



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

CAMPUS D'ALCOI

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Politécnica Superior de Alcoy

Diseño de la producción de ácido kójico por fermentación de residuos celulósicos

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ingeniería Química

AUTOR/A: Company Doménech, Carlos

Tutor/a: Santos-Juanes Jordá, Lucas

Cotutor/a: Vicente Candela, Rafael

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022

RESUMEN

En este trabajo de final de grado se ha estudiado la viabilidad de una planta industrial de producción de ácido kójico y se han comparado dos escenarios de organización para obtener la mayor rentabilidad posible. Se ha buscado y contrastado información científica para la selección adecuado de microorganismo, materias primas, equipos y procesos. La elección ha sido el hongo *Aspergillus oryzae*, en un sustrato compuesto de glucosa pura como fuente principal de energía y extracto de levadura como fuente de nitrógeno, en unas condiciones de crecimiento de pH 5 y a una temperatura de 30 °C. El escalado se ha aplicado a los volúmenes, dimensiones de reactores, agitador y a la cantidad de materias primas, para obtener la producción deseada. La viabilidad de la planta se ha comprobado mediante técnicas como el VAN, el TIR y el Pay-Back, permitiendo comparar las dos opciones propuestas al inicio y saber cuál ofrece más beneficio.

Palabras clave: Ácido kójico, *Aspergillus oryzae*, fermentación, escalado, producción.

RESUM

En aquest treball de final de grau s'ha estudiat la viabilitat d'una planta industrial de producció d'àcid kójic i s'han comparat dos escenaris d'organització per a obtindre la major rendibilitat possible. S'ha buscat i contrastat informació científica per a la selecció adequada de l microorganisme, matèries primeres, equips i processos. L'elecció ha sigut el fong *Aspergillus oryzae*, en un substrat compost de glucosa pura com a font principal d'energia i extracte de llevat com a font de nitrogen, en unes condicions de creixement de pH 5 i a una temperatura de 30 °C. L'escalat s'ha aplicat als volums, dimensions de reactors, agitador i a la quantitat de matèries primeres, per a obtindre la producció desitjada. La viabilitat de la planta s'ha comprovat mitjançant tècniques com el VAN, el TIR i el Pay-Back, permetent comparar les dues opcions proposades a l'inici i saber quina ofereix més benefici.

Paraules clau: Àcid kójic, *Aspergillus oryzae*, fermentació, escalat, producció.

ABSTRACT

In this final degree project, the feasibility of an industrial plant to produce kojic acid has been studied and two organizational scenarios have been compared to obtain the highest possible profitability. Scientific information has been sought and contrasted for the proper selection of microorganisms, raw materials, equipment and processes. The choice was the fungus *Aspergillus oryzae*, in a substrate composed of pure glucose as the main energy source and yeast extract as the nitrogen source, under growth conditions of pH 5 and at a temperature of 30 °C. Scaling has been applied to the volumes, dimensions of the reactors, stirrer and the number of producer goods, to obtain the desired production. The viability of the plant has been verified using techniques such as the NPV, the IRR and the Pay-Back, allowing the two options proposed at the beginning to be compared and to know which one offers the most benefit.

Keywords: Kojic acid, *Aspergillus oryzae*, fermentation, scale-up, production.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN	4
1.1	¿QUÉ ES UN BIOPROCESO?	4
1.2	IMPORTANCIA DE LOS BIOPROCESOS	7
1.3	CARACTERÍSTICAS DEL COMPUESTO	8
1.4	BIOCATALIZADOR DEL ÁCIDO KÓJICO	9
1.5	HISTORIA DEL ÁCIDO KÓJICO	10
1.6	APLICACIONES INDUSTRIALES DEL ÁCIDO KÓJICO	11
1.7	PRODUCCIÓN DEL ÁCIDO KÓJICO	13
2	OBJETIVO	19
3	METODOLOGÍA	20
3.1	DESCRIPCIÓN DEL MICRORGANISMO	20
3.2	DESCRIPCIÓN MATERIAS PRIMAS	21
3.2.1	Fuente de carbono	21
3.2.2	Fuente de nitrógeno	22
3.2.3	Fuentes minerales	23
3.2.4	Inhibidores y estimulantes	23
3.3	DESCRIPCIÓN DE LAS CONDICIONES DE TRABAJO	24
3.3.1	Temperatura	24
3.3.2	pH	24
3.3.3	Agitación y aireación	25
3.3.4	Técnica de fermentación	26
3.4	DESCRIPCIÓN DEL PROCESO	26
3.5	DESCRIPCIÓN DEL EQUIPO	28
3.5.1	Fase de crecimiento	28
3.5.2	Fase de producción	30
3.5.3	Fase de separación y purificación	31
3.5.4	Fase de tratamientos de efluentes	33
4	CÁLCULOS	35
4.1	BASE DE CÁLCULO	35
4.2	CÁLCULO DEL TAMAÑO DE LOS REACTORES	37
4.3	CÁLCULO DEL DIÁMETRO Y DE LA ALTURA DE LOS REACTORES INDUSTRIALES	39
4.4	CÁLCULO DEL DIÁMETRO Y DE LA VELOCIDAD DEL AGITADOR INDUSTRIAL	41
4.5	CÁLCULO DEL ESCALADO DE TANQUES DE CRECIMIENTO	43
4.6	BALANCE DE MATERIA	44
4.7	CÁLCULO DE LAS CANTIDADES NECESARIAS DE SUSTRATO	46
4.8	CÁLCULO AJUSTE PH PARA LA FERMENTACIÓN	51
5	ESTUDIO ECONÓMICO	54

5.1	PRESUPUESTO DE INVERSIÓN	54
5.2	PRESUPUESTO DE EXPLOTACIÓN.....	56
5.3	ANÁLISIS DE RENTABILIDAD	63
5.3.1	VAN	64
5.3.2	TIR	65
5.3.3	PAY-BACK	66
6	CONCLUSIONES	68
7	BIBLIOGRAFÍA	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Bioproductos más destacados	6
Tabla 2. Aplicaciones ácido kójico	13
Tabla 3. Ejemplos sustratos síntesis ácido kójico	17
Tabla 4. Clasificación taxonómica del microorganismo	21
Tabla 5. Datos de la planta piloto.....	40
Tabla 6. Cálculo volumen tanques crecimiento	43
Tabla 7. Componentes balance materia fermentación	44
Tabla 8. Rendimientos bibliográficos	45
Tabla 9. Resumen cantidad glucosa	48
Tabla 10. Composición sustrato planta piloto	48
Tabla 11. Resumen cantidad extracto de levadura	49
Tabla 12. Resumen cantidad fosfato monopotásico	49
Tabla 13. Resumen cantidad sulfato de magnesio heptahidratado.....	50
Tabla 14. Resumen cantidad metanol	51
Tabla 15. Características disolución HCl.....	52
Tabla 16. Resumen cantidad HCl.....	53
Tabla 17. Presupuesto de inversión para 4 fermentadores	54
Tabla 18. Presupuesto de inversión para 11 fermentadores	55
Tabla 19. Costes materias primas para 4 fermentadores	56
Tabla 20. Costes materias primas para 11 fermentadores	57
Tabla 21. Salarios trabajadores para 4 fermentadores.....	58
Tabla 22: Salarios trabajadores para 11 fermentadores	58
Tabla 23. Costes energéticos para 4 fermentadores	59
Tabla 24. Costes energéticos para 11 fermentadores	59
Tabla 25. Coste agua para 4 fermentadores	60
Tabla 26. Coste agua para 11 fermentadores	60
Tabla 27. Coste de mantenimiento para 4 fermentadores	61
Tabla 28. Costes de mantenimiento para 11 fermentadores.....	61
Tabla 29. Coste amortizaciones para 4 fermentadores.....	62
Tabla 30. Costes amortización para 11 fermentadores	62
Tabla 31. Presupuesto de explotación total.....	63

Tabla 32. Precio de venta del ácido kójico.....	63
Tabla 33. Flujo de caja	64
Tabla 34. Coste de fabricación del ácido kójico	64
Tabla 35. VAN	65
Tabla 36. TIR	66
Tabla 37. Pay-back.....	67

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Esquema etapas bioproceso.....	5
Ilustración 2. Gráfica empleo de bioprocesos	8
Ilustración 3. Estructura química ácido kójico.....	8
Ilustración 4. Cristales de ácido kójico	9
Ilustración 5. Síntesis maltol a partir de ácido kójico	12
Ilustración 6. Aumento de <i>Aspergillus oryzae</i>	14
Ilustración 7. Agitador Rushton	25
Ilustración 8. Diagrama resumen proceso	27
Ilustración 9. Cámara de cultivo	28
Ilustración 10. Agitador de vaivén con Erlenmeyer.....	28
Ilustración 11. Autoclave	29
Ilustración 12. Reactor de crecimiento.....	29
Ilustración 13. Espectrofotómetro	29
Ilustración 14. Barrido de concentración	30
Ilustración 15. Curva de calibrado	30
Ilustración 16. Biorreactores para la fermentación	30
Ilustración 17. Equipo HPLC	31
Ilustración 18. Sistema de filtrado.....	32
Ilustración 19. Cristalizador	32
Ilustración 20. Sistema de secado continuo	33

1 Introducción

1.1 ¿Qué es un bioproceso?

Un bioproceso es cualquier operación que involucre la transformación en un producto, de cualquier materia prima, biológica o no biológica, mediante la acción de microorganismos, cultivos de células animales o vegetales o por materiales derivados de los mismos como las enzimas. No son nuevos, han acompañado el desarrollo humano desde los albores de la civilización (fermentación del pan o la cerveza) y en la actualidad están ganando cada vez más atención debido a su enorme potencial para la obtención de valiosos productos, tienen un alto interés industrial en sectores como el médico (medicamentos y vacunas), el alimentario (alcoholes), el material (polímeros) o el cosmético (componentes para cremas u otros).

Los bioprocesos pueden ser una gran alternativa a los procesos químicos en la industria, en general son reacciones más lentas que los procesos químicos, además su rendimiento depende mucho de los factores ambientales que rodeen a los microorganismos, si no se controlan correctamente parámetros como la temperatura, el pH, la agitación o la concentración de oxígeno, puede que el microorganismo no crezca adecuadamente o que incluso mueran. Sin embargo, estas biorreacciones también tienen ventajas frente a sus equivalentes químicas, normalmente son económicamente más rentables, sobre todo a la hora de producir moléculas complejas. Tienen mayores rendimientos y no producen subproductos nocivos para el medio ambiente.

Estos se dividen en etapas, la primera etapa conocida por upstream o etapa de tratamiento previo, donde las materias primas deben ser preparadas de manera que puedan crecer adecuadamente. Le sigue el corazón del bioproceso, la etapa de biorreacción involucra la transformación de sustrato en biomasa o en biomasa y algún producto bioquímico o enzima. Por último, la etapa de downstream o de tratamiento de los productos, consiste en operaciones predominantemente físicas, mediante las cuales se obtiene la concentración y purificación deseada de los productos.

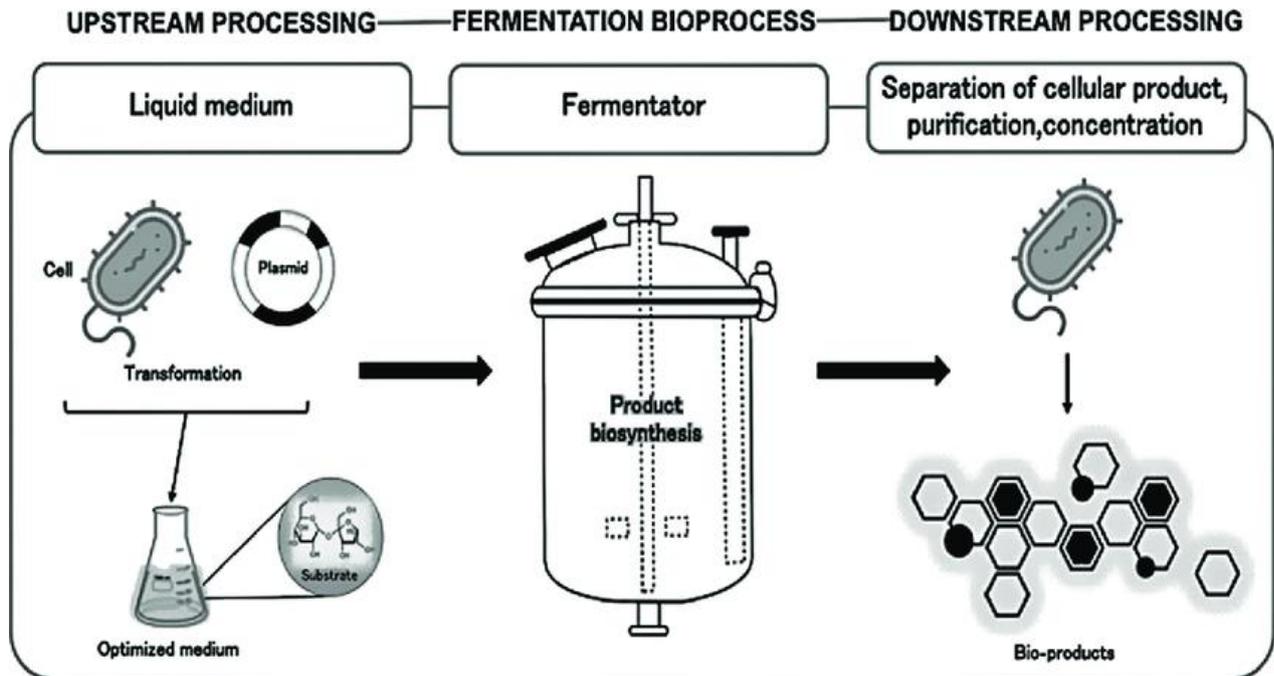


Ilustración 1. Esquema etapas bioproceso

Existen dos tipos de operaciones para los bioprocesos, la operación por lotes o discontinua, que es la más utilizada, donde el biorreactor es alimentado al principio con el sustrato y con los microorganismos que nos interesan, permitiendo el crecimiento de estos por el tiempo necesario hasta obtener el producto deseado, finalmente se abre el recipiente y se extrae el producto generado. La operación continua consiste en alimentar con sustancias nutritivas continuamente e ir extrayendo los productos de forma simultánea, controlando así la velocidad de muerte celular del microorganismo. Existen operaciones que combina estas dos técnicas, conocidas como operaciones semicontinuas, se opera como por lotes, pero se va cosechando e introduciendo medio nuevo cada cierto tiempo. Las operaciones semicontinuas tienen especial interés cuando los microorganismos presentan inhibición por sustrato o se necesita de un promotor para generar el bio-producto deseado.

Actualmente la sociedad está en contacto un sinnúmero de bioproductos que incluso son utilizados día a día, en la [tabla 1](#) hay varios ejemplos de los miles que existen, más cuando se descubren nuevos bioprocesos continuamente, los aditivos alimentarios son muy conocidos y los potenciadores de sabor son bioproductos típicos, destaca uno como es glutamato monosódico. En farmacia también muchos medicamentos y principios activos son bioproductos, de los más famosos es la penicilina por ser el primer antibiótico. También en cosmética hay principios activos y componentes que

proceden de bioprocesos como el caso del ácido hialurónico, también en la tabla se destacan grandes industrias que se benefician mucho de los bioprocesos, buscan cada vez más usar bioproductos en su catálogo o buscar un alternativa menos contaminante y problemática, es el caso de los plásticos, de las sustancias químicas o de los fertilizantes.

BIOPRODUCTOS	MERCADO	Ejemplos
Aditivos alimentarios (antioxidantes, conservantes, etc.)	Alimentación humana, nutrición animal, cosmética	Extracto de romero, extracto de semilla de uva, extracto de aceituna
Aditivos zootécnicos	Nutrición animal	Extractos vegetales, aceites esenciales, prebióticos
Ingredientes alimenticios con propiedades saludables	Alimentación humana e industria complementos alimenticios	Extractos vegetales estandarizados, prebióticos
Ingredientes activos farmacéuticos	Industria farmacéutica	Extractos vegetales y compuestos purificados, con calidad farmacopea europea
Ingredientes cosméticos activos	Industria cosmética	Extractos y compuestos purificados
Biofertilizantes, bioestimulantes	Agroquímico	
Bioproductos naturales	Papel	Celulosa, hemicelulosa, almidón, azúcares, quitina, quitosano, aceites y grasas vegetales, lignina, caucho natural, terpenos
Biochar y carbón activado	Catálisis, adsorción (industria química)	Catalizadores Descontaminantes
Bioplásticos de origen biotecnológicos	Alimentación	PHAs
Monómeros	Industria química, pinturas,	Monoetilenglicol, ácido láctico, ácido succínico, 1,4 BDO (1,4 butanodiol), 2,3 BDO (2,3 butanodiol), 1,3 propanodiol, IBMC (isosorbida bis-metil carbonato), ácido levulínico, 1,3 propanodiol, xilitol
Polímeros	Industria química, pinturas, adhesivos, recubrimientos,	Poliésteres, poliolefinas, poliuretanos, poliamidas, epóxidos
Disolventes	Industria química	Etanol, MEK (metiletilcetona, ésteres de lactato)

Tabla 1. Bioproductos más destacados

El ácido kójico es de aquellos que por tradición es producido industrialmente en su totalidad mediante un bioproceso y no existe una opción química para su procesado. Desde hace bastantes siglos se utilizaban microorganismos con el fin de obtener este producto, añadiendo diferentes tipos de sustratos para producir alimentos como la salsa de soja o el miso, entre otros.

1.2 Importancia de los bioprocesos

La biotecnología tiene grandes potenciales para explorar, la investigación en esta área resulta prometedora para científicos en todo el mundo. Sin embargo, varias aplicaciones son utilizadas en diferentes empresas y muchas más son investigadas en laboratorio con el fin de llevarlas temprano a la industria por su gran eficiencia y versatilidad.

En la industria alimentaria se ha utilizado para obtener alimentos, aditivos, nuevos sabores, texturas y aromas. Desde 1970 se aplica la biotecnología en el sector de la alimentación con el objetivo de mejorar sus características organolépticas, funciones nutricionales y productividad. Actualmente hay dos funciones básicas en la industria alimenticia para los bioprocesos, iniciadores en fermentaciones y en la fabricación de ingredientes.

En la agroindustria destaca la utilización en los últimos años de los bionematicidas, se ha investigado mucho sobre bioprocesos para formar compuestos con actividad pesticida, principalmente herbicida, insecticida y nematicida.

En la industria química la síntesis de diferentes productos químicos y la generación de biocombustibles ayudan a resolver el problema de la gran dependencia en los combustibles fósiles.

También tiene un papel importante en la tecnología medioambiental, ya que existen procesos enzimáticos biodegradables para el tratamiento de residuos.

En medicina los bioprocesos adquieren funciones muy específicas, control biológico de enfermedades, producción de vacunas, antibióticos y productos terapéuticos como hormonas o biomateriales.

En farmacia también destaca por la producción a gran escala de un gran número de productos de interés, como anticoagulantes, proteínas, anticuerpos o antígenos. Incluso diferentes técnicas de ingeniería de proteínas, ayudando a determinar relación estructura-función de proteínas y a la comprensión de reacciones del sistema inmune.

En la industria de los materiales la aplicación de técnicas biotecnológicas ha permitido gran variedad de biomateriales, que a estar producido por microorganismos pueden actuar en sistemas biológicos, destacan los biopolímeros biodegradables y biocompatibles.

Por último, son una alternativa para la producción de biosensores, estos integran microorganismos con un transductor físico para generar una señal medible proporcional a la concentración de analitos, lo que permite una detección rápida y precisa de los objetivos de análisis en diversos campos, como medicina, monitoreo ambiental, procesamiento de alimentos y otros. [14]

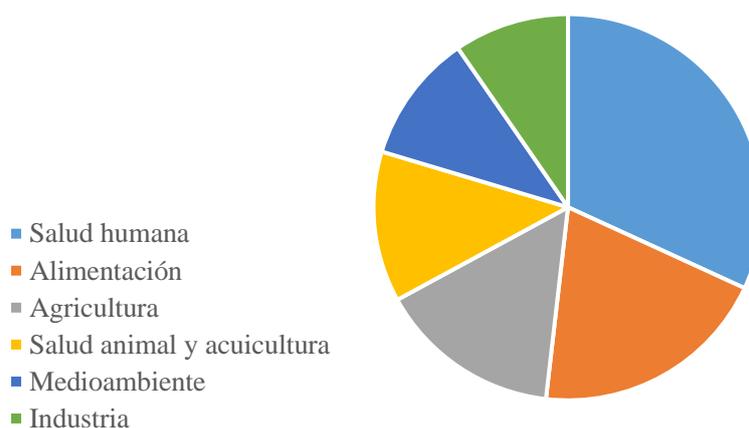


Ilustración 2. Gráfica empleo de bioprocesos

1.3 Características del compuesto

El ácido kójico se trata de un ácido orgánico, científicamente conocido como 5-Hidroxi-2-(hidroximetil)-4-pirona. Como se ve en la [ilustración 3](#), posee el grupo oxo en la posición 4, es sustituido por un grupo hidroxilo en la posición 5 y por un grupo hidroximetilo en la posición 2. Su fórmula semidesarrollada es $C_6H_6O_4$.

Su nombre común, proviene del hongo 'Koji', designación japonesa que se utiliza para referirse al hongo *Aspergillus oryzae*, ya que es un hongo muy utilizado en la cocina japonesa,

utilizado para fermentar los alimentos de forma natural a través de los siglos y de las generaciones.

El ácido kójico es, a temperatura ambiente, un sólido cristalino en forma de agujas prismáticas incolores, ya que tiene un punto de fusión entre 151 y 154°C. Es un compuesto soluble en agua,

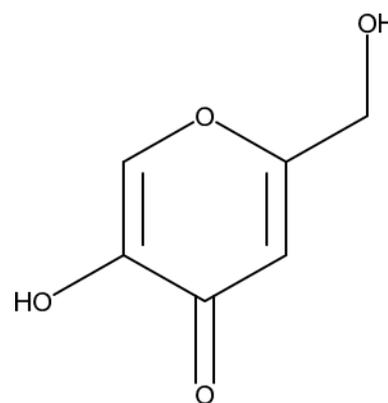


Ilustración 3. Estructura química ácido kójico

etanol y acetato de etilo, pero insoluble en éter, cloroformo y piridina. Posee un peso molecular de 142.11 g/mol y tiene un pico máximo de absorción en la región del ultravioleta, entre los 280 y los 284 nm.

Se clasifica dentro de las pironas, tiene propiedades débilmente ácidas y es reactivo en todas las posiciones del anillo pudiendo obtener varios productos de alto valor en la industria química. Destaca su comportamiento como agente quelante, capaz de formar complejos con iones de metales pesados, a partir de los enlaces formados con el grupo hidroxilo y con el grupo oxo. También, el grupo hidroxilo actúa como un ácido débil, siendo capaz de formar sales con algunos metales, como sodio, zinc, cobre, calcio, níquel y cadmio. [16, 19]



Ilustración 4. Cristales de ácido kójico

1.4 Biocatalizador del ácido kójico

La biodiversidad de los biocatalizadores, así como la naturaleza única y las capacidades biosintéticas en condiciones ambientales específicas hacen que sean candidatos para resolver problemas de escases de alimentos, control de plagas o descomposición de basura sin compuestos nocivos para la naturaleza. Existen infinidad de bacterias, enzimas, células u hongos entre otros que ofrecen características únicas que son útiles en miles de procesos y las que quedan por descubrir por el ser humano.

Los biocatalizadores en la mayoría de los bioprocesos son microorganismos, ya que existen una gran variedad y con capacidades metabólicas amplias siendo útiles en muchas aplicaciones diferentes, su rápido crecimiento y su fácil manipulación son otras de sus ventajas.

También se puede utilizar enzimas en estos procesos como biocatalizadores, son proteínas en las que entra el sustrato y toma lugar la reacción para producir un producto. Pueden ser desde enzimas animales, vegetales o microbiano.

En el caso del ácido kójico se utiliza un microorganismo, un hongo microscópico, a partir de varias especies de hongos podemos obtener ácido kójico, los hongos a pesar de que muchas veces se asocian a algo desagradable tiene aplicaciones realmente sorprendentes en los bioprocesos que son utilizadas a diario por muchísimas personas.

En alimentación desde el siglo XIX, los hongos han participado en la fermentación de bebidas, la elaboración de quesos e incluso la panificación. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* para el pan, quesos como el Brie o Camembert utilizan *Penicillium camemberti* o la fermentación del zumo de uvas para vino con *Saccharomyces ellipsoideus* son algunos ejemplos.

En la industria farmacéutica se han utilizado hongos para la obtención de distintos medicamentos. Los antibióticos son metabolitos secundarios producidos, principalmente, para la defensa del organismo producidos particularmente por hongos. La penicilina es producida por *Penicillium notatum* y fue el primer antibiótico utilizado ampliamente en medicina.

En agricultura los hongos pueden actuar como biofungicidas, el género *Trichoderma*, actúan como antagonistas de bacterias y hongos patógenos de plantas, ayudándoles en su crecimiento y desarrollo. [3]

1.5 Historia del ácido kójico

Tradicionalmente se ha usado la fermentación en los países orientales, a pesar de que hasta el siglo pasado estas operaciones eran totalmente empíricas y realmente no se sabía que ocurría.

En China durante muchos siglos, los granos de cereales o el arroz, se convirtieron en bebidas alcohólicas utilizando una fermentación iniciada por un hongo. En el siglo VII, los sacerdotes budistas aparentemente trajeron sus métodos de China a Japón, donde el inóculo fúngico, a menudo *Aspergillus oryzae*, se hizo conocido como koji.

El proceso del koji es un ejemplo muy temprano de una fermentación en estado sólido, actualmente las fermentaciones en estado sólido ahora tienen un considerable interés industrial para la

producción de una variedad de enzimas, ácidos orgánicos, metabolitos secundarios y biocombustibles, entre otros.

Hace más de 100 años, se consiguió aislar el ácido kójico como producto residual de la fermentación de arroz cocido por *Aspergillus oryzae*, pero no fue nombrado ni identificado en ese momento. Fue descubierto en 1907 por Kendo Saito, eminente micólogo japonés y pionero en el uso de hongos en procesos industriales, sin embargo, no muy conocido fuera de Japón.

En 1912, Teijiro Yabuta, investigador en la facultad de agricultura de la Universidad Imperial de Tokio, con arroz al vapor e inoculando *Aspergillus oryzae*, consiguió extraer de 15 kg de arroz, 50 g de ácido que denominó ácido koji. Más tarde, en 1916, Yabuta rehízo el artículo en japonés, cambiando el nombre por ácido kójico, estableció su fórmula molecular y observó la formación de ácido kójico por algunas otras especies de *Aspergillus* (*A. albus*, *A. candidus*, *A. nidulans*).

En los siguientes años, varios investigadores descubrieron diferentes métodos para obtener este ácido, consiguiendo en algunos casos mayores rendimientos. Algunos ejemplos son la producción de ácido kójico por *A. glaucus* a partir de sacarosa, glucosa, fructuosa y glicerina; o por *A. oryzae* a partir de xilosa. [1]

1.6 Aplicaciones industriales del ácido kójico

El desarrollo del ácido kójico fue obtenido industrialmente por primera vez en 1955, sin embargo, en ese momento no había una demanda destacable de esta materia prima, ha sido recientemente que el interés por el ácido kójico está creciendo exponencialmente en industrias relacionadas con sus aplicaciones.

La industria cosmética se aprovecha del beneficio más llamativo que tiene este ácido, es el compuesto principal para el blanqueamiento de la piel en cremas, lociones, jabones e incluso en productos de higiene dental.

Es un inhibidor leve de la formación de pigmentos, suprime la hiperpigmentación en la piel humana al restringir la formación de la melanina, inhibiendo la formación de la enzima responsable de este proceso, la tirosinasa.

Su crecimiento se debe entre otros factores a su eficacia en productos para controlar pecas u otras manchas en la piel combinado con algún alfa-hidroxiácido, además su capacidad de actuar como protector ultravioleta, por ello también es usado en lociones protectoras solares. Un compuesto similar para el aclarado gradual de manchas en la piel es la hidroquinona, sin embargo, ha sido prohibido en la Unión Europea, en Estados Unidos y en algunos países en Asia, esto se debe a que se señala como un posible compuesto cancerígeno, el papel del ácido kójico destaca como un remplazo más estable y no dañino para la salud.

Existen también otras industrias que también aprovechan el potencial industrial el ácido kójico, como por ejemplo en el campo médico, donde destacan sus propiedades antibióticas contra microorganismos gramnegativos y grampositivos, incluso existen derivados kójicos con una alta actividad fungicida y antibacteriana, como es el caso del ácido kójico 7-yodo. Al ser de origen natural, el ácido kójico no tiene problemas de biodegradación en el cuerpo humano.

Dentro de la industria agrícola, muestra cierta actividad contra algunas especies de insectos, es utilizado como agente quelante para la producción de insecticidas, actúa el inhibiendo el crecimiento de larvas y posteriormente induce esterilidad a los individuos.

En la industria química es usado como reactivo para la determinación analítica de hierro en minerales, como agente quelante de hierro u otros iones metálicos que tiene la ventaja de proporcionar una liberación controlada de estos y también es utilizado en la síntesis de la 2-metil-4-pirona.

Otra industria importante, en aplicaciones, es la industria alimentaria. El ácido kójico está presente naturalmente en la comida tradicional japonesa, como el miso, la salsa de soja o el sake. También, actúa como precursor de potenciadores de sabor, como el maltol y el etilmaltol, utilizados en

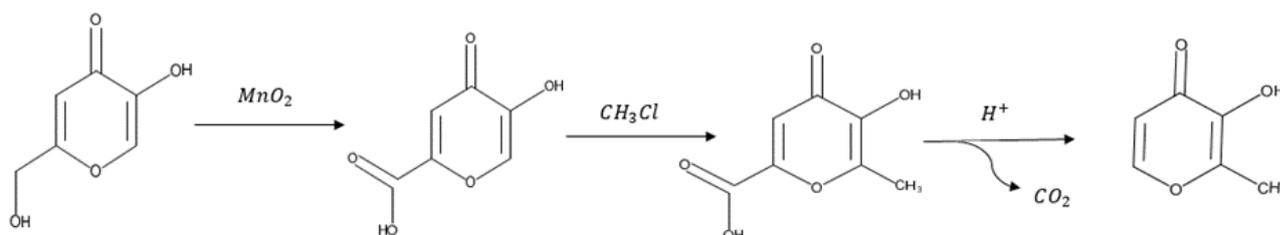


Ilustración 5. Síntesis maltol a partir de ácido kójico

perfumes y en sabores, se utiliza en la producción del ácido coménico, que es un intermedio para la síntesis del maltol.

También existen aplicaciones para el almacenamiento y el procesado de alimentos, el ácido kójico tiene efecto inhibidor sobre la enzima polifenol oxidasa, interfiere en la captación de oxígeno necesario en el pardeamiento que se da en cierto tipos de alimentos, como fideos, hongos, manzanas, patatas o crustáceos, este carácter antioxidante permite una mayor duración de los alimentos. [15]

Sector	Aplicación
Cosmético	Inhibidor de la tirosinasa
	Protector ultravioleta
	Sustituto hidroquinona
Médico	Antibacteriano
	Antifúngico
Agrícola	Activador de insecticidas
Químico	Reactivo para determinación de hierro
	Agente quelante
	Síntesis de 2-metil-4-pirona
Alimentación	Miso, salsa de soja, sake
	Potenciadores de sabor
	Antioxidante

Tabla 2. Aplicaciones ácido kójico

1.7 Producción del ácido kójico

El bioproceso que genera ácido kójico es una fermentación, que es un proceso catabólico que transforma las moléculas mediante una oxidación incompleta, dando como resultado un compuesto orgánico y la generación de energía química.

La fermentación tiene varias aplicaciones, hace uso de la acción controlada de microorganismos seleccionados para modificar la textura, aroma o sabor de los alimentos, conservarlos y producir ácidos o alcohol.

En el caso del ácido kójico se produce a partir de una fermentación aerobia, el microorganismo se trata de un hongo, utilizando varias especies, entre las que destacan el género de *Aspergillus ssp* y *Penicillium ssp*, con variedad en fuentes de carbono, como glucosa, sacarosa y almidón, y varias fuentes de nitrógeno como extracto de levadura, peptona y licor de maíz, entre otros.

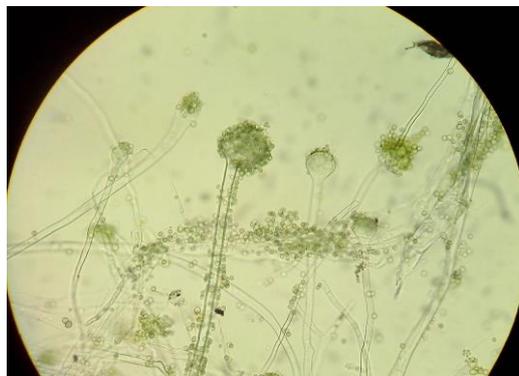


Ilustración 6. Aumento de *Aspergillus oryzae*

Las fermentaciones son la gran mayoría de veces son llevadas a cabo en reactores discontinuos, que tienen grandes ventajas como fácil operabilidad y gran confiabilidad en las operaciones, sin embargo, existe inestabilidad genética que provoca una calidad no uniforme en los productos.

Existen varias técnicas de fermentación que dependen del tipo de producto que se quiera y del material que se disponga, eligiendo el más conveniente se puede aumentar el rendimiento y reducir el costo. Son conocidas como:

- El cultivo en superficie es la técnica donde se cultivan los mohos en un medio sólido o líquido sin agitar el recipiente de cultivo.
- El cultivo sumergido los nutrientes se encuentran forma líquida y los microorganismos se desarrollan flotando libremente en el volumen de medio de cultivo o formando agregados más o menos esféricos.

- El cultivo líquido de superficie de membrana es un sistema donde los cultivos crecen en la superficie de unas membranas microporosas que tiene una parte expuesta al aire y su lado opuesto en contacto con el medio líquido.
- El sistema de células resuspendidas es un método que consiste en extraer las células mediante centrifugación y resuspenderlas en un tampón de carbohidratos para formar ácido kójico.
- El sistema celular inmovilizado consiste en inmovilizar las esporas del hongo utilizado en perlas de alginato de sodio, que permite tener gran cantidad de células y trabajar en condiciones más suaves.

El ácido kójico es relativamente caro y causa un gran aumento en el precio de los productos finales que lo llevan, esto debido a que la demanda es muy alta y que el rendimiento suele ser menor a escala industrial, ya que es más difícil tener un control de un gran número de factores, tales como la composición del medio, concentración de oxígeno y pH, entre otros.

Por ello se busca constantemente mejorar cada una de las etapas llevadas a cabo, desde la formulación del medio de cultivo hasta los procesos posteriores a la fermentación, para mejorar la cantidad de ácido kójico obtenido.

El rendimiento es la variable más importante en este tipo de procesos, por ello se investigan diferentes tipos de microorganismos y sustratos para encontrar que combinación produce más cantidad de producto. En la [tabla 3](#) se muestran ejemplos de varias combinaciones investigadas y con buen rendimiento, en el caso del *Aspergillus oryzae*, la mayor producción de ácido kójico se obtuvo con glucosa como fuente de carbono, sin embargo, como materia prima tiene un valor muy alto y económicamente el almidón o el etanol es preferible pero no llegan a los mismos niveles de rendimiento, por otro lado, otras en fuentes carbono como la fructosa o la xilosa no son recomendables por la poca cantidad de producto que generan.

Las características y los rendimientos de cada sustrato pueden diferir si cambiamos el microorganismo, pero en pequeña medida ya que al tratarse del mismo género de hongos no hay diferencias destacables, por ejemplo, el *Aspergillus candidus* se prefiere la sacarosa antes que la glucosa, pudiendo llegar a una producción de 0.5 g/L, duplicando a la glucosa y justo al contrario ocurre en el *Aspergillus parasiticus* siendo la única opción viable la sacarosa como fuente de carbono. En el caso del *Aspergillus flavus* existen algunas fuentes de carbono que causan

inhibición de la producción de ácido kójico que para el *Aspergillus oryzae* sí que son recomendables.

En general, según estudios la glucosa, la sacarosa y la melaza de remolacha como almidón, son buenas fuentes de carbono para los hongos *Aspergillus ssp* y *Penicillium ssp*, obteniendo una generación de ácido kójico aceptable. [15]

Microorganismo	F. carbono	F. nitrógeno	Fosfatos	Minerales
<i>A.oryzae</i>	Etanol	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ o Extracto de levadura	KH_2PO_4	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
	Glicina			
	Ácido tartárico			
	Glucosa			
	Almidón			
	Maltosa			
	Ácido shikímico			
1,3-dihidroxi-2-propanona				
<i>A.flavus</i>	Acetato de sodio	NH_4NO_3 o Extracto de levadura	KH_2PO_4	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
	Arabinosa			
	Glucosa			
	Sacarosa			
	Almidón			
<i>A.tamarii</i>	Glicerol	NaNO_3	KH_2PO_4	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
	Fructosa			
	Sacarosa			
<i>A.candidus</i>	Sacarosa	Extracto de levadura	KH_2PO_4	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
<i>A.parasiticus</i>	Glucosa	Peptona o Extracto de levadura	KH_2PO_4	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Tabla 3. Ejemplos sustratos síntesis ácido kójico

Por la parte de la fuente de nitrógeno, todas las investigaciones se centran en dos o tres posibilidades, generalmente las fuentes de nitrógeno orgánico son mejores que las inorgánicas para la fermentación, ya que tienen un buen sistema de amortiguación, algunas fuentes de nitrógeno inorgánico reducen excesivamente el pH e inhiben el crecimiento. El extracto de levadura es la fuente de nitrógeno orgánico más favorable para la producción de ácido kójico en comparación con la peptona y la polipeptona, debido a que contiene vitaminas y oligoelementos que desempeñan un papel importante en la mejora de la producción de ácido kójico. Algunos hongos, como el *Aspergillus tamaris* son resistentes a la reducción del pH que se puede dar con fuentes inorgánicas y al ser más baratas, se utilizan para favorecer la viabilidad económica del proceso, incluso para *Aspergillus oryzae* y *flavus* se han estudiado mezclas de fuentes de nitrógeno orgánicas e inorgánicas, esto evita una fuerte reducción del pH y un coste menor, pero se reduce la eficiencia.

En los minerales, el fosfato es un nutriente importante y el más usado es el fosfato monopotásico (KH_2PO_4), la concentración de este tendrá gran influencia en la generación del producto. Otros minerales extra que se añaden en pequeñas concentraciones en el sustrato, ya que ayudan en buen crecimiento y una producción sustancial, son el sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), el sulfato de hierro heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), el cloruro de potasio (KCl), el nitrato de sodio (NaNO_3), incluso se pueden añadir medios prefabricados que aportan todos estos minerales, como es el caso del medio Czapek-Dox. [15]

2 Objetivo

El principal objetivo de este Trabajo Final de Grado es el diseño de un proceso de bioproducción industrial de ácido kójico. Para ello, se han de cumplir los siguientes objetivos específicos:

- Selección del microorganismo y las condiciones de trabajo
- Selección del tipo de reactor y el modo de operación
- Escalado del proceso
- Dimensionado del proceso
- Estudio de viabilidad económica

Este trabajo se desarrolla con la intención de mejorar el medio ambiente, por ello se han aplicado objetivos de desarrollo sostenible (ODS), dos de esta lista de objetivos cobran especial importancia:

- 9. Construir infraestructuras resilientes, promover la industrialización sostenible y fomentar la innovación.
- 12. Garantizar modalidades de consumo y producción sostenibles.

3 Metodología

3.1 Descripción del microorganismo

En el proceso de producción del ácido kójico existen varias opciones a la hora de elegir un microorganismo válido. Hay varios candidatos dentro del género de *Aspergillus ssp.* y *Penicillium spp.*, entre estos dos géneros el más común para la producción es el primero, ya que dentro de esta hay gran variedad de especies que producen ácido kójico como metabolito con diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, como pueden ser *A.oryzae*, *A.flavus*, *A.parasitacus*, *A.candidus*, *A.tamaritii*, *A.luteo-viescens* y *A.albus* son los más conocidos.

En este caso se ha escogido el hongo *Aspergillus oryzae*, por motivos económicos, ya que los medios donde puede cultivarse son baratos, además al tratarse de uno de los precursores del aislamiento del ácido kójico y el hongo con el que tradicionalmente se han llevado a cabo las fermentaciones para alimentación, existen ya mutaciones de este hongo que mejoran la producción casi 100 veces respecto al original con las mismas condiciones de trabajo.

Aspergillus oryzae es un hongo microscópico, de la clase *Ascomycetes*. Como en el género de los *Aspergillus*, este hongo está formado por una red de filamentos hialinos de diámetro fino y regular, septados y ramificados. Sobre estos filamentos surgen filamentos verticales que terminan en una vesícula sobre la que se disponen células que forman esporas, estas son producidas por división mitótica y aseguran la reproducción asexual del hongo. Se puede cultivar fácilmente en varios medios naturales (zanahoria, cereal, arroz, etc.) o sintéticos (líquido de Raulin, etc.).

Aspergillus oryzae produce varios metabolitos secundarios que se sabe que son tóxicos para los seres humanos según su dosis letal media (LD_{50} = dosis que causa la muerte del 50% de una población animal en mg/kg):

- El ácido ciclopiazónico anula la función del retículo sarcoplásmico. (LD_{50} (ratón) = 64)
- El ácido kójico no es peligroso a las dosis presentes en los alimentos. (LD_{50} (ratón) = 250)
- La aspergilomasmina tiene efectos inhibidores sobre la enzima convertidora de angiotensina ACE. (LD_{50} (ratón) = 160)
- El ácido 3-nitropropiónico conduce a la disfunción de las mitocondrias. (LD_{50} (rata) = 67)

La Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de Estado Unidos reconoce el hongo *Aspergillus oryzae* como seguro o generalmente reconocido como seguro. [8, 16]

Dominio	<i>Eukaryota</i>
Reino	<i>Fungi</i>
Filo	<i>Ascomycota</i>
Subfilo	<i>Pezizomycotina</i>
Clase	<i>Eurotiomycetes</i>
Orden	<i>Eurotiales</i>
Familia	<i>Trichocomaceae</i>
Genero	<i>Aspergillus</i>
Especie	<i>A. oryzae</i>

Tabla 4..Clasificación taxonómica del microorganismo

3.2 Descripción materias primas

La formulación del medio es una etapa esencial en el diseño de fermentaciones a nivel laboratorio, piloto e industrial. Los constituyentes del medio deben satisfacer los requerimientos esenciales para la producción de biomasa y metabolitos deseados y debe haber energía suficiente para mantener a las células y para la biosíntesis. Por lo que el medio inicial debe tener una fuente de carbono y energía, una fuente de nitrógeno y otros requerimientos, cómo sales, para producir biomasa, productos y subproductos.

3.2.1 Fuente de carbono

El carbono es la principal fuente de energía de los seres vivos, permite un correcto crecimiento y desarrollo. Se puede utilizar una gran variedad de sustratos que contengan carbono como medio de cultivo para la fermentación del ácido kójico, desde almidón, sacarosa, maltosa, glucosa, fructosa, manosa, galactosa, xilosa, arabinosa, sorbitol, acetato, etanol, glicerol y arabinosa.

La elección en este caso ha sido la glucosa, ya que ofrece el mayor rendimiento a la hora de producir ácido kójico por *Aspergillus oryzae* según la investigación que se ha hecho con diferentes

fuentes de carbono en el [artículo 15](#). En la mayoría de las fuentes de carbono los hongos crecen bien, sin embargo, no todas sirven para producir ácido kójico posteriormente, la glucosa es la mejor precursora para la síntesis de este producto.

Sin embargo, la glucosa pura es bastante cara y hay opciones más baratas como el almidón de maíz, además de que al ser un residuo de algunas industrias favorece la economía circular. El almidón el problema que tiene es que está formado por moléculas de amilosa y amilopectina formadas en grandes cantidades por glucosa, pero con largas cadenas de grandes grados de polimerización, entonces se depende para el crecimiento de una etapa previa de hidrolisis para romper en moléculas que los hongos puedan sintetizar. [[11](#), [12](#)]

3.2.2 Fuente de nitrógeno

El nitrógeno es uno de los componentes químicos principales de las proteínas, que desempeñan un papel importante en el organismo de los seres vivos, desde el mantenimiento de órganos y tejidos, hasta la formación de hormonas, enzimas o anticuerpos.

Para un medio de cultivo donde se quieren inocular hongos *Aspergillus* destacan como fuentes de nitrógeno el extracto de levadura, las polipeptonas, las peptonas y algunas sales de amonio [NH_4NO_3 , $(NH_4)_2SO_4$]. La elección en este caso ha sido el extracto de levadura, es un producto con alto contenido en vitaminas y aminoácidos además de ser un residuo del proceso de elaboración de cerveza y un muy buen nutriente para un gran número de microorganismos.

El extracto de levadura es considerado la mejor fuente de nitrógeno para la producción de ácido kójico, sin embargo, hay que controlar la cantidad que se agrega al medio, ya que, a mayor cantidad, mayor crecimiento celular y por lo tanto menos sustrato se convierte en el producto que queremos.

La relación carbono-nitrógeno es lo que se debe controlar, ya que puede conducir a una inhibición de la síntesis, si la relación C/N no es adecuada, o conseguir una mejora en la producción de ácido kójico, si la relación C/N es la óptima. Lo ideal para la producción, es que la fermentación esté limitada por el nitrógeno, ya que una gran cantidad de carbono debe estar disponible durante la fase de producción para la conversión en ácido kójico por las enzimas unidas a las células. [[12](#), [15](#)]

3.2.3 Fuentes minerales

Los minerales están presentes como sales en los líquidos celulares, donde tienen la función de mantener la presión osmótica, entre otras. La ausencia de estos puede limitar la actividad del microorganismo, reduciendo el rendimiento de la reacción. En la mayoría de los procesos de producción de ácido kójico se utiliza el sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$).

Por otra parte, el fosfato es un nutriente importante para el crecimiento de la mayoría de los hongos. Se incorpora en moléculas como ácidos nucleicos o fosfolípidos; y juega un papel esencial en el metabolismo energético. La concentración de fosfato en el caldo de cultivo es determinante a la hora de obtener un rendimiento aceptable. Como fuente de fósforo, se utiliza en la mayoría de los procesos de producción de ácido kójico el fosfato monopotásico (KH_2PO_4). [5, 15]

3.2.4 Inhibidores y estimulantes

Algunos componentes en un medio de fermentación, solo se añaden para regular la producción de productos en lugar de apoyar el crecimiento de microorganismos.

Los inhibidores manipulan el progreso de la fermentación, impide la acción de la enzima encargada de producir ácido kójico, provocando que se produzca menos cantidad según la cantidad de inhibidor que se añada. Para *Aspergillus oryzae* existen inhibidores que son metabólicos como el fluoruro de sodio, ácido monoyodoacético, arseniato de sodio, malonato, cianuro de potasio, azida de sodio, dinitrofenol y pentaclorofenol, entre otros. Se suelen añadir en pequeñas concentraciones (10^{-2} o 10^{-4} M) para controlar la cantidad de ácido kójico producido.

En cambio, los estimulantes tienen la acción contraria a los inhibidores, puede actuar sobre distintos factores de la fermentación para mejorar la producción de ácido kójico. Por ejemplo, el metanol (CH_3OH) reduce el tamaño de la burbuja en el fermentador del tanque agitado y aumenta la tasa de transferencia de oxígeno, esto hace que mejore el rendimiento. [15]

3.3 Descripción de las condiciones de trabajo

3.3.1 Temperatura

La temperatura es uno de los parámetros ambientales más importantes que condicionan el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos; la combinación de bacterias y hongos los hace capaces de sobrevivir en un rango de temperatura de 0 hasta 65°C en un tiempo prolongado.

El intervalo de temperaturas óptimo para la fermentación kójica está entre los 29 y los 35°C, para las especies *Aspergillus oryzae* se utilizan valores alrededor de los 30°C para maximizar la producción, incluso a veces puede hacerse bajas la temperatura hasta 25 °C, 5 días después de que fermente a una temperatura más elevada, obteniéndose un aumento del rendimiento. [12]

3.3.2 pH

El pH es un factor importante que influye sobre el crecimiento de los microorganismos, los hongos pueden crecer en medios con pH hasta de 8.5, pero la mayoría de ellos prefieren un pH ácido y tienen la capacidad, como ocurre con algunas de las bacterias, de alterar el pH de un medio no amortiguado por los productos que generan durante su crecimiento.

En el caso de la producción del ácido kójico mediante *Aspergillus oryzae* existe un intervalo, ya que el pH óptimo de crecimiento depende en gran medida de los tipos de carbono o nitrógeno utilizados. Para la fase de crecimiento el pH más usado es cercano a 5, aunque el hongo siga creciendo a pH más bajos, el metabolismo del hongo se desvía hacia la producción de ácido kójico y no interesa hasta que el microorganismo crezca lo suficiente. Por ello el pH óptimo de crecimiento del *Aspergillus oryzae*, no es el mismo que el pH óptimo de producción de ácido kójico. [5, 19]

El mejor pH para la producción de ácido kójico es un intervalo de pH de 2 a 5, para la glucosa, se estudió utilizar el pH óptimo para la fermentación y el mejor rendimiento de ácido kójico se dio a un pH de 2.4. Pero a un pH muy cercano (2.2) la síntesis se reduce significativamente, por ello se recomienda usar un pH más alejado de este límite, un pH alrededor de 3 es el más adecuado para tener margen. [12, 15]

3.3.3 Agitación y aireación

Una de las variables más importantes en una fermentación aeróbica y además como la mayoría de los hongos requieren de oxígeno para su correcto desarrollo y crecimiento, la aireación es fundamental.

Las fermentaciones de ácido kójico a escala piloto e industrial generalmente se realizan utilizando fermentadores de tanque agitado, esta agitación facilita la transferencia de oxígeno, la mezcla de los nutrientes y mantiene la fermentación homogénea.

La mejor forma de aireación está en función del oxígeno disuelto en el medio y no es constante en toda la fermentación. Para fomentar el crecimiento del microorganismo se requiere mucho oxígeno, debido a la respiración celular y la formación de las enzimas que son responsables de la formación del ácido kójico, es por ello por lo que el crecimiento óptimo se dio con un nivel muy alto de tensión de oxígeno disuelto (DOT), sobre un 80% de saturación, 6.4 ppm. Sin embargo, cuando el crecimiento ya se detiene y empieza a formarse ácido kójico se debe disminuir bastante la DOT a un 30% de saturación, 2.4 ppm, así se evita una degradación excesiva del ácido kójico a otros compuestos.

Respecto a la agitación, las revoluciones óptimas dependen del tamaño del reactor, teniendo en cuenta que homogenice el contenido del fermentador y que sea rentable económica y energéticamente llegar a ciertas revoluciones. Para una planta piloto se indica una agitación entre 500 y 700 rpm para un fermentador de 3 litros e industrialmente, una agitación de 240 rpm para un tanque de 300 litros. Se recomienda, ya que los hongos filamentosos sufren mucho de estrés por tensión cortante producido por algunos agitadores, el uso de agitadores de hélice tipo Rushton.

[12]



Ilustración 7. Agitador Rushton

3.3.4 Técnica de fermentación

A la hora de realizar la fermentación existen diferentes técnicas para llevar a cabo la producción de ácido kójico según como estén las células de *Aspergillus oryzae* en el medio.

No se recomienda el cultivarlo en una superficie ya que es muy difícil de controlar parámetros fundamentales para el proceso, como el pH, la temperatura o la tensión de oxígeno disuelto. El cultivo líquido con membrana es interesante ya que ofrece un ahorro de energía al no tener agitación y una aireación más suave, pero existen problemas económicos y logísticos con el escalado a la hora de inocular esporas, extraer células y esterilizar material.

En sistemas con células resuspendidas tienen la ventaja de que producen ácido kójico libre de pigmentos y facilita la purificación, sin embargo, requiere materias primas y equipamiento extra para la resuspensión. Con células inmovilizadas permiten tener más concentración de microorganismo, pero tiene la desventaja que el rendimiento depende mucho del tamaño de la perla y se necesita una aireación mucho mayor que en otros métodos

Finalmente se escogió el cultivo sumergido para esta fermentación por la facilidad a la hora de controlar parámetros limitantes en la fermentación, facilidad para manipular los productos y las materias primas al estar suspendidas en líquido, fácil escalado y es el más económicamente rentable. [15]

3.4 Descripción del proceso

La fermentación de producción de ácido kójico por *Aspergillus spp.* se puede dividir en dos fases, primero ocurre la fase de crecimiento, donde el principal cambio en el medio es la reproducción del microorganismo, y después ocurre la fase de producción, que normalmente inicia cuando el crecimiento microbiano llega a una fase estacionaria y empieza la producción de ácido kójico.

En esta primera fase se empieza en el laboratorio, generalmente en un tubo liofilizado o congelado donde se conserva la cepa o una colonia de *Aspergillus oryzae* previamente seleccionada, el objetivo es aumentar la cantidad de este mediante sucesivos pasajes en frascos de volúmenes crecientes que estarán en agitadores en cámaras de cultivo. Posteriormente, el material obtenido se siembra en un tanque de inóculo de escala menor al que se usará posteriormente a escala industrial.

Después en la segunda fase, del tanque del inóculo se pasa al fermentador industrial cuyo volumen variará dependiendo de la concentración que se quiera obtener. Sin embargo, previamente a la etapa del tanque del inóculo y a esta, se debe preparar y esterilizar correctamente los medios que van a ser utilizados, además de reponer las materias primas utilizadas en el sustrato.

Con lo obtenido en la fermentación, se realiza un proceso de separación y purificación de los productos, primero se filtra lo obtenido para separar la materia insoluble, sin embargo, los licores de fermentación son difíciles de filtrar y se usan coadyuvantes. Posteriormente se busca purificar el producto, mediante una cristalización, el proceso inicia a partir de una solución concentrada, homogénea y caliente próxima a su límite de saturación, la cual es enfriada lentamente en un ambiente libre de contaminación hasta que unos pequeños cristales aparecen. Por último, se le realiza un secado, para que no queden nada de humedad en el producto final, haciendo que sea más fácil de manejar, reduce costes de transporte y puede ser almacenado de manera más práctica.

Con todo esto el ácido kójico obtenido es aislado y embalado. Sin embargo, es importante tener en cuenta los efluentes de subproductos que se puedan obtener, hay que controlar la calidad de estos y si es necesario tratarlos antes de que sean enviados a un curso de agua. [6]

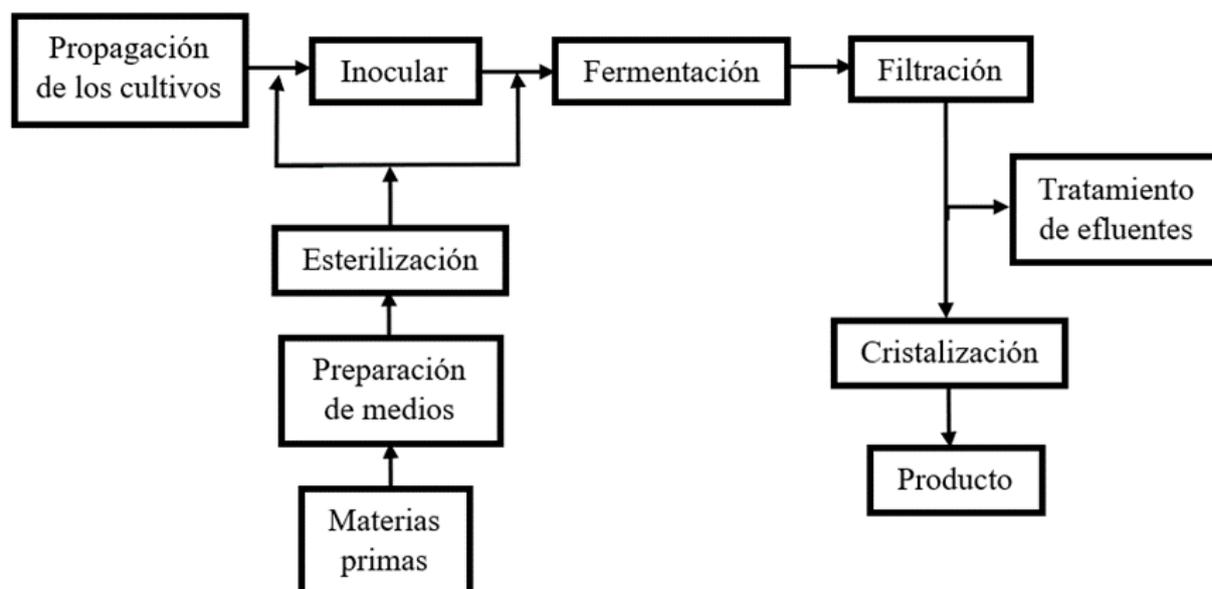


Ilustración 8. Diagrama resumen proceso

3.5 Descripción del equipo

3.5.1 Fase de crecimiento

Para el crecimiento del microorganismo, lo inicial y más importante será la selección de la cepa que se quiere hacer crecer, en este caso el microorganismo del cual queremos producir ácido kójico, *Aspergillus oryzae*, tienen un par de cepas, se ha escogido la cepa CECT 2094T según la colección española de cultivos tipo o la ATCC 1011 según la American Type Culture Collection, científicamente se conoce como *Aspergillus oryzae* var. *oryzae* (Ahlburg) Cohn 1884 y es suministrado como un cultivo liofilizado.

Los recipientes donde llevar a cabo el crecimiento del cultivo del cultivo serán varios, para llegar al volumen necesario para la producción del ácido kójico, se realizarán diversos pasajes de recipientes para aumentar la cantidad de cultivo aumentando el volumen de los recipientes escalonadamente.

Inicialmente el cultivo es depositado en un Erlenmeyer de volumen según escala industrial sobre un agitador de vaivén dentro de una cámara de cultivo para mantener la temperatura óptima.



Ilustración 10. Agitador de vaivén con Erlenmeyer



Ilustración 9. Cámara de cultivo

Posteriormente se pasan a recipientes muchos más grandes, si sobrepasan los 10L se recomiendan no usar matraces Erlenmeyer, utilizar reactores tipo piloto con agitación y una camisa para regular la temperatura. Todo este tipo de material además deberá estar correctamente esterilizado para que no estén presentes otros compuestos o microorganismos que puedan interferir en el crecimiento,

por ello necesitaremos a parte una autoclave, para esterilizar matraces Erlenmeyer y las partes del reactor piloto. El crecimiento del cultivo será de aproximadamente 13 días



Ilustración 12. Reactor de crecimiento



Ilustración 11. Autoclave

Antes de preparar el inóculo para pasar el microorganismo al tanque de fermentación se debe hacer un barrido de esporas, midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro de 500 a 600 nm, esto permitirá saber la concentración de esporas que se tiene en un mililitro de la disolución de crecimiento mediante una curva de calibración, este proceso es fundamental para pasar el inóculo en el momento exacto, con la mejor concentración para la fermentación. En la [ilustración 14](#) e [ilustración 15](#) se pueden ver ejemplos. [17]



Ilustración 13. Espectrofotómetro

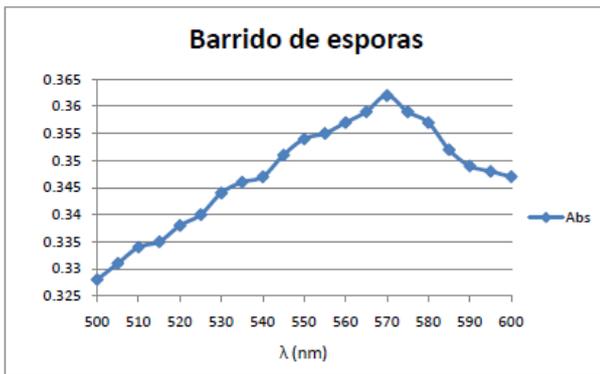


Ilustración 15. Barrido de concentración

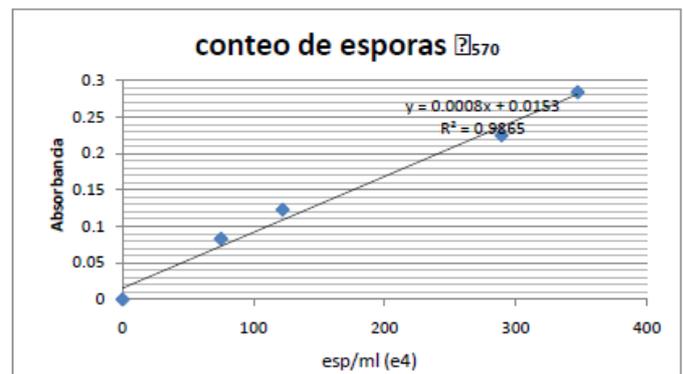


Ilustración 14. Curva de calibrado

3.5.2 Fase de producción

Para la parte principal y fundamental del todo el proceso, serán necesarios varios fermentadores refrigerados, con control de temperatura y con agitación. El número exacto de fermentadores y su volumen vendrá determinado de la producción y el estudio económico.

Si no se encuentran refrigerados, se instalará un intercambiador de calor para mantener siempre el rango de temperaturas óptimo a pesar de la disipación que se pueda dar en la propia fermentación.



Ilustración 16. Biorreactores para la fermentación

Pero estos equipos de mayor tamaño también se deben esterilizar entre diferentes lotes de fermentación, es por ello que con un autoclave es insuficiente y se debería instalar un sistema de vapor de agua para poder esterilizar complemente el equipo.

Para ir controlando la producción de ácido kójico existen varios métodos para comprobar que el proceso va correctamente, el ácido kójico absorbe en el ultravioleta lejano, sobre unos 280-284 nm, sin embargo, en el caldo fermentativo hay más compuesto que absorben en estas longitudes de onda y esta forma de medir el ácido kójico no sería del todo exacta.

Otra opción es la resonancia magnética o la cromatografía líquida (HPLC), esta segunda es más práctica, muchos laboratorios tienen un equipo de estos ya que son útiles para muchos análisis y será la que se utilice para el proceso y poder determinar si hay una buena producción, ya que la resonancia magnética, son equipos más complicado y poco prácticos de utilizar. [13, 17]



Ilustración 17. Equipo HPLC

3.5.3 Fase de separación y purificación

Para conseguir un producto lo más puro posible y que sea fácil de manipular para el envasado y el transporte después del proceso principal de fermentación se llevara lo obtenido a una fase final para dar un valor añadido al producto.

Primero se deberá filtrar el caldo fermentativo obtenido para separar los sólidos, se pasará por un sistema de filtros de un solo flujo que recorrerá varios filtros y desechará los sólidos separados como residuo.



Ilustración 18. Sistema de filtrado

Posteriormente se pasará a un cristalizador para formar cristales con el ácido kójico, al tener cristales y tener el producto en estado sólido, la facilidad logística a la hora de manejarlo, transportarlo le dará n valor añadido y ahorrará costes para poder vender el producto. Se utilizarán varios cristalizadores de un flujo de 10-30 L/h.



Ilustración 19. Cristalizador

Por último, se deberá deshidratar los cristales obtenidos mediante un secador continuo de soplado de aire, al eliminar el agua mejorarnos la vida útil del ácido kójico al tener baja humedad y es importante para comercializar el producto. Con un secador que trabaje en continuo con un flujo de 600 kg/h es suficiente para trabajar con lo que se quiere producir. [6]



Ilustración 20. Sistema de secado continuo

3.5.4 Fase de tratamientos de efluentes

El reglamento Directiva 91/271/CEE del Consejo de las Comunidades Europeas, de 21 de mayo de 1991, es el referido a las aguas residuales industriales y se destaca lo siguiente, las aguas residuales industriales normativa, deben pasar por procesos de saneamiento antes de verterse, deben tener ciertas características en cuanto a su composición química para considerarse aptas.

El montaje deberá incluir un equipo que pueda tomar con una arqueta muestras de forma libre, con la finalidad de hacer análisis químicos que determinen la viabilidad de vertido de las aguas.

Sin embargo, al tratarse de un bioproceso no hay grandes peligros en los subproductos que obtenemos de la fermentación del ácido kójico, pero al trabajar con microorganismos hay que tratar el agua, aunque en este caso el *Aspergillus oryzae* sea bastante seguro.

Lo más práctico es un tratamiento biológico, la materia orgánica es degradada por otras bacterias en un tanque bien aireado, produciendo dióxido de carbono, agua y compuestos nitrogenados como subproductos.

Lo esencial aquí es verter las aguas residuales con el microorganismo restante muerto, para que sea materia orgánica que las bacterias puedan degradar, se puede hacer esto con un cambio brusco de pH o temperatura. Si no se matan, los hongos pesan poco y su área superficial es grande y por lo tanto sedimentan mal, causando problemas de espuma en las depuradoras.

4 Cálculos

4.1 Base de cálculo

Para poder empezar con la parte experimental tenemos que saber cuánto vamos a querer producir para diseñar el proceso de producción de ácido kójico. Es importante saber cuánto es consumido para poder hacer una aproximación de cuanto se podría vender.

Sin embargo, información sobre el consumo, sobre todo en cosmética, del ácido kójico es bastante escasa, los proveedores de este producto a las empresas responsables de la fabricación de cremas o lociones son muy pocas y no publican los datos de sus ventas, ya que las empresas más importantes de este mercado se sitúan en China.

Desde el sector hay más información del consumo que tienen los alimentos que contienen ácido kójico en los grandes países, aunque es orientativo, muchos alimentos el ácido kójico lo obtienen por fermentación natural, por ello no se suele utilizar ácido kójico puro como materia prima. Estos datos hay que manejarlos con cuidado y analizar la situación actual adecuadamente.

De la información encontrada en el [artículo 2](#), sabemos cuánto se consume de alimentos fermentados tradicionalmente japoneses en dos países claves, EE.UU país de cultura occidental y Japón país oriental, las diferencias son destacables en el consumo de estos alimentos por tradición.

- Consumo EE.UU = 500 ml/persona/año
- Consumo Japón = 9800 ml/persona/año

Con la población de cada país al inicio de 2022 podemos calcular cuanta cantidad se consumió en todo un año natural. Después pasándolo a metros cúbicos se tienen cantidades que se pueden manejar más fácilmente.

$$\text{Consumo personal anual} \cdot \text{Población} = \text{Consumo total anual} \quad (4.1.1)$$

$$\begin{array}{l}
 \text{EE.UU} \quad 500 \frac{\text{ml}}{\text{persona}} \cdot 329500000 \text{ personas} = 1.6475 \cdot 10^{11} \frac{\text{ml}}{\text{año}} \\
 \text{Japón} \quad 9800 \frac{\text{ml}}{\text{persona}} \cdot 125800000 \text{ personas} = 1.2328 \cdot 10^{12} \frac{\text{ml}}{\text{año}}
 \end{array}$$

Siendo consumido en metros cúbicos cada año, 164750 en EE.UU y 1232840 en Japón. Además de media los alimentos fermentados japoneses que contienen ácido kójico poseen una concentración de 24 mg/ml se este compuesto o lo que es lo mismo 24000 g/m³. Con estos datos podemos obtener la masa que se consume de ácido kójico en estos países.

$$\text{Consumo total anual} \cdot \text{Concentración} = \text{Consumo á. kójico} \quad (4.1.2)$$

$$\begin{array}{l}
 \text{EE.UU} \quad 164750 \frac{\text{m}^3}{\text{año}} \cdot 24000 \frac{\text{g}}{\text{m}^3} = 3.95 \cdot 10^9 \frac{\text{g}}{\text{año}} = 3954 \frac{\text{ton}}{\text{año}} \\
 \text{Japón} \quad 1232840 \frac{\text{m}^3}{\text{año}} \cdot 24000 \frac{\text{g}}{\text{m}^3} = 2.95 \cdot 10^{10} \frac{\text{g}}{\text{año}} = 29588 \frac{\text{ton}}{\text{año}}
 \end{array}$$

Sabiendo que la planta industrial se situará en España y su población será los consumidores objetivos, utilizaremos como referencia a EE.UU sabiendo que es un país culturalmente occidental, por lo tanto se consumirán estos alimentos de forma parecida a España y sabiendo que el país norteamericano tiene un población 7 veces mayor que España.

Para la decisión de la base de cálculo, se ha considerado todo lo anterior además de tener en cuenta que las cantidades calculadas hacen referencia solamente a al sector de la alimentación, teniendo todo esto en cuenta se ha decidido utilizar una cantidad para la producción de 10 toneladas cada año de ácido kójico.

4.2 Cálculo del tamaño de los reactores

Ahora es necesario calcular el número de ciclos necesarios para cumplir el objetivo de producción de 10 toneladas en un año, sabiendo que la duración de cada fermentación puede llevar de 12 a 15 días se va a diseñar una planta industrial que esté en funcionamiento todo el año.

Con la intención de maximizar la producción, se van a tener en cuenta todos los días del año, no solo los días laborales, teniendo una plantilla de trabajadores que se dividirán por turnos para tener las horas de trabajo establecidas, además para facilitar los cálculos se utilizara el calendario comercial, donde se considera que todos los meses son 30 días.

$$\text{Días funcionamiento planta} = 360 \text{ días/año}$$

A estos 360 días se les descontará 15 días de mantenimiento, limpieza, revisiones u otras labores.

$$\text{Días funcionamiento planta} = 360 - 15 = 345 \text{ días/año}$$

Como se ha comentado antes cada fermentación puede durar de 12 a 15 días hasta que se complete y no produzca más ácido kójico, se utilizará como tiempo de ciclo 15 días, se considera el máximo tiempo posible en caso de previsión frente averías, imprevistos y se añaden también los tiempos de carga y descarga de los reactores.

$$\text{Tiempo del ciclo} = 15 \text{ días}$$

Con todo esto se puede calcular el número de ciclos que nos harán falta para cumplir la producción que queremos en un año, dividiendo los días de trabajo que se tienen en un año entre el tiempo de ciclo para cada fermentación.

$$\text{Número de ciclos} = \frac{\text{Días de funcionamiento}}{\text{Tiempo de ciclo}} \quad (4.2.1)$$

$$\text{Número de ciclos} = \frac{345 \text{ días/año}}{15 \text{ días}} = 23 \text{ ciclos/año}$$

Para calcular el tamaño de los reactores que se necesita para cumplir estos ciclos y conseguir 10 toneladas al final del año, hay que tener en cuenta el volumen que hay que tener para producir la cantidad de ácido kójico que se quiere.

De este proceso se obtendría, según el [artículo 5](#), supuestamente un rendimiento de 20 g/L de ácido kójico al final de la fermentación, es decir con 1 litro de caldo fermentativo después de que se dé el proceso se obtienen 20 gramos de ácido kójico, entonces se puede saber el volumen que se requiere para conseguir 10 toneladas de ácido kójico.

$$\text{Litros necesarios} = \frac{\text{Gramos de producto}}{\text{Rendimiento}} \quad (4.2.2)$$

$$\text{Litros necesarios} = \frac{10 \cdot 10^6 \text{ g}}{20 \text{ g/L}} = 5 \cdot 10^5 \text{ L} = 500 \text{ m}^3$$

Lo último para saber el tamaño de los fermentadores principales, con el volumen total que necesitamos y el número de ciclos que se tienen, se sacan los litros por ciclo y se puede estimar el tamaño del reactor.

$$\text{Litros por ciclo} = \frac{\text{Litros necesarios}}{\text{Número de ciclos}} \quad (4.2.3)$$

$$\text{Litros por ciclo} = \frac{5 \cdot 10^5 \text{ L}}{23} = 21739 \text{ L/ciclo} = 21.73 \text{ m}^3/\text{ciclo}$$

Este sería el volumen del fermentador que debería haber si queremos la producción estimada, sin embargo, un solo reactor de 22 m³ sería poco práctico, en caso de avería la producción automáticamente se pararía, lo que equivaldría a grandes pérdidas económicas.

Es más conveniente optar por una serie de reactores, en este caso se ha pensado dos opciones, 4 reactores con un volumen de 6 m³ cada uno o 11 reactores con un volumen de 2 m³ cada uno, se estudiarán la viabilidad económica de cada una de estas opciones más adelante, ya que en la primera opción son menos reactores, pero el volumen total es más alto que el que hemos calculado, por otro lado, la segunda opción es la inversa, hay muchos más reactores pero se ajusta más al volumen con el que queremos trabajar.

No obstante, los volúmenes de los que se ha hablado son volúmenes operativos, es necesario calcular los volúmenes reales de los fermentadores, que son los volúmenes con los que se deberán comprar los reactores. El volumen operativo hace referencia a todo lo que debe ser ocupado por

líquido, pero se necesita más volumen en el reactor que no esté ocupada por líquido, por ejemplo, al estar aireado, si no hay espacio suficiente para el aire liberado puede llegar a reventar.

En las plantas piloto se trabaja con una relación de volumen real del reactor–volumen operativo de 2:1.35 litros. Sabiendo el volumen operativo de escala industrial se puede calcular el volumen real de los fermentadores de escala industrial.

$$\left(\frac{\text{Volumen real}}{\text{Volumen operativo}} \right)_P = \left(\frac{\text{Volumen real}}{\text{Volumen operativo}} \right)_G \quad (4.2.4)$$

$$\left(\frac{2 \text{ Litros}}{1.35 \text{ Litros}} \right)_P = \left(\frac{x}{6000 \text{ Litros}} \right)_G$$

$$x = 8888.8 \text{ L} \approx 9 \text{ m}^3$$

$$\left(\frac{2 \text{ Litros}}{1.35 \text{ Litros}} \right)_P = \left(\frac{y}{2000 \text{ Litros}} \right)_G$$

$$x = 2962.96 \text{ L} \approx 3 \text{ m}^3$$

Ahora ya se sabe el volumen real que deben tener los fermentadores de las dos opciones de las que se hablado anteriormente, se deben comprar 4 reactores con un volumen de 9 m^3 o 11 reactores con un volumen de 3 m^3 .

4.3 Cálculo del diámetro y de la altura de los reactores industriales

Para llevar un procedimiento a la industria después de haber sido probado en el laboratorio, hay que escalar el proceso partiendo de la planta piloto utilizada para pruebas a pequeña escala pasando al diseño de los reactores industrial, mediante similitud geométrica, ya que es sencilla, precisa para las dimensiones del fermentador.

Anteriormente, se ha calculado el volumen que se necesita, ahora con el apoyo de un estudio de laboratorio donde se produce ácido kójico con características similares y con una planta piloto detallada, esto nos permitirá que el reactor industrial mantenga similitud geométrica con la planta piloto. Los datos de la planta piloto, facilitados en el [artículo 12](#), son los siguientes:

Diámetro del agitador	7 cm
Diámetro del recipiente	25 cm
Rpm del agitador	350 rpm
Volumen del reactor	20 litros

Tabla 5. Datos de la planta piloto

Para realizar el escalado, se ha de mantener la relación altura-diámetro de la planta piloto con el reactor industrial, de los datos de la planta piloto se tiene que calcular la altura mediante la fórmula del volumen del cilindro, forma de la planta piloto.

$$V = \pi \cdot \left(\frac{D}{2}\right)^2 \cdot H \quad (4.3.1)$$

Siendo V el volumen del reactor en metros cúbicos (m³), D hace referencia al diámetro del reactor en metros (m) y por último H es la altura del reactor en metros (m). Con todos los datos, se resuelve despejando la altura de la planta piloto.

$$0.02 = \pi \cdot \left(\frac{0.25}{2}\right)^2 \cdot H$$

$$H = 0.41 \text{ m}$$

$$\frac{H}{D} = \frac{410}{250} = 1.64 \quad H = 1.64D$$

Ahora con el conocimiento de la relación altura-diámetro que tiene la planta piloto, se puede trasladar a los fermentadores industriales. En la fórmula usada anteriormente, no se conoce ni la altura ni el diámetro, así que debemos sustituir algunos de estas dos incógnitas por la relación altura- diámetro. Para la opción de 4 reactores de un volumen de 9 m³ y despejando, se obtiene:

$$9 = \pi \cdot \left(\frac{D}{2}\right)^2 \cdot 1.64D$$

$$D = 1.9 \text{ m} \quad H = 1.64 \cdot 1.9 = 3.11 \text{ m}$$

Los fermentadores de esta opción deberán tener unas dimensiones de 1.9 metros de diámetro y 3.11 metros de altura. Para la otra opción de 11 reactores de 3 m³ y despejando, se obtienen lo siguiente:

$$3 = \pi \cdot \left(\frac{D}{2}\right)^2 \cdot 1.64D$$

$$D = 1.32 \text{ m} \quad H = 1.64 \cdot 1.32 = 2.16 \text{ m}$$

Los 11 fermentadores de esta opción tendrán unas dimensiones de diámetro iguales a 1.32 metros y de altura igual a 2.16 metros. Hay que tener en cuenta que estas medidas son aproximadas, a la hora de adquirir estos reactores las medidas no serán exactas y se buscara la mayor similitud posible.

4.4 Cálculo del diámetro y de la velocidad del agitador industrial

Para el escalado de la parte del agitador se usa las fórmulas de similaridad dinámica, en este caso es recomendable esta forma de escalado antes que por similaridad geométrica, ya que esta no se ajusta correctamente al agitador. Se mantendrá la potencia por unidad de volumen mediante la siguiente fórmula, los subíndices P e I hacen referencia a la planta piloto y a la escala industrial respectivamente.

$$\left(\frac{P}{V}\right)_P = \left(\frac{P}{V}\right)_I \quad (4.4.1)$$

Sabiendo la siguiente igualdad que sirve para este caso, ya que es la potencia por unidad de volumen en un reactor de tanque agitado, se puede sustituir la anterior expresión. Siendo ρ la densidad del medio en kg/m³, N el número de revoluciones por minuto (rpm) y Da corresponde al diámetro del agitador medido en metros (m). Se obtiene la igualdad que se muestra en la [expresión 4.4.3](#).

$$\frac{P}{V} = \frac{\rho \cdot N^3 \cdot Da^5}{Da^3} \quad (4.4.2)$$

$$\left(\frac{\rho \cdot N^3 \cdot Da^5}{Da^3}\right)_P = \left(\frac{\rho \cdot N^3 \cdot Da^5}{Da^3}\right)_I \quad (4.4.3)$$

Se anulan las densidades ya que el medio será el mismo en el interior de ambos reactores, además se puede simplificar más la expresión si dividimos los diámetros de agitación entre ellos, obteniéndose lo siguiente:

$$(N^3 \cdot Da^2)_P = (N^3 \cdot Da^2)_I \quad (4.4.4)$$

Una vez obtenida la expresión se puede dar paso al cálculo del diámetro del agitador industrial y de la velocidad que tenga este, se hará uso del diámetro del reactor previamente calculado y de los datos de la planta piloto expuestos en el apartado anterior. Para la primera opción de 4 fermentadores de 9 m³, primero calcularemos el diámetro del agitador a escala industrial y después sustituiremos en la fórmula anterior;

$$\left(\frac{D_{reactor}}{Da}\right)_P = \left(\frac{D_{reactor}}{Da}\right)_I \quad (4.4.5)$$

$$\frac{0.25}{0.07} = \frac{1.9}{Da}$$

$$Da = 0.532 \text{ m}$$

$$(350^3 \cdot 0.07^2) = (N^3 \cdot 0.532^2)$$

$$N = 90.54 \text{ rpm}$$

Los fermentadores de 9 m³ deberán tener un agitador de diámetro 532 mm y una velocidad de giro sobre las 91 rpm, si redondeamos. Ahora se repiten los mismos cálculos anteriores para la opción de 11 reactores de 3 m³ :

$$\frac{0.25}{0.07} = \frac{1.32}{Da}$$

$$Da = 0.3696 \text{ m}$$

$$(350^3 \cdot 0.07^2) = (N^3 \cdot 0.3696^2)$$

$$N = 115.43 \text{ rpm}$$

Si utilizáramos esta opción, se necesitarían adquirir unos agitadores de un diámetro 370 mm aproximadamente y utilizarlos a una velocidad de giro de unos 115 rpm.

4.5 Cálculo del escalado de tanques de crecimiento

El crecimiento de los cultivos se realiza normalmente en el laboratorio y comienza generalmente en un tubo liofilizado o congelado donde se conserva la cepa de interés o de una colonia del microorganismo previamente seleccionada.

Se deba aumentar la cantidad del microorganismo para poder producir la cantidad de ácido kójico deseado, se suelen hacer sucesivos pasajes de recipientes de volumen creciente según la escala industrial que se usará posteriormente. Usando de referencia el volumen operativo calculado los recipientes de crecimiento debe tener una relación respecto a la escala industrial de 1000, 500, 50 a 1 según el [artículo 6](#), de menor a mayor volumen hasta que pasa al fermentador.

Estos recipientes incluyen desde matraces Erlenmeyer en agitadores de vaivén para los volúmenes más pequeños hasta tanques con agitadores rotatorios para los volúmenes más grandes. Recordando las opciones que teníamos se puede calcular los volúmenes necesarios para el crecimiento, 4 reactores con un volumen operativo de 6 m³ o 11 reactores con un volumen operativo de 2 m³.

	Relación	6 m ³	2 m ³
Recipiente 1	1:1000	6 L	2 L
Recipiente 2	1:500	12 L	4 L
Recipiente 3	1:50	120 L	40 L

Tabla 6. Cálculo volumen tanques crecimiento

4.6 Balance de materia

Para obtener la cantidad que se quiere producir de ácido kójico debemos hacer crecer el microorganismo en un sustrato muy bien controlado, para después la fermentación se lleve a cabo correctamente y con la producción que se ha trabajado.

La reacción principal ocurre dentro del fermentador, aquí entran en juego las materias primas que se han escogido previamente, teniendo en cuenta que para el *Aspergillus oryzae* no se ha encontrado fórmula química y se ha optado por utilizar la del *Aspergillus niger*, un hongo de su mismo género, también se podría haber optado por la fórmula del microorganismo promedio, sabiendo esto y que la reacción que se da en los bioprocesos es la siguiente:

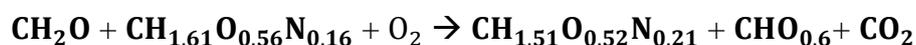


Fuente de carbono	Glucosa	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$
Fuente de nitrógeno	Extracto de levadura	$\text{CH}_{1.61}\text{O}_{0.56}\text{N}_{0.16}$
Biomasa	<i>Aspergillus oryzae</i>	$\text{CH}_{1.51}\text{O}_{0.52}\text{N}_{0.21}$
Productos	Ácido kójico	$\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_4$

Tabla 7. Componentes balance materia fermentación

Ahora, se puede determinar cuál es el balance de materia que se da en el interior del fermentador, es importante recalcar que se trabajará con la formulación química en relación carbono-mol (C-mol), ya que facilita la cinética a la hora de trabajar con microorganismos y las relaciones estequiométricas.

El agua se descarta del balance de materia, al trabajar en un cultivo sumergido, es decir en una disolución de agua, este elemento está presente tanto como reactivo como producto, por lo tanto, carece de importancia a la hora de tenerlo en cuenta. Quedándose así la reacción:



Para ajustar este balance de materia, se hizo uso de los rendimientos del *Aspergillus oryzae* y del ácido kójico por C-mol de glucosa, estos rendimientos se encontraron en el [artículo 18](#) y en el [artículo 9](#), respectivamente.



$y_{X/S}$	0.36
$y_{P/S}$	0.50

Tabla 8. Rendimientos bibliográficos

Para el ajuste, se deben calcular el resto de los coeficientes estequiométricos, con los balances de materia del nitrógeno y del carbono como elementos, se pueden calcular el rendimiento de dióxido de carbono generado y la cantidad de extracto de levadura gastado.

$$\text{Nitrógeno} \quad a \cdot 0.16 = y_{X/S} \cdot 0.21 \quad (4.6.1)$$

$$\text{Carbono} \quad 1 + a = y_{X/S} \cdot y_{P/S} \cdot y_{\text{CO}_2/S} \quad (4.6.2)$$

$$a \cdot 0.16 = 0.36 \cdot 0.21$$

$$a = 0.4725$$

$$1 + 0.4725 = 0.36 \cdot 0.5 \cdot y_{\text{CO}_2/S}$$

$$y_{\text{CO}_2/S} = 0.6125$$

Con estos valores solo faltaría calcular el coeficiente del oxígeno, para ello es necesario plantear el siguiente balance de energía:

$$\gamma_S - 4b = y_{X/S} \cdot \gamma_X + y_{P/S} \cdot \gamma_P \quad (4.6.3)$$

En este balance de energía, se hace uso de los grados de reducción del sustrato, de la biomasa y del producto, que hacen referencia a los electrones disponibles que tienen estos compuestos, son sencillos de calcular al saber las fórmulas químicas de cada uno.

$$\gamma_S = 4 \cdot 1 + 1 \cdot 2 - 2 \cdot 1 = 4$$

$$\gamma_X = 4 \cdot 1 + 1 \cdot 1.51 - 2 \cdot 0.52 - 3 \cdot 0.21 = 3.84$$

$$\gamma_P = 4 \cdot 1 + 1 \cdot 1 - 2 \cdot 0.6 = 3.8$$

Sustituyendo y despejando se obtiene el coeficiente estequiométrico del oxígeno.

$$4 - 4b = 0.36 \cdot 3.84 + 0.5 \cdot 3.8$$

$$b = 0.1794$$

Con todos estos datos calculados hasta el momento, se puede incluso calcular la cantidad de oxígeno que se ha usado durante la fermentación, mediante la fórmula del consumo de oxígeno.

$$OC = b/y_{X/S} \quad (4.6.4)$$

$$OC = \frac{0.1794}{0.36} = 0.4983 \text{ moles consumidos de } O_2$$

Finalmente nos quedaría un balance de materia ajustado con los siguientes coeficientes estequiométricos:



4.7 Cálculo de las cantidades necesarias de sustrato

A continuación, se van a calcular las cantidades necesarias de todos los componentes que necesita el sustrato para que tanto el crecimiento como la fermentación se dé correctamente y se generen la cantidad deseada de ácido kójico.

Una vez realizado el balance de materia, con la misma producción usada a la hora de diseñar el reactor y que nos indican en el [artículo 5](#) (20 g/L), se procede al cálculo de la cantidad de glucosa necesaria para cada reactor, para un ciclo y para la producción total de ácido kójico.

Como se ha calculado hasta el momento, se va a comparar las 2 opciones que se han diseñado, también para la cantidad de sustrato, ya que este depende en gran medida de el volumen de los reactores que se usen. Primero se calcula la producción final de ácido kójico de 1 reactor, para las opciones de volúmenes operativos de 6 m³ y de 2 m³.

$$6 \text{ m}^3 \quad \text{Producción al final del proceso de 1 reactor} = 20 \cdot 6000 = 120000 \text{ g}$$

$$2 \text{ m}^3 \quad \text{Producción al final del proceso de 1 reactor} = 20 \cdot 2000 = 40000 \text{ g}$$

Sabiendo el rendimiento de ácido kójico respecto a la glucosa ($y_{P/S} = 0.5$) y la producción de un reactor, es fácil sacar la cantidad de glucosa que nos hará falta en ese reactor para obtener esa cantidad de ácido kójico.

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Producción de 1 reactor}}{\text{g de glucosa}} \quad (4.7.1)$$

$$0.5 = \frac{120000}{\text{g de glucosa}} \quad \text{6 m}^3 \qquad \qquad \qquad \text{2 m}^3 \quad 0.5 = \frac{40000}{\text{g de glucosa}}$$

$$\text{g de glucosa} = 240000 \text{ g} = 240 \text{ kg}$$

$$\text{g de glucosa} = 80000 \text{ g} = 80 \text{ kg}$$

Esta es la cantidad de glucosa necesaria para un reactor, ahora para buscar la cantidad total es necesario tener en cuenta todos los reactores y todos los ciclos.

6 m³	2 m³
Glucosa 1 ciclo = 240 · 4 = 960 kg	Glucosa 1 ciclo = 80 · 11 = 880 kg
Glucosa total = 960 · 23 = 22080 kg	Glucosa total = 880 · 23 = 20240 kg

Primero multiplicando por el número de reactores y después por el número de ciclos se tiene la cantidad de glucosa total que se necesitara para obtener las 10 toneladas de ácido kójico que se quieren al año.

	Kg glucosa 6 m³	Kg glucosa 2 m³
1 reactor	240	80
1 ciclo	960	880
Total	22080	20240

Tabla 9. Resumen cantidad glucosa

En el mismo [artículo 5](#) donde se podía encontrar la producción, también se indica la composición del sustrato utilizado, a nivel de laboratorio, para llegar a esa producción. Con esta información se tienen las relaciones con los otros compuestos y se pueden calcular las cantidades que se necesitan para escalar esta productividad a escala industrial. El sustrato indicado tiene los siguientes valores:

Glucosa	100 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
KH₂PO₄	1.5 g/L
MgSO₄ · 7H₂O	0.5 g/L

Tabla 10. Composición sustrato planta piloto

En este proceso la glucosa es el componente mayoritario con mucha diferencia sobre el resto, esto se debe a la importancia de que la fuente de nitrógeno sea el reactivo limitante, ya que en la fermentación o es necesario, sin embargo, el carbono sigue siendo fundamental para producir ácido kójico. Por ello, el extracto de levadura tiene una ración pequeña respecto a la glucosa de 0.05.

6 m³

2 m³

$$\text{Ext. levadura 1 reactor} = 240 \cdot 0.05 = 12 \text{ kg}$$

$$\text{Ext. levadura 1 reactor} = 80 \cdot 0.05 = 4 \text{ kg}$$

$$\text{Ext. levadura 1 ciclo} = 960 \cdot 0.05 = 48 \text{ kg}$$

$$\text{Ext. levadura 1 ciclo} = 880 \cdot 0.05 = 44 \text{ kg}$$

$$\text{Ext. levadura total} = 22080 \cdot 0.05 = 1104 \text{ kg}$$

$$\text{Ext. levadura total} = 20240 \cdot 0.05 = 1012 \text{ kg}$$

	Kg ext. levadura 6 m³	Kg ext. levadura 2 m³
1 reactor	12	4
1 ciclo	48	44
Total	1104	1012

Tabla 11. Resumen cantidad extracto de levadura

La fuente de fosfato, en este caso el fosfato monopotásico, no destaca por su gran concentración, pero su papel es fundamental durante el crecimiento, los hongos con capaces de crecer correctamente con concentraciones no muy altas, si se aumentará mucho más la cantidad de fosfatos el crecimiento aumentaría considerablemente pudiendo afectar a la fermentación posterior. Tiene una relación con la glucosa de 0.015.

6 m³**2 m³**

$$\text{KH}_2\text{PO}_4 \text{ 1 reactor} = 240 \cdot 0.015 = 3.6 \text{ kg}$$

$$\text{KH}_2\text{PO}_4 \text{ 1 reactor} = 80 \cdot 0.015 = 1.2 \text{ kg}$$

$$\text{KH}_2\text{PO}_4 \text{ 1 ciclo} = 960 \cdot 0.015 = 14.4 \text{ kg}$$

$$\text{KH}_2\text{PO}_4 \text{ 1 ciclo} = 880 \cdot 0.015 = 13.2 \text{ kg}$$

$$\text{KH}_2\text{PO}_4 \text{ total} = 22080 \cdot 0.015 = 331.2 \text{ kg}$$

$$\text{KH}_2\text{PO}_4 \text{ total} = 20240 \cdot 0.015 = 303.6 \text{ kg}$$

	Kg KH₂PO₄ 6 m³	Kg KH₂PO₄ 2 m³
1 reactor	3.6	1.2
1 ciclo	14.4	13.2
Total	331.2	303.6

Tabla 12. Resumen cantidad fosfato monopotásico

Los minerales también son fundamentales en el crecimiento, en este caso el sulfato de magnesio heptahidratado, ayudan a las células y a los órganos a desempeñar sus respectivas funciones, pero incluso se necesita menos cantidad que la fuente de fosfato para que los hongos crezcan adecuadamente, tiene una relación con la glucosa muy pequeña, de 0.005.

6 m³**2 m³**

$$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \text{ 1 reactor} = 240 \cdot 0.005 = 1.2 \text{ kg}$$

$$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \text{ 1 reactor} = 80 \cdot 0.005 = 0.4 \text{ kg}$$

$$\text{KMgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \text{ 1 ciclo} = 960 \cdot 0.005 = 4.8 \text{ kg}$$

$$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \text{ 1 ciclo} = 880 \cdot 0.005 = 4.4 \text{ kg}$$

$$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \text{ total} = 22080 \cdot 0.005 = 110.4 \text{ kg}$$

$$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \text{ total} = 20240 \cdot 0.005 = 101.2 \text{ kg}$$

	Kg MgSO₄ · 7H₂O 6 m³	Kg MgSO₄ · 7H₂O 2 m³
1 reactor	1.2	0.4
1 ciclo	4.8	4.4
Total	110.4	101.2

Tabla 13. Resumen cantidad sulfato de magnesio heptahidratado

Por último, en el [artículo 15](#), se hace hincapié en que el metanol es un estimulante de uso bastante común en la producción de ácido kójico, sin embargo, en los artículos

científicos no se suele incluir en el sustrato, pero para escala industrial tiene un gran interés ya que mejora el rendimiento. Este compuesto se añade en una cantidad minúscula para que no tenga interfiera en el crecimiento y solo afecta en el tamaño de la burbuja en la aireación, comúnmente se añade en una concentración de 10^{-2} mol/L.

$$10^{-2} \frac{\text{mol}}{\text{L}} \cdot 32.04 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 0.3204 \text{ g/L}$$

Con la masa molecular del metanol obtenemos los gramos que debe haber por litro, es una cantidad muy pequeña que tiene una relación respecto a la glucosa de 0.003204.

6 m³**2 m³**Metanol 1 reactor = $240 \cdot 0.003204 = 0.77$ kg Metanol 1 reactor = $80 \cdot 0.003204 = 0.26$ kgMetanol 1 ciclo = $960 \cdot 0.003204 = 3.07$ kg Metanol 1 ciclo = $880 \cdot 0.003204 = 2.82$ kgMetanol total = $22080 \cdot 0.003204 = 70.74$ kg Metanol total = $20240 \cdot 0.003204 = 64.85$ kg

	Kg metanol 6 m³	Kg metanol 2 m³
1 reactor	0.77	0.26
1 ciclo	3.07	2.82
Total	70.74	64.85

Tabla 14. Resumen cantidad metanol

4.8 Cálculo ajuste pH para la fermentación

Uno de los factores que diferencia la fase de crecimiento y la fase de producción, es el pH. Para que el microorganismo no siga reproduciéndose y empiece a utilizar el sustrato restante para generar las enzimas que produzcan el ácido kójico, el pH debe reducirse a uno más ácido para favorecer este cambio.

Normalmente para reducir el pH de una mezcla se añade cierta cantidad de un ácido fuerte, por facilidad para adquirirlo comercialmente y ser un ácido monoprótico que facilita los cálculos para saber el volumen necesario, se ha elegido el ácido clorhídrico (HCl).

Se saben según las referencias del [artículo 5](#) y del [artículo 15](#), los pH óptimos de cada fase del proceso, 5 para la fase de crecimiento y 3 para la fase de producción, el pH se define como el logaritmo negativo en base 10 de la actividad de los iones hidrogeno, utilizando esta expresión se puede calcular que concentración de protones debe haber en cada fase para corresponderse al pH que se quiere.

$$\text{pH} = -\log [\text{H}^+] \quad (4.7.1)$$

$$5 = -\log [H^+]$$

$$[H^+] = 1 \cdot 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$$

$$3 = -\log[H^+]$$

$$[H^+] = 1 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$$

La diferencia de la concentración nos indicará la cantidad de moles protones que debemos añadir para reducir el pH, al tratarse de un ácido monoprótico, la cantidad de ácido a añadir será la misma.

$$\Delta[H^+] = 1 \cdot 10^{-3} - 1 \cdot 10^{-5} = 0.00099 \frac{\text{mol}}{\text{l}}$$

Hay que tener en cuenta que la cantidad de moles calculada es por litro, por ello con los volúmenes operativos necesarios para la cantidad de ácido kójico que se quiere, se calcula la cantidad de moles total para las dos opciones trabajadas.

$$6 \text{ m}^3 \quad 0.00099 \frac{\text{mol}}{\text{l}} \cdot 6000 \text{ l} = 5.94 \text{ moles HCl}$$

$$2 \text{ m}^3 \quad 0.00099 \frac{\text{mol}}{\text{l}} \cdot 2000 \text{ l} = 1.98 \text{ moles HCl}$$

Se necesitarían este número de moles para añadir a cada fermentador, si se utilizara una disolución 1M HCl sería la misma cantidad de litros los que habría que añadir. Sin embargo, comercialmente y en cantidades industriales el ácido clorhídrico no suele venderse en esas concentraciones, lo más económicamente rentable por precio y cantidad es una disolución al 35 % de HCl en agua, por lo que deberíamos recalcular los volúmenes.

Pureza	0.35
Densidad disolución	1.174 kg/l
Peso molecular	36.458 g/mol

Tabla 15. Características disolución HCl

$$1174 \frac{\text{g}}{\text{l}} \cdot 0.35 = 411 \frac{\text{g}}{\text{l}}$$

$$\frac{411 \frac{\text{g}}{\text{l}}}{36.458 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = 11.27 \frac{\text{mol}}{\text{l}}$$

$$\frac{5.94 \text{ mol}}{11.27 \frac{\text{mol}}{\text{l}}} = 0.527 \text{ l}$$

$$\frac{1.98 \text{ mol}}{11.27 \frac{\text{mol}}{\text{l}}} = 0.176 \text{ l}$$

Estos volúmenes serían los que habría que añadir en cada fermentador si se utilizará la disolución anteriormente nombrada en cada fermentador, el volumen total será teniendo en cuenta todos los fermentadores de las diferentes opciones, 4 reactores con un volumen operativo de 6 m³ o 11 reactores con un volumen operativo de 2 m³.

6 m³

2 m³

$$\text{HCl 1 ciclo} = 0.527 \cdot 4 = 2.108 \text{ l}$$

$$\text{HCl 1 ciclo} = 0.176 \cdot 11 = 1.936 \text{ l}$$

$$\text{HCl total} = 2.108 \cdot 23 = 48.48 \text{ l}$$

$$\text{HCl total} = 1.936 \cdot 23 = 44.53 \text{ l}$$

	HCl (L) 6 m ³	HCl (L) 2 m ³
1 reactor	0.527	0.176
1 ciclo	2.108	1.936
Total	48.48	44.53

Tabla 16. Resumen cantidad HCl

5 Estudio económico

Para este análisis económico se va a trabajar como se ha hecho anteriormente, comparando las dos opciones vistas, 4 reactores con un volumen real 9 m^3 y 11 reactores con un volumen total de 3 m^3 . Este punto será fundamental a la hora de decidir la alternativa más rentable, ya que las 2 tienen la misma producción.

5.1 Presupuesto de inversión

El presupuesto de inversión se trata de una operación donde se reflejan todas las inversiones de financiación iniciales, es decir se trata de las sumas de los costos de toda la maquinaria, el equipo y el terreno necesarios para el comienzo y desarrollo del proceso. Estos valores se han obtenido en base a equipos similares a través de catálogos y páginas de venta online.

Equipos	Unidades	Precio unidad (€)	Precio total (€)
Instrumentos varios (matraces, basculas, agitadores, pipetas)	1	1500	1500
Espectrofotómetro	1	940	940
Cámara de cultivo	1	1597	1597
Reactor de crecimiento 120 L	4	2477	9908
Fermentador 9 m^3	4	14718	58872
Sistema de filtrado	1	30023	30023
Cristalizador	4	147255	589020
Secador	1	29452.5	29452.5
Autoclave	1	547	547
Sistema de vapor de agua	1	12000	12000
pH-metros, oxímetros y termómetros	1	1000	1000
Nave industrial	1	200000	200000
HPLC	1	24515	24515
Total			959374.5

Tabla 17. Presupuesto de inversión para 4 fermentadores

Para esta opción habrá que desembolsar una cantidad cercana al millón de euros para tener las herramientas necesarias y comenzar la producción.

Presupuesto de inversion para 4 reactores = 959374.5 €

Equipos	Unidades	Precio unidad (€)	Precio total (€)
Instrumentos varios (matraces, basculas, agitadores, pipetas)	1	1500	1500
Espectrofotómetro	1	940	940
Cámara de cultivo	1	1597	1597
Reactor de crecimiento 40 L	7	990	6930
Fermentador 3 m ³	11	8665	95315
Sistema de filtrado	1	30023	30023
Cristalizador	3	147255	441765
Secador	1	29452.5	29452.5
Autoclave	1	547	547
Sistema de vapor de agua	1	12000	12000
pH-metros, oxímetros y termómetros	1	1000	1000
Nave industrial	1	200000	200000
HPLC	1	24515	24515
Total			845584.5

Tabla 18. Presupuesto de inversión para 11 fermentadores

Esta otra opción se necesitaría menos cantidad para invertir inicialmente y poder comenzar la producción, serí también cercana al millón de euros, pero menos cantidad que la primera opción.

Presupuesto de inversion para 11 reactores = 845584.5 €

De los precios más significativos se van a detallar las características que se han seguido para obtener un precio orientativo:

- Para los reactores de crecimiento y fermentadores se ha tenido en cuenta las dimensiones y el volumen que se han calculado con anterioridad para buscar el producto más similar, además se han buscado que incluyeran sistema de aireado, agitación con los agitadores requeridos, calefactados y con monitoreo para control de temperatura y pH.
- Los cristalizadores incluidos son funciones de evaporador de vacío y concentración a baja temperatura para que la purificación del ácido kójico sea del 99%, también tiene pantalla de monitoreo para el control de los parámetros que afectan a la cristalización.

- En el sistema de filtrado continuo se incluye en el precio recambios en los filtros para un año, el precio se ha estimado según el tipo de filtrado, por fujo horizontal.
- De la misma manera el secador para eliminar el agua restante tiene el precio medio de los secadores por soplado de aire de flujo horizontal.

5.2 Presupuesto de explotación

Un presupuesto de explotación es una previsión para estimar los costes que lleva mantener la producción durante un año. En este presupuesto se tienen en cuenta varios costes y se representa como la suma de los salarios de los empleados, el coste de materias primas, energía y agua, además del mantenimiento y la amortización de la maquinaria.

Para poder realizar un presupuesto de explotación con mayor exactitud, los costes exactos serán conocidos una vez realizado el primer año de producción, en este caso se utilizarán valores aproximados para poder tener un valor para poder estimar.

Los costes más importantes son los costes de las materias primas, como se sabe la cantidad necesaria para lo que se quiere producir de ácido kójico que se ha calculado con anterioridad solo se ha buscado el precio por kilo o por litro.

Materias primas	Cantidad	Precio unidad/Kg/L (€)	Precio total año (€)
Glucosa	22080 kg	3.52	77721.6
Extracto de levadura	1104 kg	4.04	4460.16
KH ₂ PO ₄	331.2 kg	2.74	907.488
MgSO ₄ ·7H ₂ O	110.4 kg	2.76	304.704
Metanol	70.74 kg	1.68	118.8432
HCl	48.48 L	1.4	67.872
<i>Aspergillus oryzae</i>	46 unidades	87	4002
Total			87582.6672

Tabla 19. Costes materias primas para 4 fermentadores

De la primera opción todo lo que necesitamos de reactivos para poder producir ácido kójico en un año cuesta cerca de los cien mil euros.

$$\text{Costes materias primas para 4 reactores} = 87582.67 \frac{\text{€}}{\text{año}}$$

Materias primas	Cantidad	Precio unidad/Kg/L (€)	Precio total año (€)
Glucosa	20240 kg	3.52	71244.8
Extracto de levadura	1012 kg	4.04	4088.48
KH ₂ PO ₄	303.6 kg	2.74	831.864
MgSO ₄ ·7H ₂ O	101.2 kg	2.76	279.312
Metanol	64.85 kg	1.68	108.948
HCl	44.53 L	1.4	62.342
<i>Aspergillus oryzae</i>	69 unidades	87	6003
Total			82618.746

Tabla 20. Costes materias primas para 11 fermentadores

Muy parecido al total de la opción anterior, el coste de las materias primas se acerca a casi los cien mil euros anuales.

$$\text{Costes materias primas para 11 reactores} = 82618.75 \frac{\text{€}}{\text{año}}$$

En este caso las materias primas hay algunas en unidades de cantidad distintas, la mayoría se ha trabajado en kilogramos ya que forman parte del sustrato y se ha mantenido la relación de gramo de materia prima por litro de sustrato. Sin embargo, otras materias primas de gran importancia como el microorganismo esta por unidades, es debido a que se vende por cepas, en tubos de ensayo liofilizados, teniendo en cuenta el número de ciclos y los tanques de crecimiento que se tiene para cada una de las dos opciones se necesitan diferente número de tubos, a más reactores de crecimiento más cepas necesitamos en cada opción.

Por otro lado, está el ácido clorhídrico que está en litros ya que aparte de ser una disolución al 35 %, se añade al fermentador previamente al inóculo para hacer descender el pH.

Los precios se han obtenido de diferentes empresas proveedoras de reactivos químicos, para compuesto existe un rango bastante amplio de precios y esto es donde más puede variar según la empresa que te los proporcione.

Lo siguiente son los gastos que vienen de los sueldos de los trabajadores que están encargados del control y correcto funcionamiento de la planta. Se contratarán un jefe de planta para la supervisión y organización, y operarios para las diferentes tareas de la planta, los sueldos se han estimado por el sueldo medio de un ingeniero químico en estos cargos en España.

Personal	Unidades	Salario anual (€)	Total anual (€)
Jefe de planta	1	28776	28776
Operarios de planta	6	17484	104904
Total			133680

Tabla 21. Salarios trabajadores para 4 fermentadores

$$\text{Salarios para 4 reactores} = 133680 \frac{\text{€}}{\text{año}}$$

En este caso se han supuesto seis operarios de planta, si se organiza correctamente el inicio de las fermentaciones y del crecimiento con dos operarios se puede realizar todo el trabajo de planta, sin embargo, la planta está en funcionamiento las 24 horas entonces por turnos de 8 horas se necesitarán mínimo 3 turnos.

Personal	Unidades	Salario anual (€)	Total anual (€)
Jefe de planta	1	28776	28776
Operarios de planta	9	17484	157356
Total			186132

Tabla 22: Salarios trabajadores para 11 fermentadores

$$\text{Salarios para 11 reactores} = 186132 \frac{\text{€}}{\text{año}}$$

Entre las 2 opciones hay una diferencia destacable en los costes de los salarios esto es debido a que, a mayor número de fermentadores, aunque sean de menor cantidad harán falta más operarios para poder controlarlos todos, en este caso se han supuesto 9 operarios, es decir como se ha explicado anteriormente 3 operarios por turno.

Uno de los gastos anuales más destacable es junto a las materias primas, los gastos energéticos sobre todo al tratarse de una planta industrial de un tamaño considerable y tener fermentadores de unos volúmenes considerables y estar trabajando las 24 horas del día durante más de semana en cada ciclo.

Equipos	Unidades	kW/unidad	kW	h/ciclo	ciclos/año	h/año	kWh/año	€/kWh	costes (€/año)
Cámara de cultivo	1	0.35	0.35	104	23	2392	837.2	0.19	159.068
Reactor de crecimiento 120 L	4	3.7	14.8	104	23	2392	35401.6	0.19	6726.304
Fermentador 9 m ³	4	26.4	105.6	360	23	8280	874368	0.19	166129.92
Sistema de filtrado	1	2.8	2.8	360	23	8280	23184	0.19	4404.96
Cristalizador	4	22.5	90	200	23	4600	414000	0.19	78660
Secador	1	45	45	40	23	920	41400	0.19	7866
Autoclave	1	2	2	5	23	115	230	0.19	43.7
Energía extra	1	4.6	4.6			8760	40296	0.19	7656.24
Total									271646.192

Tabla 23. Costes energéticos para 4 fermentadores

$$\text{Costes energéticos para 4 reactores} = 271646.19 \frac{\text{€}}{\text{año}}$$

Equipos	Unidades	kW/unidad	kW	h/ciclo	ciclos/año	h/año	kWh/año	€/kWh	costes (€/año)
Cámara de cultivo	1	0.35	0.35	104	23	2392	837.2	0.19	159.068
Reactor de crecimiento 40 L	7	1.23	8.61	104	23	2392	20595.12	0.19	3913.0728
Fermentador 3 m ³	11	8.8	96.8	360	23	8280	801504	0.19	152285.76
Sistema de filtrado	1	2.8	2.8	360	23	8280	23184	0.19	4404.96
Cristalizador	4	22.5	90	200	23	4600	414000	0.19	78660
Secador	1	45	45	40	23	920	41400	0.19	7866
Autoclave	1	2	2	5	23	115	230	0.19	43.7
Energía extra	1	4.6	4.6			8760	40296	0.19	7656.24
Total									266230.626

Tabla 24. Costes energéticos para 11 fermentadores

$$\text{Costes energéticos para 11 reactores} = 266230.63 \frac{\text{€}}{\text{año}}$$

Se ha utilizado una tarifa de 0.19 €/kWh que corresponde a un plan de empresas de Iberdrola, y aun teniendo un plan adaptado para empresas los costes energéticos son altos en las dos opciones, por el motivo de estar en funcionamiento muchos días seguidos y grandes volúmenes y maquinarias que requieren mucha potencia.

Se ha incluido el gasto energético (Energía extra) que pueda necesitar la nave industrial para las luces, otros gastos del laboratorio, zona de comida y cena de los trabajadores, entre otros, incluyendo 4.6 kW que es lo que se usa de media en un día en una casa u oficina.

Los gastos de agua en contra son bastante menores que los energéticos ya que no hay tanta maquinaria que utilice agua, sin embargo, para la actividad principal, crecimiento y fermentación, el agua es fundamental.

Equipos	Unidades	L/unidad	L/ciclo	ciclos/año	L/año	Coste (€/L)	Coste(€/año)
Reactor de crecimiento 120 L	4	100	400	23	9200	0.0019	17.48
Fermentador 9 m ³	4	5940	23760	23	546480	0.0019	1038.312
Total							1055.792

Tabla 25. Coste agua para 4 fermentadores

$$\text{Costes agua para 4 reactores} = 1055.79 \frac{\text{€}}{\text{año}}$$

Equipos	Unidades	L/unidad	L/ciclo	ciclos/año	L/año	Coste (€/L)	Coste(€/año)
Reactor de crecimiento 40 L	7	30	210	23	4830	0.0019	9.177
Fermentador 3 m ³	11	1990	21890	23	503470	0.0019	956.593
Total							965.77

Tabla 26. Coste agua para 11 fermentadores

$$\text{Costes agua para 11 reactores} = 965.77 \frac{\text{€}}{\text{año}}$$

Suponemos el coste medio en España de agua, según la comunidad varían los precios, pero se utilizará la tarifa media, en este caso 0.0019 €/L. El agua no supone un gran desembolso anual para ninguna de las dos opciones, pero hay que tenerla en cuenta porque es necesaria para la producción de ácido kójico, pero en el downstream ya no lo es tanto y por ello no se usa en tanta cantidad. Hay que tener en cuenta que, aunque los reactores tengan un volumen de 9 m³ y 3 m³,

su volumen operativo es de 6 m³ y 2 m³ respectivamente, que es el volumen hasta donde puede ir el fermentador lleno de líquido.

En el presupuesto de explotación hay que tener también en cuenta el presupuesto de inversión con el mantenimiento de la maquinaria adquirida para poder iniciar la producción, antes posibles averías, limpieza, cambios de piezas o paradas para revisión de todas las herramientas, se tienen en consideración un 10% de los gastos de inversión para hacer frente a estas actividades.

	% Presupuesto de inversión	Total (€/año)
Coste de mantenimiento de la maquinaria	10%	95937.45

Tabla 27. Coste de mantenimiento para 4 fermentadores

$$\text{Costes mantenimiento para 4 reactores} = 95937.45 \frac{\text{€}}{\text{año}}$$

	% Presupuesto de inversión	Total (€/año)
Coste de mantenimiento de la maquinaria	10%	84558.45

Tabla 28. Costes de mantenimiento para 11 fermentadores

$$\text{Costes mantenimiento para 11 reactores} = 84558.45 \frac{\text{€}}{\text{año}}$$

El último coste que se tiene en cuenta para el presupuesto de explotación son los costes de amortización, que son los costes reservados a amortizar el presupuesto de inversión en cierta cantidad de tiempo. La amortización por año se considera igual a la depreciación sufrida ese mismo año, pero para mantener flujos de caja iguales todos los años se usa el método de la depreciación lineal.

$$D = \frac{V_a}{n} \quad (5.2.1)$$

De esta expresión es necesario saber la inversión inicial (V_a) o el presupuesto de inversión, los años de vida útil que tienen la maquinaria (n) o los años en los que los quieres amortizar, con estos dos parámetros se obtiene la depreciación (D).

Equipos	Inv. Inicial (€)	Vida útil (año)	Depreciación(€/año)
Instrumentos varios (matraces, basculas, agitadores, pipetas)	1500	5	300
Espectrofotómetro	940	5	188
Cámara de cultivo	1597	5	319.4
Reactor de crecimiento 120 L	9908	5	1981.6
Fermentador 9 m ³	58872	5	11774.4
Sistema de filtrado	30023	5	6004.6
Cristalizador	589020	5	117804
Secador	29452.5	5	5890.5
Autoclave	547	5	109.4
Sistema de vapor de agua	12000	5	2400
pH-metros, oxímetros y termómetros	1000	5	200
Nave industrial	200000	5	40000
HPLC	24515	5	4903
Total			191874.9

Tabla 29. Coste amortizaciones para 4 fermentadores

$$\text{Costes amortización para 4 reactores} = 191874.9 \frac{\text{€}}{\text{año}}$$

Equipos	Inv. Inicial (€)	Vida útil (año)	Depreciación(€/año)
Instrumentos varios (matraces, basculas, agitadores, pipetas)	1500	5	300
Espectrofotómetro	940	5	188
Cámara de cultivo	1597	5	319.4
Reactor de crecimiento 40 L	6930	5	1386
Fermentador 3 m ³	95315	5	19063
Sistema de filtrado	30023	5	6004.6
Cristalizador	441765	5	88353
Secador	29452.5	5	5890.5
Autoclave	547	5	109.4
Sistema de vapor de agua	12000	5	2400
pH-metros, oxímetros y termómetros	1000	5	200
Nave industrial	200000	5	40000
HPLC	24515	5	4903
Total			169116.9

Tabla 30. Costes amortización para 11 fermentadores

$$\text{Costes amortización para 11 reactores} = 169116.9 \frac{\text{€}}{\text{año}}$$

Para este caso se han supuesto 5 años de vida útil, pero no haciendo referencia a que los equipos en cinco años vayan a dejar de funcionar o se queden obsoletos, sino más bien en que se quiere amortizar el gasto inicial invertido a 5 años vista y a partir de ahí poder obtener beneficios.

Finalmente conociendo todos estos gastos podemos obtener el presupuesto de explotación total anual de la planta con la suma de los diferentes costes.

$$\begin{aligned} \text{Presupuesto de explotación} = & \text{Costes materias primas} + \text{Costes} \\ & \text{de salarios} + \text{Costes energéticos} + \text{Costes de agua} + \text{Costes} \\ & \text{mantenimiento} + \text{Costes de amortización} \end{aligned} \quad (5.2.2)$$

	Presupuesto de explotación (€)
9 m ³	781777
3 m ³	789622.49

Tabla 31. Presupuesto de explotación total

5.3 Análisis de rentabilidad

Para realizar el análisis de rentabilidad se va a emplear el *VAN*, *TIR* y el *Pay-Back*. Es necesario conocer el desembolso inicial, el cual será el presupuesto de inversión, así como el flujo de caja, el cual se puede calcular con lo anteriormente obtenido.

Lo primero es decidir el precio de venta de nuestro producto, cuantos euros costará un kilogramo de ácido kójico, se han buscado precios de varios catálogos y existe un rango amplio de precios, desde los 75 € hasta los 150 € dependiendo del proveedor. En este caso se ha elegido un precio intermedio.

Producto		
A. kójico (kg/año)	Precio (€/kg)	Total (€/año)
10000.00	100	1000000.00

Tabla 32. Precio de venta del ácido kójico

Con el total obtenido de las ventas y el presupuesto de explotación, el flujo de caja anual se obtiene a partir de la siguiente expresión:

$$\text{Flujo de caja} = \text{Ventas} - \text{Presupuesto de explotación} \quad (5.3.1)$$

	Flujo de caja (€/año)
9 m ³	218223
3 m ³	210377.51

Tabla 33. Flujo de caja

Con la cantidad de ácido kójico que producimos cada año. y el presupuesto de explotación, se puede saber cuánto nos cuesta a nosotros fabricar un kilogramo de ácido kójico, mediante la siguiente formula:

$$\text{Coste fabricacion} = \frac{\text{Presupuesto de explotación}}{\text{Kg fabricados}} \quad (5.3.2)$$

	Coste de fabricación(€/año)
9 m ³	78.18
3 m ³	78.96

Tabla 34. Coste de fabricación del ácido kójico

5.3.1 VAN

El VAN es el valor actual neto, lo que se traduce como un criterio de inversión con el que conocer cuánto se va a ganar o perder con la inversión. Se puede calcular mediante la siguiente expresión, Donde D_0 es el desembolso inicial, F el flujo de caja, t es el valor de períodos, en este caso cada uno

de los años lo mismo para n y k hace referencia al tipo de descuento o tipo de interés exigido en la inversión.

$$VAN = -D_0 + \sum_{t=1}^n \frac{F}{(1+k)^t} \quad (5.3.1.1)$$

- Un $VAN > 0$ es el objetivo puesto que se generarán beneficios.
- Un $VAN = 0$ se traduce en que la inversión no generará ni pérdidas ni beneficios.
- Un $VAN < 0$ significará que se pierde dinero por lo que esta opción no interesa en absoluto.

La inversión inicial corresponde al presupuesto de inversión, el número de periodos se mantienen los 5 años en los cuales se busca amortizar la inversión inicial, mientras que el tipo de interés se encuentran entre un 5% y un 100%, para buscar el caso más desfavorable se utilizará un 5 %.

	VAN (€)
9 m ³	131740.49
3 m ³	65240.01

Tabla 35. VAN

Como el $VAN > 0$ en los dos casos, la inversión generará beneficios en el periodo propuesto.

5.3.2 TIR

La tasa interna de retorno (TIR) es la rentabilidad que ofrece una inversión. Es decir, es el porcentaje de beneficio o pérdida que tendrá una inversión para las cantidades que no se han retirado del proyecto.

Se ha indicado con anterioridad que el tipo de interés suele encontrarse entre un 5% y un 100%, ya que ofrecen los valores más reales, esto es debido que para considerar que la inversión es rentable este tiene que estar entre esos valores, una cantidad menor al 5%, tendrá un margen de riesgo frente a beneficios demasiado bajo y, por otro lado, valores mayores al 100% tendrían un beneficio descomunal y no se ajustan a la realidad.

La fórmula del TIR genera un VAN igual a 0. Entonces la siguiente expresión consiste en despejar el tipo de interés (k) de la misma expresión del VAN, pero igualada a 0. Comparando las dos tasas de interés obtenidas se pueden llegar a conclusiones sobre la inversión.

$$0 = -D_0 + \sum_{t=1}^n \frac{F}{(1+k)^t} \quad (5.3.2.1)$$

- Si $k_{TIR} > k_{VAN}$, la inversión puede llevarse a cabo ya la tasa de rendimiento que se obtiene es superior a la tasa mínima de rentabilidad exigida a la inversión.
- Si $k_{TIR} = k_{VAN}$, estaríamos en una situación similar a cuando el VAN era cero.
- Si $k_{TIR} < k_{VAN}$, el proyecto no debe llevarse a cabo puesto que no se alcanza la rentabilidad mínima.

	TIR
9 m ³	4 %
3 m ³	8 %

Tabla 36. TIR

En los dos casos el valor de TIR calculado, la tasa de rendimiento obtenida es mayor que la tasa de rentabilidad mínima del VAN (5%), por ello la inversión es válida y puede llevarse a cabo.

5.3.3 PAY-BACK

El pay-back o plazo de recuperación es un criterio para evaluar inversiones que se define como el periodo de tiempo requerido para recuperar el capital inicial de una inversión. Es un método estático para la evaluación de inversiones. Se calcula mediante la siguiente expresión:

$$T = \frac{D_0}{F} \quad (5.3.3.1)$$

Donde T indica el número de años que se tarda en recuperar el desembolso inicial, F es el valor del flujo de caja y D_0 es el desembolso inicial.

	Pay-Back (años)
9 m ³	4.39
3 m ³	4.02

Tabla 37. Pay-back

El desembolso inicial se recuperará en las dos opciones en menos de los 5 años previstos inicialmente, en los casos cerca de los 4 años.

6 Conclusiones

A modo de cierre de este proyecto, se puede afirmar que se han cumplido los objetivos que se habían planteado y se ha logrado el diseño de un proceso para la obtención de ácido kójico a nivel industrial. Durante su realización, se ha trabajado y adquirido los siguientes conocimientos:

- Se ha comprobado el uso de los bioprocesos como alternativa sostenible a los procesos químicos para la síntesis de gran variedad de productos, dando posibilidad a la economía circular.
- A partir de los artículos de referencia, se ha buscado, comparado, estudiando y seleccionado diferentes alternativas para la realización del bioproceso, condiciones externas, reactivos, equipos y procesos, justificando los parámetros elegidos más apropiados según la información seleccionada.
- Mediante el proyecto se ha conseguido escalar una planta industrial capaz de producir 10 toneladas de ácido kójico anuales a partir de una planta piloto de laboratorio, utilizando reglas de similaridad geométrica y similaridad dinámica.
- Se han comparado dos posibles escenarios de organización para la producción a escala industrial, mediante el análisis económico con datos de catálogos online y estimando la viabilidad con técnicas como el VAR o el TIR.
- Se ha observado la similitud entre las dos opciones de organización, la que más interesa es la que mayor rentabilidad nos ofrezca, el escenario de utilizar 4 reactores de 9 m³ es la mejor alternativa, ya que a largo plazo nos ofrece más beneficio a pesar de tener una inversión mayor.

Sin embargo, para llevar a aplicar el proceso a la industria actual, se debe seguir trabajando en la evaluación y análisis económico continuado del diseño y desarrollar otros factores que pueden afectar al diseño, ya que en este proyecto se ha trabajado con una simplificación para determinar que puede ser viable llevar este proceso para una producción mayor.

Por último, con este trabajo de final de grado se resume en una síntesis de conocimientos, actitudes y habilidades integrados a lo largo de los cuatro cursos académicos, en los que se ha trabajado el

estudio del bioproceso, selección del microorganismo y otros parámetros, determinación de cantidad de materias primas a partir del balance de materia, el escalado o el análisis de la viabilidad económica.

7 Bibliografía

- [1]. Bentley, R. (2006). From miso, saké and shoyu to cosmetics: a century of science for kojic acid. *Natural Product Reports* 23, 1046-1062.
- [2]. Burdock, G. A., Soni, M. G., & Carabin, I. G. (2011). Evaluation of Health Aspects of Kojic Acid in Food. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 33, 80-101.
- [3]. Chang, P.-K., Horn, B., & Gomi, K. A. (2014). *Aspergillus*. *Encyclopedia of Food Microbiology*, Volume 1, 62-66.
- [4]. EL-AASAR, S. (2006). Cultural Conditions Studies on Kojic Acid Production by *Aspergillus parasiticus*. *Int. J. Agri. Biol.*, Vol. 8, No. 4, 468-473.
- [5]. El-Kady, I. A., Zohri, A. N., & Hamed, S. R. (2014). Kojic Acid Production from Agro-Industrial By-Products Using Fungi. *Hindawi Publishing Corporation. Biotechnology Research International*, 10.
- [6]. Fernández Cazarez, A. E. (s.f.). Optimización de la producción de ácido kójico vía fermentativa: escalamiento del proceso a 20 litros. Instituto Tecnológico de Colima.
- [7]. García, M. C., Morales, S. G., Rodríguez, A. V., & Olivo, A. R. (2018). Efecto de la agitación en la producción de ácido kójico mediante hongos filamentosos. *Journal CIM* Vol. 6, Núm. 1, 1711-1716.
- [8]. Gomi, K. (2014). *Aspergillus oryzae*. *Encyclopedia of Food Microbiology*, Volume 1, 92-96.
- [9]. Kwak, M. Y., & Rhee, J. S. (1992). Cultivation Characteristics of Immobilized *Aspergillus oryzae* for Kojic Acid Production. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 39, 903-906.
- [10]. M.Sauer, D.Mattanovich, & H.Marx. (2014). 12 - Microbial production of organic acids for use in food. *Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals*, 288-320.
- [11]. Mendoza, G., Ricalde, V., & Hernández, G. (2017). Estructura del almidón. En G. Mendoza, V. Ricalde, & G. Hernández, *Alimentación de ganado bovino con dietas*. ISBN: 978-607-28-1031-0.
- [12]. Nava Arrguín, J. L. (2011). Determinación de los parámetros óptimos de operación de un fermentador para la producción de ácido kójico. Instituto Tecnológico de Colima.
- [13]. Ola, A. R., Metboki, G., Lay, C. S., Sugi, Y., Rozari, P. D., Darmakusuma, D., & Hakim, E. H. (2019). Single Production of Kojic Acid by *Aspergillus flavus* and the Revision of Flufuran. *Molecules* 24, 4200, 1-6.
- [14]. Ortíz, O. L., Arango, S. M., & Devia, J. L. (2019). Aplicaciones biotecnológicas de los microorganismos. *NOVA*, 17 (31), 129-163.

- [15]. Rosfarizan, M., Mohd Shamzi, M., Nurashikin, S., Madihah Mohd, S., & Arbakariya B., A. (2010). Kojic acid: Applications and development of. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 24-37.
- [16]. Siddiquee, S. (2018). Recent Advancements on the Role of Biologically Active Secondary Metabolites from *Aspergillus*. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, 69-94.
- [17]. Silva Valdez, G. (2011). Obtención de la concentración óptima de sustrato para producción de ácido kójico con *aspergillus oryzae*. Instituto Tecnológico de Colima.
- [18]. Verseveld, H. W., Metwally, M., Sayed, M. e., Osman, M., Schrickx, J. M., & Stouthamer, A. H. (1991). Determination of the maximum product yield from glucoamylase-producing. *Antonie van Leeuwenhoek* 60, 313-323.
- [19]. Yamada, R., Yoshie, T., Wakai, S., Asai-Nakashima, N., Okazaki, F., Ogino, C., Kondo, A. (2014). *Aspergillus oryzae*-based cell factory for direct kojic acid production from cellulose. *Microbial Cell Factories* 13, 71-79.