. *Drying Technology*, 33(2):176–184. doi:10.1080/07373937.2014.942913.

Secretaría Técnica Nacional Ambiental (2020). D1. *SETENA*. Consultado en: <https://www.setena.go.cr/es/Catalogo/d1>.

Slater, C. y Hollein, H. (1993). Educational initiatives in teaching membrane technology. *Elsevier Science*, 90(1-3):291–302. doi: 10.1016/0011-9164(93)80182-m.

Solanki, G. y Rizvi, S. (2001). Physico-chemical properties of skim milk retentates from microfiltration. *Journal of Dairy Science*, 84(11):2381–2391. doi:10.3168/jds.S0022-0302(01)74687-5.

Spiden, E., Scales, P., Kentish, S., y Martin, G. (2013). Critical analysis of quantitative indicators of cell disruption applied to *saccharomyces cerevisiae* processed with an industrial high pressure homogenizer. *Biochemical Engineering Journal*, 70:120–126. doi: 10.1016/j.bej.2012.10.008.

Sun, A., Reindl, D., y Reinemann, D. (2011). *Energy use in Wisconsin's dairy industry and options for improved energy efficiency*. University of Wisconsin.

- Tanaka, T. (2015). *Improving and tailoring enzymes for food quality and functionality*. Elsevier, Cambridge.
- Tangtua, J. (2014). Evaluation and comparison of microbial cells disruption methods for extraction of pyruvate decarboxylase. *International Food Research Journal*, 21:1331–1336.
- Tanguler, H. y Erten, H. (2008). Utilization of Spent Brewer's yeast extract production by autolysis: The effect of temperature. *Food and Bioproducts Processing*, 86:317–321. doi: 10.1016/j.fbp.2007.10.015.
- Tanguy, G., Dolivet, A., Garnier-Lambrouin, F., Méjean, S., Coffey, D., Birks, T., Jeantet, R., y Schuck, P. (2015). Concentration of dairy products using a thin film spinning cone evaporator. *Journal of Food Engineering*, 166:356–363. doi:10.1016/j.jfoodeng.2015.07.001.
- Tejeda, A., Montesinos, R. M., y Guzmán, R. (2011). *Bioseparaciones*. Pearson Educación, Universidad de Sonora, 2da edición.
- Theodore, L. (2014). *Chemical Engineering: The Essential Reference*. McGraw-Hill Education.
- Tong, P., Barbano, D., y Rudan, M. (1988). Characterization of proteinaceous membrane foulants and flux decline during the early stages of whole milk ultrafiltration. *Journal of Dairy Science*, 71(3):604–612. doi: 10.3168/jds.s0022-0302(88)79597-1.
- Ustun-Aytekin, O., Arisoy, S., Aytekin, A. O., y Yildiz, E. (2016). Statistical optimization of cell disruption techniques for releasing intracellular X-Prolyl Dipeptidyl Aminopeptidase from *Lactococcus lactis*. *Ultrasonics Sonochemistry Journal*, 29:163–171. doi: 10.1016/j.ultsonch.2015.09.010.
- Valerio, M. (2020). Consumo de leche se ha mantenido constante en los ticos durante tiempos de covid-19. *SINART Costa Rica Medios*.
- Verbelen, P., De Schutter, D., y Delvaux, F. (2006). Immobilized yeast cells systems for continuous fermentation applications. *Biotechnology Letters*, 28(19):1515–1525. doi: 10.1007/s10529-006-9132-5.

- Voss, I. y Steinbüchel, A. (2001). High cell density cultivation of *rhodococcus opacus* for lipid production at a pilot-plant scale. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55:547–555. doi: 10.1007/s002530000576.
- Viquez, D. (2016). Aprovechamiento de sueros. En *22ndo Congreso Nacional de Lácteos*. Costa Rica.
- Wang, Y., Ling, C., Chen, Y., Jiang, X., y Chen, G. Q. (2019). Microbial engineering for easy downstream processing. *Biotechnology Advances*, 37(6). doi: 10.1016/j.biotechadv.2019.03.004.
- Wastergaard, V. (2004). Milk powder technology evaporation and spray-drying. *GEA Process Engineering*.
- Williams, J. (2002). Keys to bioreactor selections. *Chemical Engineering Progress*, 98(3):34–41. ISSN 0360-7275.
- Wuytack, E., Diels, A., y Michiels, C. (2002). Bacterial inactivation by high-pressure homogenisation and high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology*, 77:205–212. doi: 10.1016/S0168-1605(02)00054-5.
- Yang, Y. y Sha, M. (2020). A beginner's guide to bioprocess modes - batch, fed batch and continous fermentation. *Eppendorf Inc. Application Note 408*.
- Yu, X., Dong, T., Zheng, Y., Miao, C., y Chen, S. (2014). Investigation of cell disruption methods for lipid extraction from oleaginous microorganisms. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117(5):730–737. doi: 10.1002/ejlt.201400195.
- Zheng, Y., Xiao, R., y Roberts, M. (2016). Polymer-enhanced enzymatic microalgal cell disruption for lipid and sugar recovery. *Algal Research*, 14:100–108. doi: 10.1016/j.algal.2016.01.010.

# APÉNDICES

## A Resultados

**Cuadro A.1.** Resultados del balance de masa del evaporador correspondiente al Escenario A.

Corriente	Flujo másico, $F/(kg/h)$	Tipo
Suero láctico	1 866,96	Entrada
Concentrado	553,86	Salida
Agua evaporada	1 313,09	Salida
Vapor	1 332,58	Entrada

**Cuadro A.2.** Balance de masa para un biorreactor durante los 3 días de operación correspondiente al Escenario A.

Corriente	Volumen, $V/(L)$	Masa, $m/(kg)$
	<b>Entrada</b>	
Suero	20025	19 939,09
Nutrientes	29,76	65,28
Sulfato de amonio	19,80	35,04
	<b>Salida</b>	
Biomasa	-	907,17
Medio de cultivo	-	20039,42

**Cuadro A.3.** Balances de masa de la microfiltración empleada para la cosecha celular en el Escenario A.

Corriente	Flujo, $F/(kg/h)$		
	Entrada	Salida	
		Permeado	Retenido
Biomasa	37,80	0,189	37,61
Medio de cultivo	834,96	834,14	0,835

**Cuadro A.4.** Flujo de entrada y de salida del homogenizador del Escenario A.

<b>Corriente</b>	<b>Flujo, <math>F</math>/(kg/h)</b>
Biomasa entrante	37,61
Medio de cultivo entrante	0,835
Buffer entrante	3,84
Lípidos salientes	16,81

**Cuadro A.5.** Resultados del balance de masa de la microfiltración de la etapa de purificación del Escenario A.

<b>Corriente</b>	<b>Flujo, (kg/h)</b>		
	<b>Entrada</b>	<b>Salida</b>	
		Permeado	Retenido
Biomasa	20,80	0,104	20,69
Lípidos	16,8	16,79	0,0168
Medio de cultivo	0,835	0,834	0,000835
Buffer	3,844	3,84	0,00384

**Cuadro A.6.** Resultados del balance de masa de la ultrafiltración de la etapa de purificación del Escenario A.

<b>Corriente</b>	<b>Flujo, (kg/h)</b>		
	<b>Entrada</b>	<b>Salida</b>	
		Permeado	Retenido
Biomasa	0,104	0,00052	0,103
Lípidos	16,79	0,0168	16,77
Medio de cultivo	0,833	0,833	0,00083
Buffer	3,84	3,84	0,00384

**Cuadro A.7.** Flujos de entrada de TAGs y alcohol etílico y flujo de biodiesel de salida correspondientes al reactor en donde se lleva a cabo el proceso de transesterificación para el Escenario A.

<b>Corriente</b>	<b>Flujo, <math>F</math>/(kg/h)</b>
TAGs	16,77
Alcohol etílico	46,38
Biodiesel	147,08

**Cuadro A.8.** Resultados del balance de masa para el Escenario B en el año 1 de producción.

<b>Componente</b>	<b>Flujo entrada, (kg/h)</b>	<b>Flujo salida, (kg/h)</b>
<b>Etapa de concentración</b>		
Suero	1348,87	1348,87
Lactosa	60,28	176,11
<b>Etapa de biorreacción</b>		
Suero	674,44	NA
Nutrientes	2,21	NA
Amonio	3,56	NA
Biomasa	NA	30,68
Medio de cultivo	NA	677,83
<b>Microfiltración</b>		
Biomasa	92,06	91,59
Medio de cultivo	2033,49	2,03
<b>Homogenizador</b>		
Biomasa	91,59	50,65
Medio de cultivo	2,03	2,03
Buffer	9,36	9,36
Lípidos	NA	40,94
<b>Microfiltración</b>		
Biomasa	50,65	0,25
Lípidos	40,94	40,90
Medio de cultivo	2,033	2,031
Buffer	9,36	9,35
<b>Ultrafiltración</b>		
Biomasa	0,25	0,25
Lípidos	40,90	40,86
Medio de cultivo	2,03	0,00203
Buffer	9,35	6,86
<b>Producción de biodiesel</b>		
TAGs	40,86	NA
Alcohol etílico	112,95	NA
Biodiesel	NA	358,19

**Cuadro A.9.** Resultados del balance de masa para el Escenario B en el año 2 de producción.

<b>Componente</b>	<b>Flujo entrada, (kg/h)</b>	<b>Flujo salida, (kg/h)</b>
<b>Etapa de concentración</b>		
Suero	1586,91	1586,91
Lactosa	70,92	207,19
<b>Etapa de biorreacción</b>		
Suero	793,46	NA
Nutrientes	2,60	NA
Amonio	4,18	NA
Biomasa	NA	36,1
Medio de cultivo	NA	797,45
<b>Microfiltración</b>		
Biomasa	108,30	107,76
Medio de cultivo	2392,35	2,39
<b>Homogenizador</b>		
Biomasa	107,76	59,59
Medio de cultivo	2,39	2,39
Buffer	11,01	11,01
Lípidos	NA	48,17
<b>Microfiltración</b>		
Biomasa	59,59	0,297
Lípidos	48,17	48,11
Medio de cultivo	2,39	2,38
Buffer	11,01	11,00
<b>Ultrafiltración</b>		
Biomasa	0,297	0,296
Lípidos	48,11	48,07
Medio de cultivo	2,39	0,00239
Buffer	11,00	7,56
<b>Producción de biodiesel</b>		
TAGs	48,07	NA
Alcohol etílico	132,88	NA
Biodiesel	NA	421,39

**Cuadro A.10.** Resultados del balance de masa para el Escenario B en el año 3 de producción.

<b>Componente</b>	<b>Flujo entrada, (kg/h)</b>	<b>Flujo salida, (kg/h)</b>
<b>Etapa de concentración</b>		
Suero	1866,96	1866,96
Lactosa	83,44	243,75
<b>Etapa de biorreacción</b>		
Suero	933,48	NA
Nutrientes	3,06	NA
Amonio	4,92	NA
Biomasa	NA	42,47
Medio de cultivo	NA	938,175
<b>Microfiltración</b>		
Biomasa	127,41	126,77
Medio de cultivo	2814,52	2,81
<b>Homogenizador</b>		
Biomasa	126,77	70,11
Medio de cultivo	2,81	2,81
Buffer	12,96	12,96
Lípidos	NA	56,66
<b>Microfiltración</b>		
Biomasa	70,11	0,35
Lípidos	56,67	56,61
Medio de cultivo	2,814	2,811
Buffer	12,95	12,95
<b>Ultrafiltración</b>		
Biomasa	0,35	0,25
Lípidos	56,61	56,55
Medio de cultivo	2,81	0,0028
Buffer	12,94	0,013
<b>Producción de biodiesel</b>		
TAGs	56,55	NA
Alcohol etílico	156,33	NA
Biodiesel	NA	495,76

**Cuadro A.11.** Resumen de la estimación de la mano de obra (MO) requerida para el debido funcionamiento de la planta.

<b>Equipo</b>	<b>Cantidad de equipos</b>	<b>MO por un equipo</b>	<b>MO total</b>
Evaporador	1	0,25	0,25
Biorreactor	3	1	3
Homogenizador	1	0,15	0,15
Microfiltración	2	0,1875	0,375
Ultrafiltración	1	0,1875	0,1875
Tanque de almacenamiento	4	0,35	1,4
Ingenieros	NA	NA	2
Limpieza	NA	NA	2
Otros	NA	NA	2
Total	NA	NA	11,36

**Cuadro A.12.** Resumen de ingresos para los años 1, 2 y 3 para ambos escenarios.

<b>Año</b>	<b>Escenario A, (CRC)</b>	<b>Escenario A, (USD)</b>	<b>Escenario B, (CRC)</b>	<b>Escenario B, (USD)</b>
1	738 664 938	1 176 218	1 399 575 672	2 228 623
2	738 664 938	1 176 218	1 982 732 202	3 157 216
3	738 664 938	1 176 218	2 565 888 732	4 085 810

**Cuadro A.13.** Resumen de inversión y depreciación anual para el escenario A.

<b>Equipo</b>	<b>Volumen, (<math>m^3</math>)</b>	<b>Costo unitario, (USD)</b>	<b>Costo envío, (CRC)</b>	<b>Costo total, (USD)</b>	<b>Deprecia- ción, (USD)</b>
Evaporador	0,47	60 000	24 000	84 000	5 880
Intercambiador	0,56	500	200	700	70
2 tanques agitados	3,35	2 200	880	6 160	431,2
3 biorreac- tores	24,1	20 000	8 000	84 000	8 400
Microfiltración	2,11	10 750	4 300	15 050	1 053,5
Homogenizador	0,043	8 800	3 520	12 320	862,4
Tanque agitado	0,071	2 200	880	3 080	215,6
Intercambiador	0,045	500	200	700	70
Microfiltración	0,075	10 750	4 300	15 050	1 053,5
Ultrafiltración	1,82	5 375	2 150	7 525	526,75
Reactor	0,17	10 000	4 000	14 000	1 400
Decantación	0,17	30 000	12 000	42 000	2 940

**Cuadro A.14.** Resumen de inversión y depreciación anual para el escenario B.

<b>Equipo</b>	<b>Volumen, (<math>m^3</math>)</b>	<b>Costo unitario, (USD)</b>	<b>Costo envío, (CRC)</b>	<b>Costo total, (USD)</b>	<b>Deprecia- ción, (USD)</b>
2 tanques agitados	11,3	2200	880	6160	431,2
3 biorreac- tores	81,2	20160	8064	84672	8467,2
Microfiltración	7,09	10750	4300	15050	1053,5
Homogenizador	0,14	8800	3520	12320	862,4
Tanque agitado	0,237	2200	880	3080	215,6
Intercambiador	0,14255	500	200	700	70
Microfiltración	0,252	10750	4300	15050	1053,5
Ultrafiltración	6,11	5375	2150	7525	526,75
Reactor	0,552	10000	4000	14000	1400
Decantación	0,552	30000	12000	42000	2940

**Cuadro A.15.** Desglose del balance de gastos preoperativos.

<b>Rubro</b>	<b>Monto, (USD)</b>
MRO's	10 732,79
Software	185,11
Inscripción CCSS	0
Licencia de operación	15,92
Permisos funcionamiento	100
Inscripción contribuyente	0
Capacitaciones	2 181,53
Prueba piloto	110 732,79
Sueldos previos	18 332,01

**Cuadro A.16.** Desglose de costos de materiales auxiliares.

<b>Rubro</b>	<b>Requerimiento mensual</b>	<b>Precio unitario, (USD)</b>	<b>Precio anual, (USD)</b>	<b>Proveedor</b>
Soda cáustica, (kg)	1200	0,0125	252	Tiandeli Co. LTD
Ácido nítrico, (kg)	1200	0,0175	352,8	Jinzhou City Jinchang- sheng Chemical
Detergente no iónico, (kg)	1200	2	40320	Bluwat Chemicals
Desinfectante, (L)	40	3,98	477,71	Walmart
Bolsas basura	100	0,93	462,42	Walmart
Rollos papel toalla	1,18	3,54	636,31	Walmart
Resmas de papel	3	3,17	114,08	OfficeDepot
Lapiceros	10	0,21	25,41	OfficeDepot
Marcadores	10	0,62	74,52	OfficeDepot
Caja de grapap	3	0,70	25,22	OfficeDepot
Tinta impresora	2	7,95	190,70	OfficeDepot

**Cuadro A.17.** Desglose de cargas sociales aplicadas a la estimación de salarios.

<b>Carga</b>	<b>Porcentaje</b>
CCSS	14,50
Recaudación otras instituciones	7,25
Ley de Protección al Trabajador	4,75
Prestaciones laborales	5,33
Preaviso	8,33
Riesgos laborales	2,00
Aguinaldo	8,33
Vacaciones	4,17
<b>Total</b>	<b>54,66</b>

**Cuadro A.18.** Desglose de estimación de salarios para el personal.

<b>Personal</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Horas al mes</b>	<b>Salario anual, (USD)</b>
Lic. en ingeniería	2	160	40 488,30
Limpieza	2	80	6 916,58
Lic. en administración	1	160	13 160,72
Mercadeo	5	80	27 330,11

**Cuadro A.19.** Desglose de estimación de salarios para los operarios.

<b>Escenario</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Horas al mes</b>	<b>Salario anual, (USD)</b>
A	6	160	63 835,57
B	5	160	53 196,31

**Cuadro A.20.** Desglose de costos por concepto de servicios.

<b>Servicio</b>	<b>Requerimiento al mes</b>	<b>Costo unitario</b>	<b>Total anual, (USD)</b>	<b>Referencia</b>
Vapor, (kg)	108,35	24,1	30 679,72	Mediante estimación
Agua enfriamiento, (m <sup>3</sup> )	70	3,12	2 620,32	AyA
Electricidad, (kWh)	47 736	0,10	54 455,53	Grupo ICE

**Cuadro A.21.** Desglose del balance de gastos operativos.

<b>Gasto</b>	<b>Monto, (CRC)</b>	<b>Monto, (USD)</b>
Mantenimiento	5 648 370,61	8 994,22
Personal	29 771 858	47 407,42
Servicios básicos	94 032	149,73
Costes de laboratorio	11 039 702	17 579,14
Supervisión	12 713 326	20 244,15
Dirección de planta	12 713 32	20 244,15
Cargas de capital	11 296 741,22	17 988,44
Seguros	753 116,08	1 199,23
Impuestos	1 506 232,16	2 398,46
Regalías	753 116,08	1 199,23
<b>TOTAL</b>	<b>86 289 820</b>	<b>119 922,94</b>

**Cuadro A.22.** Desglose de costos por concepto de materia prima para el escenario A.

<b>Materia</b>	<b>Requerimiento, (kg/mes)</b>	<b>Costo, (USD/kg)</b>	<b>Total anual, (USD)</b>
Sulfato magnesio	600,75	0,7	7 064,82
Sulfato de amonio	3 153,94	0,16	8 477,784
Cloruro de calcio	1 291,61	0,135	2 929,38
Suero láctico	NA	NA	NA
Alcohol etílico	18 468	1	221 616

**Cuadro A.23.** Costos por concepto de materia prima para el Escenario B.

<b>Materia</b>	<b>Requerimiento,</b> (kg/mes)	<b>Costo,</b> (USD/kg)	<b>Total anual,</b> (USD)
<b>Año 1</b>			
Sulfato de magnesio	1 463,04	0,7	19 315,49
Sulfato de amonio	7 681,5	0,16	15 553,35
Cloruro de calcio	3 145,5	0,135	20 194,76
Suero láctico	NA	NA	NA
Alcohol etílico	44 971,2	1	755 516,16
Lactosa	43 404	1,5	1 093 780,8
<b>Año 2</b>			
Sulfato de magnesio	1 721,25	0,7	20 241,9
Sulfato de amonio	9 036,9	0,16	24 291,19
Cloruro de calcio	3 700,8	0,135	8 393,41
Suero láctico	NA	NA	NA
Alcohol etílico	52 905,6	1	888 814,08
Lactosa	51 067,5	1,5	1 286 901
<b>Año 3</b>			
Sulfato de magnesio	2 025	0,7	23 814
Sulfato de amonio	10 631,25	0,16	28 576,8
Cloruro de calcio	4 353,75	0,135	9 874,31
Suero láctico	NA	NA	NA
Alcohol etílico	62 244	1	1 045 699,2
Lactosa	60 075	1,5	1 513 890

**Cuadro A.24.** Desglose del balance de costos para los Escenarios A y B.

<b>Costo anual</b>	<b>Monto, (CRC)</b>	<b>Monto, (USD)</b>
<b>ESCENARIO A</b>		
<b>Año 1</b>		
Mano de obra	40 088 736	63 835,57
Servicios	55 110 491,88	87 755,56
Materias primas	150 775 252,2	240 087,98
Alquiler de planta	3 381 830,24	5 385,08
<b>TOTAL</b>	<b>249 356 310,3</b>	<b>397 064,19</b>
<b>Año 2</b>		
Mano de obra	41 411 664	65 942,14
Servicios	56 929 138	90 651, 49
Materias primas	155 750 835	248 010, 88
Alquiler de planta	3 493 431	5 562,79
<b>TOTAL</b>	<b>257 585 069</b>	<b>410 167</b>
<b>Año 3</b>		
Mano de obra	42 778 249,21	68 118,23
Servicios	58 807 799,67	93 642,99
Materias primas	160 890 613,05	256 195,24
Alquiler de planta	3 608 713,85	5 746,36
<b>TOTAL</b>	<b>266 085 375,79</b>	<b>423 702,83</b>
<b>ESCENARIO B</b>		
<b>Año 1</b>		
Mano de obra	33 407 280	53 196,31
Servicios	23 551 588,8	37 502,53
Materias primas	1 459 767 008	1 904 360,56
Alquiler de planta	3 381 830,24	7 347,88
<b>TOTAL</b>	<b>1 520 107 707</b>	<b>2 002 407,27</b>
<b>Año 2</b>		
Mano de obra	34 509 720,24	54 951, 78
Servicios	24 328 791,23	38 740,11
Materias primas	1 593 026 493,42	2 228 641,58
Alquiler de planta	3 493 430,64	7 590,36
<b>TOTAL</b>	<b>1 655 358 435,53</b>	<b>2 403 469,01</b>
<b>Año 3</b>		
Mano de obra	35 648 541,01	56 764,19
Servicios	25 131 641,34	40 018,54
Materias primas	1 700 859 812,16	2 708 375,50
Alquiler de planta	3 608 713,85	7 840,84
<b>TOTAL</b>	<b>1 765 248 708,35</b>	<b>2 813 000,07</b>

**Cuadro A.25.** Capital de trabajo para el Escenario A y para el Escenario B en los años 1, 2 y 3.

<b>Escenario</b>	<b>Monto, (USD)</b>
A año 1	641 749,69
A año 2	628 646,57
A año 3	615 111,054
B año 1	88 812,23
B año 2	616 343,6986
B año 3	1 135 405,84

**Cuadro A.26.** Resumen del flujo neto de efectivo para el Escenario A.

<b>Rubro</b>	<b>Año 0, (USD)</b>	<b>Año 1, (USD)</b>	<b>Año 2, (USD)</b>	<b>Año 3, (USD)</b>
Ingresos		1 176 218,05	1 176 218,05	1 176 218,05
Costos		397 064,19	410 167,31	423 702,83
Utilidad bruta		779 153,87	766 050,75	752 515,23
Gastos operativos		137 404,17	137 404,17	137 404,17
Gastos por depreciación		17 637,59	17 637,59	17 637,59
Gasto por intereses		0	0	0
Utilidad antes de impuesto		624 112,11	611 008,99	597 473,47
Impuesto (30%)		187 233,63	183 302,70	179 242,04
Utilidad después de impuestos		436 878,47	427 706,29	418 231,43
Gasto por depreciación		17 637,59	17 637,59	17 637,59
Financiamiento				
Amortización				
Inversión (año 0)	204 612,11			
Gastos preoperativos (año 0)	147 114,57			
Capital de trabajo (año 0)	641 749			
FNE	-351 726,68	454 516,06	445 343,88	435 869,01
Costo de capital	0.06			
VAN (USD)	839 380,55			
TIR (%)	115			

**Cuadro A.27.** Resumen del flujo neto de efectivo para el Escenario B.

Rubro	Año 0, (USD)	Año 1, (USD)	Año 2, (USD)	Año 3, (USD)
Ingresos		2 661 967	3 590 560	4 519 153
Costos		2 002 407	2 403 469,01	2 813 000,07
Utilidad bruta		659 559	1 187 091,36	1 706 153,51
Gastos operativos		137 404,17	137 404,17	137 404,17
Gastos por depreciación		17 634	17 634	17 634
Gasto por intereses		0	0	0
Utilidad antes de impuesto		504 520,94	1 032 052,41	1 551 114,55
Impuesto (30%)		151 356,28	309 615,72	465 335,36
Utilidad post impuestos		353 164,66	722 436,68	1 085 780,18
Gasto por depreciación		17 634	17 634	17 634
Financiamiento				
Amortización				
Inversión	204 584			
Gastos preoperativos	147 114,57			
Capital de trabajo	88 812,24			
FNE	-351 698,68	67 459	436 731,03	764 804,95
Costo de capital	0,06			
VAN (USD)	742 775,93			
TIR (%)	69			

## B Muestra de cálculo

### C.1. Balances de masa y energía del evaporador

El balance de masa global del equipo se expresa mediante la siguiente ecuación:

$$m_F = m_A + m_C \quad (\text{C.1})$$

Utilizando los valores del Cuadro [A.1](#) fila 2, columna 2:

$$m_F = 1867 \text{ kg/h} = m_A + m_C$$

El balance de sólidos del evaporador se define mediante los porcentajes de sólidos (lactosa) que se muestran en el Cuadro [2.5](#) columnas 2 y 3, filas 2, 3, 4 y 5 y el requisito de obtener una concentración del 15% establecido por la empresa. La expresión para dicho balance se muestra a continuación y los resultados se tabulan en el Cuadro [A.1](#) columna 2, filas 2, 3, 4 y 5:

$$m_F \cdot 0,0445 = m_C \cdot 0,15 \quad (\text{C.2})$$

El balance de energía se realizó mediante la siguiente ecuación:

$$Q = U \cdot A \cdot \Delta T = m_s \cdot \lambda_s \quad (\text{C.3})$$

La ecuación se resolvió utilizando los valores que se expresan en el Cuadro [2.2](#) columna 2, filas 1, 2, 5 y 6:

$$Q = 1469,99 \cdot 2201,96 = m_s \cdot \lambda_s = 899,127 \text{ kW} \quad (\text{C.4})$$

$$899,127 \text{ kW} = 1750 \cdot A \cdot (82 - 69)^\circ\text{C} \quad (\text{C.5})$$

### C.2. Balances de masa de un biorreactor

El balance de masa para la corriente de entrada de un biorreactor es:

$$m_F = m_{Sueros} + m_{Nutrientes} + m_{Amonio} \quad (C.6)$$

Según lo especificado por la empresa respecto a la composición del medio de cultivo en el Cuadro 2.6 columna 2 y filas 2, 3, 4, 5 y 6 y considerando la alimentación a lo largo de los 3 días de operación del equipo que se muestra en el Cuadro 2.7 columnas 2 y 3, filas 3, 4, 5, 7 y 8:

$$m_F = 19939,09 \text{ kg} + 65,28 \text{ kg} + 35,04 \text{ kg} \quad (C.7)$$

De esta manera, el flujo de entrada total (para el acumulado de los 3 días de operación) es:

$$m_F = 20039,42 \text{ kg} \quad (C.8)$$

Esta estimación aplica para cada uno de los biorreactores. Adicionalmente, se presenta la estimación del flujo de salida para un biorreactor:

$$m_S = m_{Biomasa} + m_{Caldo} \quad (C.9)$$

Tal como se muestra en el Cuadro 2.7 columna 3, filas 7 y 8, esta suma corresponde a los siguientes valores:

$$m_S = 907,17 \text{ kg} + 20039,42 \text{ kg} \quad (C.10)$$

Por lo tanto, el flujo total de salida al día es:

$$m_S = 20946,59 \text{ kg} \quad (C.11)$$

De la biomasa obtenida (907,17 kg) 44,7% son lípidos, de manera en el total de lípidos se estima mediante la siguiente ecuación:

$$m_S = 907,17 \text{ kg} \cdot 0,447 \quad (C.12)$$

Por lo tanto, en la etapa de biorreacción se obtiene un total diario de:

$$m_S = 907,17 \text{ kg} \cdot 0,447 \quad (\text{C.13})$$

### C.3. Balances de masa para la primera microfiltración

El balance de masa para la cosecha celular realizada mediante microfiltración es:

$$m_F = m_{Biomasa} + m_{Caldo} \quad (\text{C.14})$$

$$m_F = 907,17 \text{ kg/día} + 20039,42 \text{ kg/día} \quad (\text{C.15})$$

$$m_F = 20946,59 \text{ kg/día} \quad (\text{C.16})$$

$$m_{Retenido} = m_{Biomasa} + m_{Caldo} \quad (\text{C.17})$$

$$m_{Retenido} = 902,64 \text{ kg/día} + 20,039 \text{ kg/día} \quad (\text{C.18})$$

$$m_{Retenido} = 922,68 \text{ kg/día} \quad (\text{C.19})$$

Considerando los mismos porcentajes, el balance para el permeado es:

$$m_{Permeado} = m_{Biomasa} + m_{Caldo} \quad (\text{C.20})$$

$$m_{Permeado} = 4,53 \text{ kg/día} + 20019,38 \text{ kg/día} \quad (\text{C.21})$$

$$m_{Permeado} = 20023,91 \text{ kg/día} \quad (\text{C.22})$$

Estos resultados se encuentran tabulados en el Cuadro 2.8 columnas 2, 3 y 4, filas 4 y 5.

#### C.4. Balances de masa para el homogenizador

El balance de masa para el flujo de entrada al homogenizador se expresa mediante la siguiente ecuación:

$$m_F = m_{Biomasa} + m_{Caldo} + m_{Buffer} \quad (C.23)$$

El flujo del buffer corresponde a un 10% del flujo total. De esta manera, el balance de masa es:

$$m_F = 902,64 \text{ kg/día} + 20,04 \text{ kg/día} + 92,27 \text{ kg/día} \quad (C.24)$$

$$m_F = 1014,94 \text{ kg/día} \quad (C.25)$$

$$m_F = m_{Biomasa} + m_{Caldo} + m_{Buffer} + m_{Lpidos} \quad (C.26)$$

$$m_F = 499,16 \text{ kg/día} + 20,04 \text{ kg/día} + 92,27 \text{ kg/día} + 403,48 \text{ kg/día} \quad (C.27)$$

$$m_F = 1014,94 \text{ kg/día} \quad (C.28)$$

Estos resultados se encuentran tabulados en el Cuadro [2.12](#) columna 2, filas 2, 3, 4 y 5.

#### C.5. Balances de masa para la segunda microfiltración

El balance de masa para la microfiltración posterior a la disrupción celular es:

$$m_F = m_{Biomasa} + m_{Caldo} + m_{Lpidos} + m_{Buffer} \quad (C.29)$$

$$m_F = 499,16 \text{ kg/día} + 20,04 \text{ kg/día} + 403,48 \text{ kg/día} + 92,3 \text{ kg/día} \quad (C.30)$$

$$m_F = 1014,9 \text{ kg/día} \quad (\text{C.31})$$

$$m_{\text{Retenido}} = m_{\text{Biomasa}} + m_{\text{Caldo}} \quad (\text{C.32})$$

$$m_{\text{Retenido}} = 496,66 \text{ kg/día} + 0,02 \text{ kg/día} \quad (\text{C.33})$$

$$m_{\text{Retenido}} = 496,68 \text{ kg/día} \quad (\text{C.34})$$

Considerando los mismos porcentajes, el balance para el permeado es:

$$m_{\text{Permeado}} = m_{\text{Biomasa}} + m_{\text{Caldo}} \quad (\text{C.35})$$

$$m_{\text{Permeado}} = 2,5 \text{ kg/día} + 20,02 \text{ kg/día} \quad (\text{C.36})$$

$$m_{\text{Permeado}} = 22,52 \text{ kg/día} \quad (\text{C.37})$$

Estos resultados se encuentran tabulados en el Cuadro [2.13](#) columnas 2, 3 y 4, filas 4, 5, 6 y 7.

### C.6. Balances de masa para la ultrafiltración

El balance de masa para la etapa de ultrafiltración es:

$$m_F = m_{\text{Biomasa}} + m_{\text{Caldo}} + m_{\text{Lpidos}} + m_{\text{Buffer}} \quad (\text{C.38})$$

$$m_F = 2,49 \text{ kg/día} + 20,02 \text{ kg/día} + 403,07 \text{ kg/día} + 92,17 \text{ kg/día} \quad (\text{C.39})$$

$$m_F = 517,76 \text{ kg/día} \quad (\text{C.40})$$

$$m_{Retenido} = m_{Biomasa} + m_{Caldo} + m_{Lpidos} + m_{Buffer} \quad (C.41)$$

$$m_{Retenido} = 2,48 \text{ kg/día} + 0,02 \text{ kg/día} + 402,67 \text{ kg/día} + 0,092 \text{ kg/día} \quad (C.42)$$

$$m_{Retenido} = 405,27 \text{ kg/día} \quad (C.43)$$

Considerando los mismos porcentajes, el balance para el permeado es:

$$m_{Retenido} = m_{Biomasa} + m_{Caldo} + m_{Lpidos} + m_{Buffer} \quad (C.44)$$

$$m_{Permeado} = 0,012 \text{ kg/día} + 19,99 \text{ kg/día} + 0,4 \text{ kg/día} + 92,08 \text{ kg/día} \quad (C.45)$$

$$m_{Permeado} = 112,5 \text{ kg/día} \quad (C.46)$$

Estos resultados se encuentran tabulados en el Cuadro [2.14](#) columnas 2, 3 y 4, filas 4, 5, 6 y 7.

### C.7. Balances de masa para la producción de biodiesel

El balance de masa para la producción biodiesel se realizó con base en la relación molecular que presenta la reacción de esterificación (ver ecuaciones [2](#), [3](#) y [4](#)). Esta relación molecular es 1:3:3 (TAGs:Alcohol etílico:Biodiesel). Sin embargo, a nivel práctico se utiliza el doble de alcohol para desplazar el equilibrio a los productos.

$$M_F = 3 \cdot M_{Alcohol} + 1 \cdot M_{TAGs} \quad (C.47)$$

A partir de la ecuación anterior, se utilizaron datos de masa molar para obtener

los siguientes resultados:

$$m_F = 1113,07 \text{ kg/día} + 402,67 \text{ kg/día} \quad (\text{C.48})$$

$$m_F = 1515,7 \text{ kg/día} \quad (\text{C.49})$$

La corriente de salida está compuesta por los productos y subproductos de la reacción de esterificación, los cuales corresponden a 3 moles de biodiesel, 1 mol de diglicéridos, 1 mol de monoglicéridos y 1 mol de glicerina.

$$M_S = 3 \cdot M_{Biodiesel} + 1 \cdot M_{Diglicridos} + 1 \cdot M_{Monoglicridos} + 1 \cdot M_{Glicerina} \quad (\text{C.50})$$

A partir de la ecuación anterior, se utilizaron datos de masa molar para obtener los siguientes resultados:

$$m_S = 3529,8 \text{ kg/día} + 402,67 \text{ kg/día} + 402,67 \text{ kg/día} + 402,67 \text{ kg/día} \quad (\text{C.51})$$

$$m_S = 4737,81 \text{ kg/día} \quad (\text{C.52})$$

De los cálculos mostrados anteriormente, el valor de mayor relevancia para el proyecto es la cantidad de biodiesel producido, por lo tanto se recapitula y muestra dicha cantidad:

$$m_{Biodiesel} = 3529,8 \text{ kg/día} \quad (\text{C.53})$$

Estos resultados se encuentran tabulados en el Cuadro [2.15](#) columna 2, filas 2, 3 y 4.

# C Diagrama de flujo

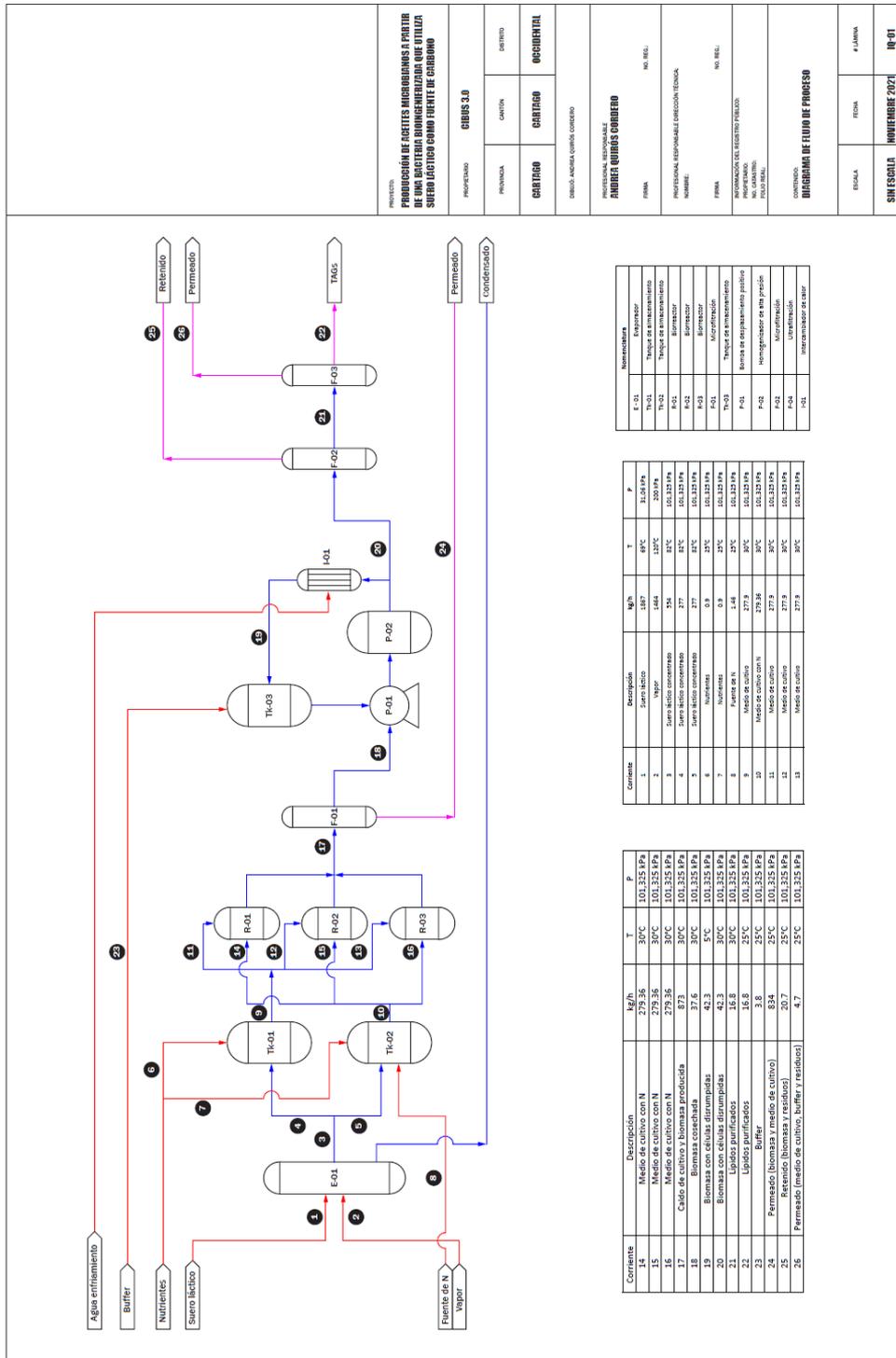


Figura 7.1. Diagrama de flujo del proceso. (Elaboración propia).