



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

CAMPUS D'ALCOI

Diseño del proceso de bioproducción de ácido láctico a partir de residuos de la agricultura

MEMORIA PRESENTADA POR:

Xiomara Isabel Escobar Carrera

GRADO DE INGENIERIA QUIMICA

Convocatoria de defensa: septiembre 2019

Resumen

En este proyecto se lleva a cabo el diseño de una planta de bioproducción de ácido láctico a partir de residuos de la agricultura, para ser más concretos de la melaza. Se plantea su viabilidad, así como los pros y contras de usar este tipo de materia prima. Se ha llevado a cabo su escalado con las condiciones óptimas, el equipamiento necesario para producir una cantidad de la cuota de mercado e incluso para poder ampliarlo con el tiempo, con un proceso de purificación que actualmente es aquél en que se obtiene mayor cantidad de producto. También se llevó a cabo la estimación de costes y su amortización, junto con una parte de la legislación que regula el riesgo y la protección de este proceso.

Resum

En aquest projecte es du a terme el diseny d'una planta de bioproducció d'àcid làctic a partir de residus de l'agricultura, per a ser més concrets de la melassa. Es planteja la seua viabilitat, així com els pros i contres d'utilitzar aquest tipus de matèria prima. S'ha dut a terme el seu escalat amb les condicions més òptimes, l'equipament necessari per a produir una quantitat de la quota de mercat i inclús per poder ampliar-ho amb el temps, amb un procés de purificació que actualment és aquell en què s'obté major quantitat de producte. També es va dur a terme l'estimació de costos i la seua amortització, junt amb una part de la legislació que regula el risc i la protecció d'aquest procés.

Abstract

In this project is carried out the design of a bioproduction plant of lactic acid from agricultural residues, to be more precise of the molasses. It's considered his viability, as well as the pros and cons of using this type of raw material. It has been carried out his scaling with the optimal conditions, the necessary equipment to produce an amount of the market share and even to expand it in the course of time, with a purification process that is currently the one in which the greatest amount of product is obtained. Cost estimation and amortization was also carried out, together with a part of the legislation that regulates the risk and protection of this process.

Índice

1	Introducción	6
1.1	Ácido láctico	6
1.2	Cómo funciona el ácido láctico	9
1.3	Obtención	11
1.4	Materias primas	14
1.5	Bioproceso específico informativo	15
2	Objetivos	17
3	Procedimiento experimental	18
3.1	Materia prima	18
3.2	Microorganismo	18
3.3	Medio de cultivo y fermentación a escala laboratorio	21
3.3.1	Preparación del inóculo	21
3.3.2	Fermentación a escala laboratorio del ácido láctico	22
3.4	Material del Biorreactor	22
3.5	Elementos adicionales	23

4	Diseño experimental	24
4.1	Escalado	24
4.1.1	Comprobación de la densidad constante	25
4.1.2	Planta piloto	26
4.1.3	Planta industrial	27
4.1.4	Cinética	28
4.1.5	Producción	32
4.1.6	Sistema de intercambio de calor	33
4.1.7	Tanques de almacenaje	37
4.2	Modo de operación	39
4.2.1	Downstream	39
4.2.2	Diagrama de proceso	40
5	Resultados experimentales	42
5.1	Producción de ácido láctico	42
5.2	Método de purificación	43
6	Estimación de costes	45

6.1	Estudio de mercado	45
6.2	Coste inicial	46
6.3	Gastos anuales	49
6.3.1	Materias primas	49
6.3.2	Gastos de personal	50
6.3.3	Gasto energético	51
6.3.4	Otros gastos	51
6.4	Amortización	52
6.4.1	Beneficios	52
6.4.2	Cálculo amortización	52
7	Riesgo, seguridad y medio ambiente	54
8	Conclusiones	57

Índice de figuras

1	Estructura del ácido láctico.[2]	7
2	Ruta metabólica del ácido láctico [6]	9
3	Esquema de las dos vías de síntesis química del ácido láctico.	11
4	Esquema del bioproceso	16
5	Comparación de la producción de ácido láctico a partir de melaza sin pasteurizar y pasteurizada: a la izquierda sin tratar y a la derecha pasteurizada, con diferentes concentraciones.[13]	19
6	Micrografía electrónica de barrido en el caso de la figura A y de transmisión en la figura B, de la cepa aislada .[16]	20
7	Variación de la relación de potencia-volumen en función de la densidad.	25
8	Simulación realizada con Matlab-Simulink de la cinética de nuestro proceso, obteniendo la concentración de azúcar y la producción de ácido láctico.	31
9	Simulación realizada con Matlab-Simulink de la cinética de nuestro proceso, obteniendo la concentración de biomasa.	32
10	Diagrama de proceso	41
11	Estudio de mercado hasta el 2025.	46

Índice de tablas

1	Tabla de las características fisicoquímicas del ácido láctico.	7
2	Tabla de los datos cinéticos experimentales.	30
3	Tabla de los resultados experimentales.	42
4	Tabla de los costes.	48
5	Tabla de los gastos.	50
6	Tabla de los costes de personal.	51

1 Introducción

1.1 Ácido láctico

El ácido láctico o ácido 2-hidroxiopropanoico según la IUPAC, es un compuesto orgánico natural producido por nuestro organismo como consecuencia del metabolismo glucolítico anaeróbico de la glucosa. Fue descubierto en 1.780 por Carl Wilhelm Scheele, al aislarlo de la leche agria, aunque no fue hasta el siglo XIX cuando primero Blondeaur (al reconocerlo como un producto de la fermentación) y posteriormente Littleton al iniciar la fermentación a escala industrial, cuando alcanzo un gran interés en la industria.[1] La fórmula química del ácido láctico es $C_3H_6O_3$, con la estructura espacial que podemos ver en la [Figura 1](#) y un peso molecular de 90,080 g/mol. Es una molécula ácido alfa-hidroxi, esto se debe a que tiene un grupo hidroxilo (-OH) y un grupo carboxílico (-COOH), que están unidos al mismo carbono. Este carbono es quiral o asimétrico, es decir, los cuatro sustituyentes son diferentes, siendo los otros dos sustituyentes un átomo de hidrógeno y un grupo metilo, lo que además de proporcionarle isomería óptica, al tener un centro quiral, provoca que tenga dos enantiómeros como se puede ver en la [Figura 1](#). El ácido láctico que es metabolizado por el cuerpo es el enantiómero L(+).

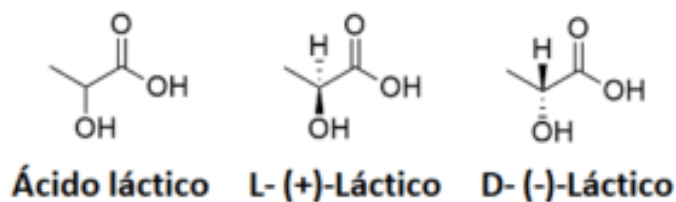


Figura 1: Estructura del ácido láctico.[2]

El ácido láctico puede ser un líquido incoloro, en el caso de estar formado por la mezcla racémica, o un polvo blanco, si tenemos el enantiómero puro. Tiene una densidad de 1,029 g/mL, su punto de fusión y ebullición son de 16,8°C y 122°C y es un ácido orgánico débil con un pKa de 3,86. El ácido láctico es soluble en agua y en disolventes orgánicos polares y tiene una volatilidad baja. Otras características fisicoquímicas se pueden ver en la [Tabla 1](#). [3]

Parámetros fisicoquímicos	
Color	Blanco o incoloro
Estado	Sólido o líquido
Densidad (g/mL)	1.029
Peso molar(g/mol)	90.08
Temperatura de fusión	18°C
Temperatura de ebullición	122 °C
Compuesto	Orgánico
Soluble	Disolventes polares
Grupo	Ácido carboxílico
Ácido o base	Ácido débil
pKa	3.86

Tabla 1: Tabla de las características fisicoquímicas del ácido láctico.

Las aplicaciones del ácido láctico son muy variadas, se encuentra en distintos campos como la medicina, industria cosmética, alimenticia, química, etc. En medicina se usa especialmente en medicamentos para diferentes usos como terapia de deficiencia de calcio; también se usa en vía intravenosa como isotónico para la reanimación después de la pérdida de sangre. En cosmética para suavizar la piel como alternativa a la glicerina, como químico antiedad, o como limpiador. En la industria alimentaria como conservante y aromatizante de alimentos así como en la química para fabricar detergentes y señuelos para mosquitos. Además de estas aplicaciones hay una que es también muy importante como es en la producción de ácido poliláctico (APL), un polímero biodegradable que se encuentra dentro de los bioplásticos, con una amplia variedad de aplicaciones. Se estima que la demanda de ácido láctico crece entre un 5-8% anualmente, y actualmente se tiene una demanda mundial de alrededor de 367,300 toneladas. [4]

Aunque hasta hace pocos años se pensaba que el ácido láctico, referido erróneamente ya que es lactato lo que almacenamos en el cuerpo era el causante del dolor muscular y la fatiga, actualmente esta afirmación está siendo replanteada. En realidad, al ser un desecho del metabolismo de la glucosa por medio anaeróbico el lactato se acumula de forma habitual en nuestro organismo y se cree actualmente que es la acidosis causada por el aumento de la concentración de protones $[H^+]$ en la misma vía de formación del lactato como subproducto el que puede provocar estos síntomas de dolor muscular. [5]

1.2 Cómo funciona el ácido láctico

Para entender un poco como actúa el ácido láctico en el cuerpo se tiene que explicar la ruta metabólica de este, que podemos ver en la [Figura 2](#). El ácido láctico se produce en el metabolismo anaeróbico en concreto la glucólisis anaeróbica. La glucosa que se encuentra en el citoplasma de la célula muscular, ya sea almacenada en forma de glucógeno o libre, se consume en la generación de energía (en forma de ATP) produciendo piruvato siempre y cuando no tengamos suficiente energía por medio de la glucólisis aeróbica. A continuación, el piruvato pasaría al ciclo de Krebs, un ciclo aeróbico, en el cual tras varios pasos se genera mucha más energía en forma de ATP, CO₂ y H₂O. Cuando no existe suficiente oxígeno para ir por la ruta aeróbica, al

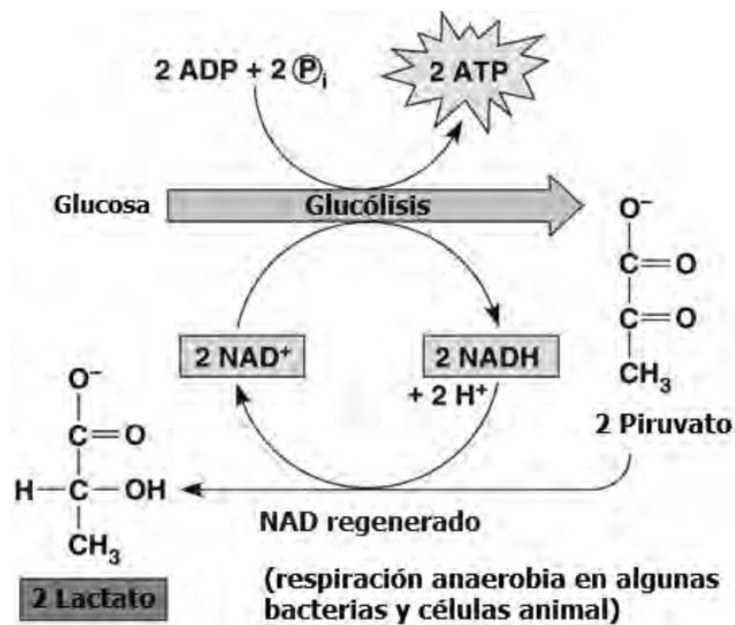


Figura 2: Ruta metabólica del ácido láctico [6]

el organismo realizar un esfuerzo extra, el piruvato sigue otra ruta diferente al ciclo de Krebs, ruta anaeróbica, convirtiéndose en lactato y regenerando el NAD. Debido al pH de los músculos el lactato permanece en su forma no disociada. Por último, el NAD y los productos de la glicólisis anaeróbica provocan la transformación de la Coenzima A en acetil Coenzima A, que vuelve a entrar en el ciclo de Krebs. [7]

El ácido láctico o lactato funciona preferentemente para producir energía en caso de insuficiencia de oxígeno y regenerar subproductos que se puedan introducir de nuevo en el ciclo de Krebs. Como ya hemos comentado anteriormente, solo la forma enantiómera L(+) es la única que puede ser metabolizada por el organismo humano. Por el contrario un exceso de ácido láctico o lactato en el organismo no es beneficioso y se puede producir por un mal funcionamiento de los riñones en la eliminación de este ácido. Entre otros síntomas el cambio a pH ácido puede provocar mal aliento, confusión, ictericia o dificultad para respirar, aunque tiene otros síntomas con menor probabilidad. [8]

Aunque la forma enantiómera L(+) es la única que es metabolizada por el cuerpo, la producción comercial genera tanto formas puras enantiómeras(L(+) o D (-)) como la forma racémica, dependiendo exclusivamente del uso que se le quiera dar, así como del tipo de microorganismos que se use en la fermentación.

1.3 Obtención

El ácido láctico se puede obtener por dos métodos diferentes, por vía química y biotecnológica. La síntesis química se basa en hacer reaccionar acetaldehído con ácido cianhídrico(HCN), que da lugar a lactonitrilo, y este puede ser hidrolizado a ácido láctico. Otra reacción requiere de unas condiciones de alta presión del acetaldehído con monóxido de carbono y agua en presencia de ácido sulfúrico como catalizador. La síntesis química tiene como desventaja más importante que el ácido láctico producido es una mezcla de D y L ópticamente inactivos y se utilizan reactivos y se generan productos que pueden ser altamente tóxicos y nocivos como ácido cianhídrico, ácido sulfúrico concentrado. Se puede ver un esquema en la [Figura 3](#).

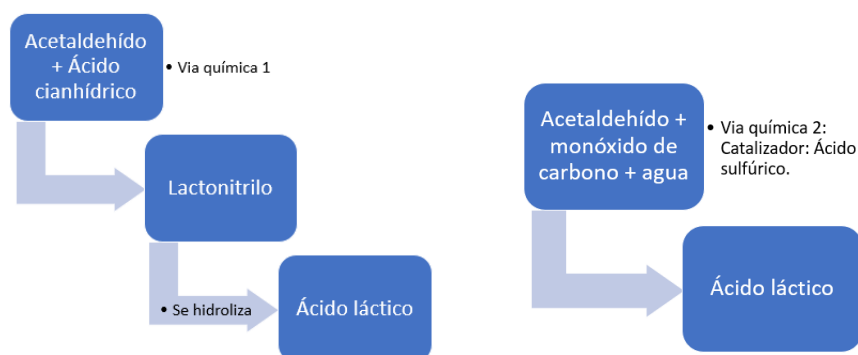


Figura 3: Esquema de las dos vías de síntesis química del ácido láctico.

La producción biotecnológica se basa en la fermentación de sustratos ricos en carbohidratos por bacterias u hongos, y su principal ventaja es la formación de los enantiómeros, D(-) y L(+), ópticamente activos, o de la mezcla racémica si se necesitara. Esta producción a nivel biotecnológico depende

principalmente de:

- El microorganismo utilizado.
- El pH.
- La temperatura.
- La recirculación del microorganismo o inmovilización.
- La fuente de carbono.
- La fuente de nitrógeno.
- etc

Como existen diferentes formas de que se produzca por este medio, también tenemos diferentes métodos para que sea más eficiente o menos costoso. Los estudios previos indican que la utilización de bacterias tipo termófilas (de fermentación rápida) es un buen punto de partida para la bioproducción de ácido láctico. Entre este tipo de bacterias destacan, entre otras, la de los géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, etc. Entre otras, las características que tienen estos géneros es que tienen una alta tolerancia a pH inferiores a 5, la temperatura óptima de crecimiento oscila entre lo 20 y 45°C, estas características les da ventaja sobre otras bacterias.

Aunque el genero *Lactobacillus* y todas las bacterias tipo LAB se utilizan de forma común a nivel industrial para la fermentación anaeróbica ácido-láctica tienen la gran desventaja de que producen exclusivamente la forma racémica

del ácido láctico. Solo *Lactobacillus delbrueckii* se esta usando habitualmente de forma industrial ya que solo produce el isómero L(+) aunque la necesidad de tener un sustrato lo más puro posible (glucosa) y un pH óptimo entre 5,5 y 6,5 (lo que obligaría a neutralizar el medio debido a la producción de ácido láctico) hace que no sea muy rentable ni eficaz su utilización para la obtención de ácido láctico puro.[9]

Desde lo años 80 también se ha venido estudiando el uso de hongos y mohos ya que algunos de estos producen solo el isómero que nos interesa además de ser fácil de separar del producto y no necesitar aporte de nitrógeno orgánico extra; pero el problema que posee es que tienen un gran tamaño, por lo que puede provocar problemas en los procesos de escalado del bioproceso debido a la variación de parámetros fundamentales como la viscosidad, la transferencia de oxígeno y la transferencia de masa lo que puede provocar una reducción final del rendimiento. [9]

En la actualidad, se estudian el empleo de otros sustratos distintos a la glucosa como el almidón, lactosuero, así como desechos de otras industrias(industrias azucareras, del maíz, de la remolacha, etc.) La principal ventaja de este tipo de sustratos sería el abaratamiento de costes iniciales aunque se tendría que tener en cuenta como costes adicionales la necesidad de procesos previos de upstream para su utilización; además esto aportaría un papel importante dentro de una economía más sostenible y circular como la que necesita nuestra sociedad actualmente. En este estudio la fermentación se llevará a cabo con *Enterococcus faecalis*, se ha escogido este microorganismo ya que esta cepa posee mucha eficiencia para la producción de L(+)ácido

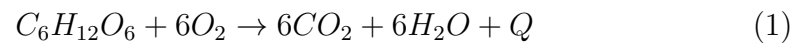
láctico a través de la fermentación homolítica, las condiciones óptimas para nuestra bacteria serán descritas en el proceso experimental. En el caso de la materia prima, esta se especificará en el siguiente apartado.

1.4 Materias primas

El gran auge de la protección medioambiental debido a los problemas actuales de nuestra sociedad y/o a la escasez de las reservas fósiles motivan a producir nuevos productos a partir de materias primas renovables y con ello cerrar un círculo de economía circular viva y reversible. Como materia prima para este proceso, se ha decidido que sea la melaza (otros residuos naturales como la yuca, maíz, etc. provienen de fuera de nuestras fronteras lo que incrementaría el coste del bioproceso), ya que en España podemos reutilizar grandes cantidades de melaza provenientes de una industria azucarera española muy importante. Como ejemplo está Azucarera que tiene 400 agricultores en Castilla y León, Andalucía, La Rioja, País Vasco y Navarra una industria que genera unos desechos, que entre ellos es la melaza. La melaza es un jarabe o líquido denso, viscoso, dulce, espeso y de color oscuro y es el residuo de la cristalización del azúcar, del cual ya no se puede extraer más.

La melaza que se pretende utilizar es primordialmente glucosa, por lo cual no hay que hidrolizarla previamente, con lo que se ahorra en este paso. La glucosa es un carbohidrato, es el azúcar más simple y más importante en el metabolismo humano. Esta molécula es un monosacárido, el cual es una de las principales moléculas que sirve como fuente de energía para los animales

y las plantas. En el cuerpo se metaboliza por medio de su oxidación, que produce dióxido de carbono y agua si es una oxidación total, correspondiente a la [Ecuación 1](#), en el proceso esto produce energía que es usada por los seres vivos. Pero como sabemos, esto no se produce solo por una reacción, ya que esto va por una serie de reacciones bioquímicas complejas en las que cada una de ellas proporciona una cantidad de energía. El primer paso es la descomposición de la glucosa, glucólisis, que es la producción de piruvato, el punto de partida y el que interesa en este caso. [10]



1.5 Bioproceso específico informativo

Al usar como materia prima desechos de la agricultura, y aunque normalmente se requiere de procesos de upstream que encarecen el producto no es este el caso ya que se ha cogido un desecho en el cual no hay ese problema, pero esto hace que estos desechos se revaloricen en nuestra sociedad y que no se queden como desperdicios, creando así una economía circular. Esta bioproducción es una fermentación de glucosa(melaza) con *Enterococcus faecalis* y en unas condiciones específicas, para que se pueda llevar de la manera más óptima, entre las que destacan la temperatura, el pH, las condiciones anaeróbicas, etc. Nuestra fermentación dura alrededor de 30 h, el producto obtenido será exclusivamente el ácido láctico L(+).

Se va a utilizar una bioreactor en discontinuo con alimentación intermitente

para alcanzar el máximo crecimiento microbiano a partir de una fermentación aeróbica que sirva para alimentar el fermentador anaeróbico también en discontinuo para obtener el producto deseado.

El proceso final de separación y purificación del producto (downstream) dependerá de la pureza requerida según sus distintas aplicaciones principalmente se utilizaran procesos de filtración, cristalización, etc. [9] En la [Figura 4](#) podemos ver un esquema del bioproceso

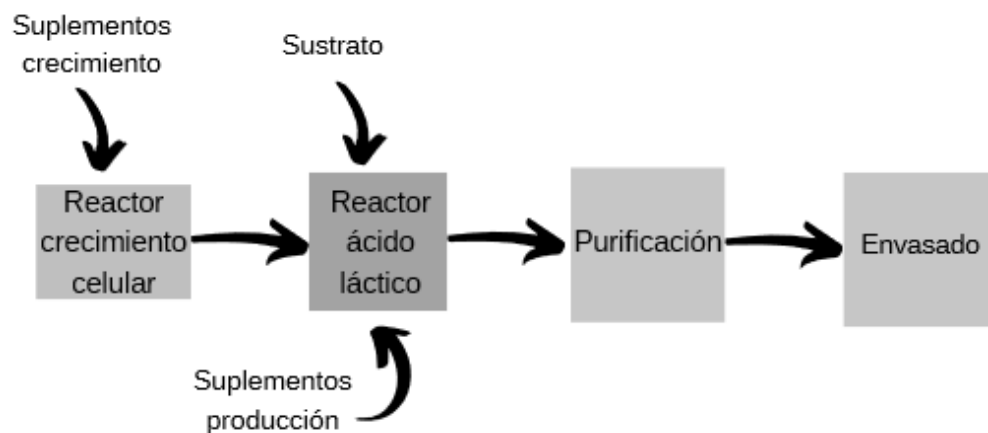


Figura 4: Esquema del bioproceso

2 Objetivos

El objetivo principal de este Trabajo de Fin de Grado es diseñar el proceso de bioproducción de ácido láctico a partir de residuos de la agricultura, en concreto de las melazas que se producen en la industria azucarera.

Esto contribuirá a mejorar nuestra sociedad ya que puede lograr que nuestra economía sea circular, contribuyendo a que los desechos de una industria sea la materia prima de otra, revalorizando nuestros residuos, además de evitar comprar una materia prima más cara.

Como objetivos específicos podemos encontrar el de llevar a cabo esta bioproducción de la forma más óptima posible dándole importancia al rendimiento y las condiciones de trabajo más óptimas; reducir al mínimo necesario los procesos de upstream y de downstream, y buscar una eficiencia económica acorde con el objetivo principal de englobarse en una economía circular.

3 Procedimiento experimental

3.1 Materia prima

La materia prima seleccionada es la melaza, esta melaza tiene un pH de 5, una densidad de 1,4 Kg/L y una concentración electrolítica de 31,5 mS/cm.[11]. La gran mayoría de melazas tiene una riqueza en glucosa entre el 50 y el 60 %. Como dato orientativo tenemos que la empresa Azucarera produjo 26.784 toneladas en el año 2016-2017 que se usaron para la alimentación animal y la agricultura.[12]

En este caso no se le hace ningún tipo de proceso antes de llevar a cabo la producción porque al comparar la producción de ácido láctico de una melaza sin tratar y una pasteurizada como la de la [Figura 5](#), se puede ver que no hay un cambio significativo entre uno y otro. [13]

Por lo cual, no es necesario tratar esta materia prima, produciendo un ahorro en este paso, haciendo más asequible el proceso de producción del ácido láctico.

3.2 Microorganismo

Con respecto al microorganismo que se va a usar, como ya se ha dicho, es *Enterococcus faecalis*, ya que esta es una bacteria eficiente en la producción de ácido láctico que puede metabolizar la glucosa para producir el L(+)*ácido láctico* a través de una fermentación homolítica. [14]

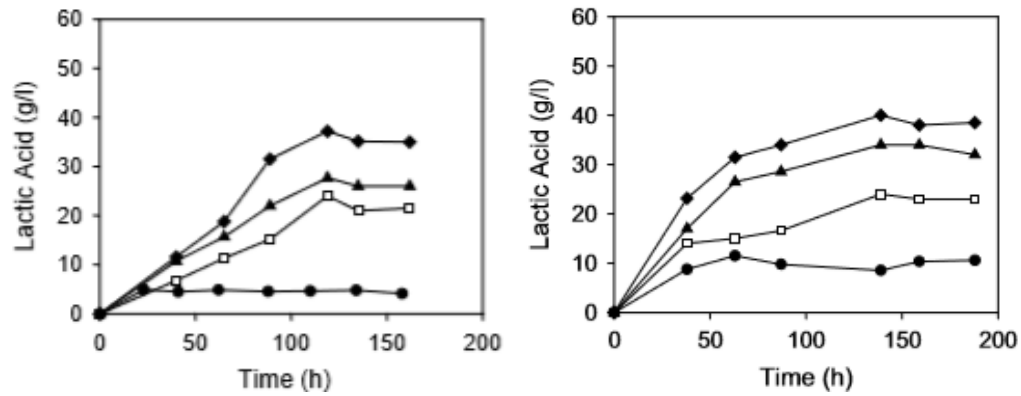


Figura 5: Comparación de la producción de ácido láctico a partir de melaza sin pasteurizar y pasteurizada: a la izquierda sin tratar y a la derecha pasteurizada, con diferentes concentraciones.[13]

El *Enterococcus faecalis* lo podemos clasificar de la siguiente forma:

- dominio: Bacteria.
- phylum: firmicutes.
- clase :Bacili.
- orden: Lactobacillales.
- familia: Enterococcaceae.
- género: *Enterococcus*.
- especie: *faecalis*. [15]

Es una bacteria de pared celular gruesa, grampositiva y que genera en la

fermentación de la glucosa ácido láctico. Su pertenencia a la familia Enterococcus es debido a que se encuentra en el intestino; tienen forma de cocos grampositivos que se pueden encontrar como células aisladas, en parejas o en cadenas cortas; tiene una morfología ovoide como se puede ver en la [Figura 6](#), además se corroboran las características morfológicas de su género, su tamaño está en torno a $1 \mu\text{m}$ de diámetro y su color es blanco. [16]

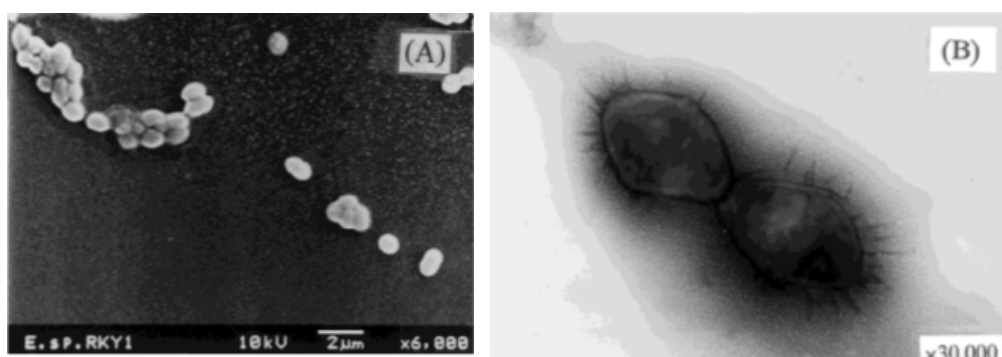


Figura 6: Micrografía electrónica de barrido en el caso de la figura A y de transmisión en la figura B, de la cepa aislada. [16]

Son anaerobios facultativos y catalasas negativos; son capaces de crecer en medios con condiciones extremas, con NaCl, a pH básicos y en intervalos de temperaturas desde los 10°C a los 45°C , aunque su temperatura óptima de crecimiento es de 35°C . También son positivas a la prueba de la leucina-aminopeptidasa (LAP), lo que quiere decir que producen esta enzima, casi todas son fermentativas no productoras de gas. [17]

Su almacenamiento es a -20°C en viales de 50 ml con el 50% de glicerol hasta que sea usado el microorganismo. [14]

3.3 Medio de cultivo y fermentación a escala laboratorio

El medio para el crecimiento celular y la preparación del inóculo tiene que contener por litro la siguiente composición: 30 g de sacarosa, 10 g de extracto de levadura, y 5 g de K_2HPO_4 .

El medio de la fermentación también tiene que tener una composición específica por litro: 130 g de melaza, esto sería el equivalente a 68 g de glucosa pura y 15 g de extracto de levadura. El pH del medio debe de estar ajustado a 7,0 antes de la esterilización.[14]

3.3.1 Preparación del inóculo

Las células del caldo de cultivo madre son transferidas a 15 mL del medio de crecimiento en un vial de 20 mL, esto tiene que ser incubado a 28°C durante 12 horas en una incubadora de agitación, a 200 rpm. De este cultivo 0,6 mL tienen que ser transferidos otra vez a un vial de 20 mL que contenga medio de cultivo fresco. Se tiene que hacer entre 3 o 4 transferencias, al final 2 mL del último cultivo tiene que ser transferido a 40 mL del caldo en un vial de 50 mL, el cual debe de ser incubado a 38°C y 200 rpm durante 6 horas antes de llevar a cabo la inoculación al fermentador a un 4% en volumen(v/v). [14]

3.3.2 Fermentación a escala laboratorio del ácido láctico

La fermentación fue llevada a cabo en un fermentador Kf-2,5L con un volumen del medio de fermentación de 1 L. El tamaño común de un fermentador de 2.5 L son 17 de alto y 13 cm de diámetro.

El recipiente del fermentador que contiene cada medio de fermentación se colocó en el autoclave para llevar a cabo la esterilización. Después de la esterilización la fermentación fue llevada a cabo a 38°C y 200 rpm, y el pH de cultivo fue ajustado a 7 gracias a la adición de NaOH 10 M.

El medio de esterilización del equipo es llevada a cabo por medio de calor, en el caso del medio de cultivo esta esterilización se lleva a cabo a una temperatura de 121°C durante 15 min. En el caso de la fermentación, esta también se lleva a cabo a la misma temperatura durante el mismo tiempo. Estos parámetros son para eliminar los posibles microorganismos que hayan pero sin desnaturalizar los medios.

3.4 Material del Biorreactor

Se tendrán varios biorreactores, todos ellos de acero inoxidable austenítico, uno de ellos para el crecimiento microbiano y los demás para la producción de ácido láctico en paralelo. El acero inoxidable austenítico es un acero cuya composición es del 16 % al 26 % de cromo y de un 6 % a 22 % de níquel y el carbono como elemento restante, en composición lo más baja posible. Este material tiene mejor resistencia a la corrosión, así como resistencia mecáni-

ca y a la oxidación a elevadas temperaturas, no es muy poroso, evitando así problemas en la limpieza del biorreactor. Se ha escogido este material también porque a pesar de ser susceptible a la corrosión en condiciones de altas temperaturas durante periodos prolongados, gracias al microorganismo seleccionado no hay que preocuparse por ello ya que no se llegan a tan altas temperaturas durante el tiempo suficiente. [18]

3.5 Elementos adicionales

Como elementos adicionales del bioreactor lo que se necesita es un sensor de pH, un sensor de temperatura y de presión como elementos principales del sistema; en el biorreactor de crecimiento del microorganismo adicionalmente tendría que estar equipado un sensor de densidad óptica, la densidad óptica para comprobar la evolución del crecimiento. También puede disponer de un sensor de oxígeno para ver la cantidad de oxígeno que hay en el bioreactor de crecimiento y corroborando así que el momento de inoculación el medio del bioreactor es prácticamente anaerobio gracias al consumo del microorganismo.

El bioreactor tendrá un colector específico de toma de muestras para seguir la evolución del bioproceso. Para el análisis del ácido láctico producido se utilizara un espectrofotómetro UV-Vis. Basado en la reacción de oxidación enzimática del ácido L láctico, se genera un complejo coloreado que se puede medir espectrofotométricamente y es directamente proporcional a la concentración de ácido láctico.

4 Diseño experimental

4.1 Escalado

Hay diferentes métodos por el cual se puede llevar a cabo un escalado, para los biorreactores de tanque agitado en régimen turbulento se encuentran mantener constante la relación potencia-volumen, el nivel de transferencia de oxígeno en el caso de procesos aerobios, la velocidad de punta o la constante de Reynolds entre otros. Para realizar más fácilmente el escalado se garantiza una similitud con respecto a la geometría, manteniendo la relación altura-diámetro constante de la [Ecuación 2](#) entre las plantas, ya que el reactor tiene una altura de 17 cm y un diámetro de 13 cm.[19]

$$\text{Relación } \frac{H}{D} = \frac{17}{13} = 1,3 \quad (2)$$

La [Ecuación 3](#) es la que se usa para calcular el diámetro de los diferentes escalados, cumpliendo con la relación altura-diámetro de la [Ecuación 2](#), para garantizar la similitud geométrica.

$$V = \frac{\pi}{4} \cdot D_R^2 \cdot H = \frac{\pi}{4} \cdot D_R^3 \cdot 1,3 = 2,5 \cdot 10^{-3} \quad (3)$$

De las relaciones que se usan para el escalado la más usada es la de mantener la relación potencia-volumen constante ya que da los mejores resultados, la ecuación que se usa para esto es la [Ecuación 4](#).

$$\frac{P}{V} = \frac{\rho N^3 Da^5}{Da^3} \quad (4)$$

4.1.1 Comprobación de la densidad constante

Cuando se usa la [Ecuación 4](#) se simplifica al decir que la densidad no cambia entre los diferentes escalados, para corroborar el hecho de que la relación de potencia-volumen no varía significativamente con la variación de la densidad se ha hecho una simulación de la relación en función de la densidad, con los escalados que más difieren, el de laboratorio y la planta industrial, y las diferencias de densidad desde el peor caso posible, un 85 % de productividad, hasta el mejor, un 98 %. Así, se obtuvo la [Figura 7](#).

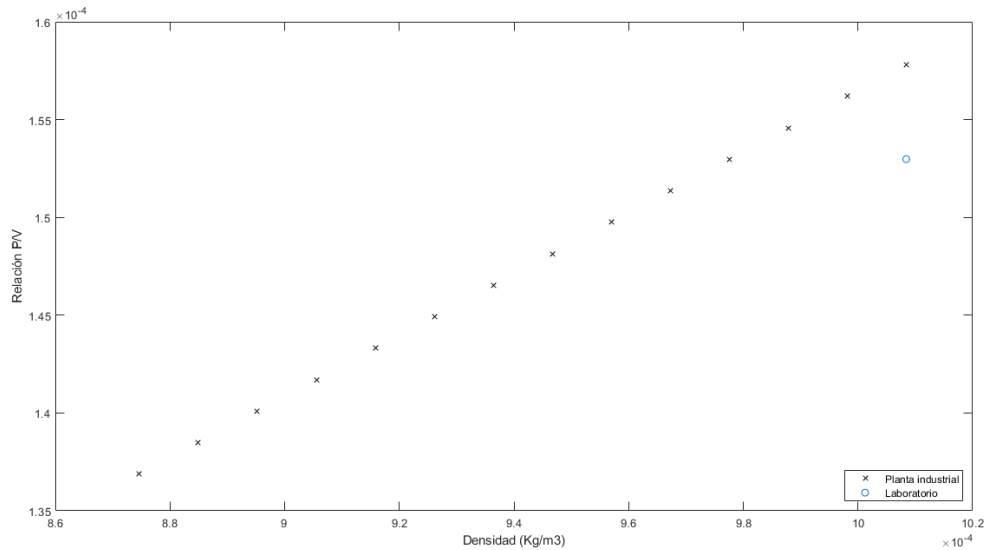


Figura 7: Variación de la relación de potencia-volumen en función de la densidad.

Como podemos ver en la [Figura 7](#), la densidad no cambia significativamente la

relación potencia-volumen, y aunque varía el valor de la relación no cambia el orden de magnitud, por lo tanto, se determina que es constante en los diferentes escalados. Así, la [Ecuación 4](#) al igualar las dos relaciones de los diferentes escalados y eliminando las dos densidades se simplificaría a la [Ecuación 5](#).

$$(N^3 \cdot Da^2)_1 = (N^3 \cdot Da^2)_2 \quad (5)$$

4.1.2 Planta piloto

Comprobado esto, se realiza el escalado para la planta piloto. Se decidió que fuese de 20 L y haciendo uso de la [Ecuación 3](#), que cumple con la similitud geométrica, se calcula el diámetro, obteniendo un valor de **27 cm**.

$$V = \frac{\pi}{4} \cdot D_R^2 \cdot H = \frac{\pi}{4} \cdot D_R^3 \cdot 1,3 = 20 \cdot 10^{-3} \quad (6)$$

A través de la relación diámetro-altura, se cumple la similitud geométrica con la [Ecuación 7](#), obteniendo un valor de la altura de **35.1 cm**.

$$\text{Relación } \frac{H}{D} = \frac{H}{27} = 1,3 \quad (7)$$

A continuación, se lleva a cabo el uso de la [Ecuación 5](#). En base a los valores del laboratorio los cuales son: una agitación de 200 rpm, el diámetro del reactor que es de 13 cm y un diámetro de agitación que corresponde con el

50 % del diámetro de todo el reactor. Así se obtiene la [Ecuación 8](#), en la cual hallamos la velocidad de agitación para la planta piloto, con un valor de **123 rpm**.

$$(200^3 \cdot 0,065^2)_{laboratorio} = (N^3 \cdot 0,135^2)_{piloto} \quad (8)$$

4.1.3 Planta industrial

Después de esto se llevo a cabo el escalado de la planta industrial, se decidió que el reactor produjese $6m^3$, teniendo en cuenta que el volumen de seguridad es del 75 %, el reactor sería de $8 m^3$. Para determinar el diámetro de nuestro reactor volvemos a hacer uso de la [Ecuación 3](#) con el volumen decidido obteniendo la [Ecuación 9](#). Y un diámetro de **2 m**.

$$V = \frac{\pi}{4} \cdot D_R^2 \cdot H = \frac{\pi}{4} \cdot D_R^3 \cdot 1,3 = 8 \quad (9)$$

A continuación, calculamos la altura correspondiente a este diámetro con la relación altura-diámetro, obteniendo la [Ecuación 10](#), y una altura de **2.6 m**.

$$\text{Relación } \frac{H}{D} = \frac{H}{2} = 1,3 \quad (10)$$

Y la velocidad de agitación calculada de nuestro reactor industrial por medio de la [Ecuación 11](#) sería de **32 rpm**.

$$(200^3 \cdot 0,065^2)_{laboratorio} = (N^3 \cdot 1^2)_{industrial} \quad (11)$$

4.1.4 Cinética

Para saber cuantos ciclos de producción se pueden llevar a cabo anualmente se necesita saber cuál es la cinética de nuestro proceso. Para saber cuál es el mejor modelo cinético se busco en diferente bibliografía dando con un modelo que se usa debido porque su resultado es el mínimo valor del coeficiente de correlación, R^2 , que hace referencia a la mínima desviación entre los datos experimentales y los resultados calculados. Este es una mezcla de varios modelos, ya que en este se tiene en cuenta la limitación del sustrato con un modelo de Monod, mientras que la inhibición sigue un modelo lineal no competitivo, y el crecimiento sigue el modelo de Luedeking-Piret, así nuestro modelo cinético sería el conjunto de la [Ecuación 12](#). [20]

$$\begin{aligned} \frac{dX}{dt} &= \frac{\mu_{max}SK_{ix}}{(K_{sx} + S)(K_{ix} + S)} \left(1 - \frac{P - P_{ix}}{P_{mx} - P_{ix}}\right) X \\ \frac{dS}{dt} &= q_{s,max} \frac{SK_{is}}{(K_{ss} + S)(K_{is} + S)} \left(1 - \frac{P - P_{is}}{P_{ms} - P_{is}}\right) X \\ \frac{dP}{dt} &= \alpha \frac{dX}{dt} + q_{p,max} \frac{SK_{ip}}{(K_{sp} + S)(K_{ip} + S)} \left(1 - \frac{P - P_{is}}{P_{ms} - P_{is}}\right) X \end{aligned} \quad (12)$$

Para desarrollar el modelo cinético del microorganismo *E. faecalis*, lo que se hace es que se modifica ciertos aspectos de los modelos, que son:

- El coeficiente de muerte celular (K_d) se incluye para tomar en cuenta

la pérdida de viabilidad

- La inhibición del producto se produce de manera exponencial, con una constante de inhibición (K_p), ya que se ha descubierto que mejores resultados comparados con la inhibición del producto lineal.

Así, el modelo modificado para la producción de ácido láctico por medio del *Enterococcus faecalis* se quedaría como la [Ecuación 13](#) para la tasa de crecimiento específico, como la [Ecuación 14](#) para la tasa de producción de biomasa, como la [Ecuación 15](#) para la tasa de azúcar consumida y como la [Ecuación 16](#) para la tasa de producción de ácido láctico.[20]

$$\mu = \frac{\mu_{max}SK_{ix}}{(K_{sx} + S)(K_{ix} + S)} e^{-\frac{P}{K_{px}}} \quad (13)$$

$$\frac{dX}{dt} = (\mu - K_d)X \quad (14)$$

$$\frac{dS}{dt} = q_{s,max} \frac{SK_{is}}{(K_{ss} + S)(K_{is} + S)} e^{-\frac{P}{K_{ps}}} X \quad (15)$$

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + q_{p,max} \frac{SK_{ip}}{(K_{sp} + S)(K_{ip} + S)} e^{-\frac{P}{K_{pp}}} X \quad (16)$$

Para poder llevar a cabo las cinéticas de estos modelos hace falta asumir ciertas simplificaciones como son:

- Cuando la baja concentración de azúcar afecta a la absorción de azúcar, la producción de ácido láctico se ve afectada de la misma forma, $K_{ss} = K_{sp}$.

- Cuando la alta concentración de azúcar inhibe la absorción de azúcar, la producción de ácido láctico es inhibida de la misma manera. $K_{is} = K_{pp}$.
- El ácido láctico inhibe el consumo de azúcar y la producción de ácido láctico de igual manera, $K_{ps} = K_{pp}$.

Los datos que se obtuvieron de la bibliografía para los datos cinéticos son los referentes a la [Tabla 2](#).

Parámetros cinéticos	Valor
Modelo de producción de biomasa	
μ_{max} (h^{-1})	1,6
K_{ix} (g/l)	167,46
K_{sx} (g/l)	0,89
K_{px} (g/l)	17,07
K_d (h^{-1})	0,00318
Modelo de la utilización de azúcar	
K_{is} (g/l)	303,17
K_{ss} (g/l)	0,1
K_{ps} (g/l)	29,17
$q_{s,max}$ (g/(gh))	3,33
Modelo de la producción del ácido láctico	
K_{ip} (g/l)	303,17
K_{sp} (g/l)	29,17
$q_{s,max}$ (g/(gh))	3,00
α (g/g)	0,26

Tabla 2: Tabla de los datos cinéticos experimentales.

Con la ayuda de la herramienta ode15s de Matlab y con Simulink realizamos la simulación de las tres ecuaciones diferenciales, la [Ecuación 14](#), [Ecuación 15](#)

y Ecuación 16, obteniendo las gráficas de la Figura 8 y la Figura 9. Como se pueden ver en la Figura 8 a las 30 h tenemos una buena producción de ácido láctico, y coincide con los datos bibliográficos; además en la Figura 9 transcurridos 50 h la biomasa disminuye, esto afecta a nuestro microorganismo y no queremos que esto ocurra.

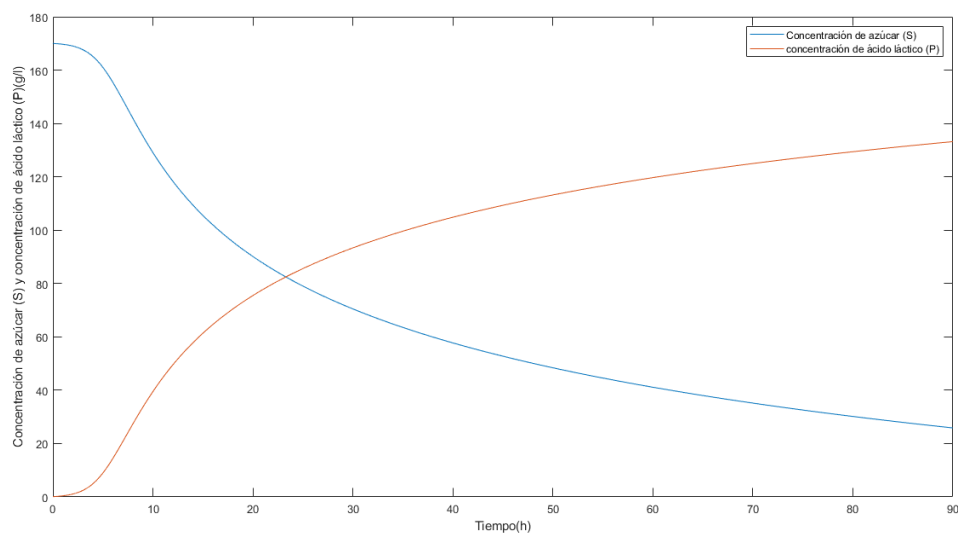


Figura 8: Simulación realizada con Matlab-Simulink de la cinética de nuestro proceso, obteniendo la concentración de azúcar y la producción de ácido láctico.

Anualmente habrían 320 días de trabajo, teniendo en cuenta las vacaciones en el mes de agosto, 5 días de semana santa y posibles contratiempos. Estos 320 días, son 7.680 horas, cada fermentación dura 30 horas, más adelante se verá que la purificación se lleva a cabo durante alrededor de 10 horas y que el microorganismo se cultiva durante 3 horas, por lo cual suponemos unas 45 horas de cada ciclo, por lo tanto, se llevarían a cabo 170 ciclos.

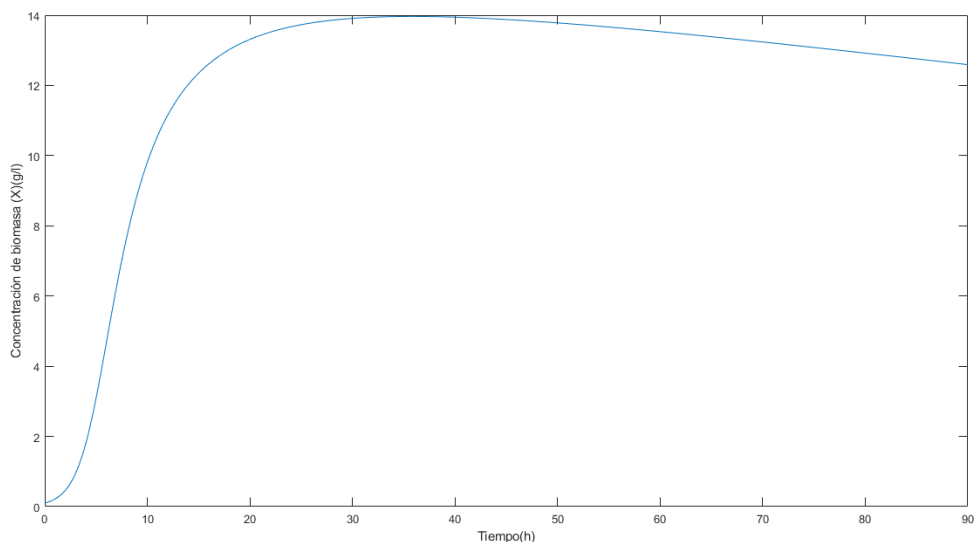


Figura 9: Simulación realizada con Matlab-Simulink de la cinética de nuestro proceso, obteniendo la concentración de biomasa.

4.1.5 Producción

Se decidió tener en funcionamiento 2 reactores con las dimensiones establecidas en la planta industrial, en el caso de que uno de ellos sufriera una avería no supondría la paralización de toda la producción de la planta, además de que no tendrían que trabajar al mismo tiempo, con lo cual, cuando uno de ellos tuviese que ser esterilizado el otro seguiría en funcionamiento. Así, se produciría una cantidad anual de 2.040.000 L, en toneladas sería de 2.100. La cuota de producción de Europa esta alrededor de las 100.000 toneladas, y la de España corresponde con el 10% de esta, siendo de 10.000 toneladas, por lo cual, la producción industrial de este proyecto en España representaría un 21%, al ganar cuota de mercado se iría ampliando. [21]

Al escoger biorreactores, se visitaron varias paginas y se vio que si que era factible las medidas que se calcularon, así se escogió un fermentador que tuviera las características mencionadas, así como los sensores. También cuenta con un sistema para controlar la temperatura de nuestro reactor con un sistema de refrigeración, el líquido circulante para esto es agua, que en estos casos es uno de los más usados, así se calculará cual es el intercambio de calor que se lleva a cabo para el fermentador. [22]

4.1.6 Sistema de intercambio de calor

Primero para que se lleve a cabo la reacción necesitamos calentar nuestro reactor hasta los 38 °C. Por lo cual, necesitamos calcular la cantidad de agua necesaria para llevar a cabo esto. Por batch producimos 6.000 L de ácido láctico, esto en kg son 574,2, se supone un rendimiento del 92 %, ya que es la media, y esto supondría tener 624,13 Kg de azúcar, pero como esta no es pura ya que nuestra materia prima es la melaza, y la melaza proporcionada tiene un contenido en azúcar de la mitad, se necesita 1.250 Kg de melaza. El calor necesario para elevar la temperatura de esta materia se puede expresar con la [Ecuación 17](#), ya que el calor específico de las melazas esta tabulado. [23]

$$Q_m = m_m \cdot c_{em} \cdot \Delta T_m = 1.250 \text{Kg} \cdot 2,16248 \frac{\text{KJ}}{\text{Kg} \cdot \text{K}} \cdot (311,15 - 298,15) \text{K} = 35.140 \text{KJ} \quad (17)$$

El resultado del calor necesario para calentar la melaza a 38°C es de **35.140**

KJ. Podemos calentar esta cantidad de melaza en 30 min, teniendo una transferencia de calor de 19.522,2 W. También por las características de nuestro intercambiador, que se trata de uno tipo camisa se sabe que el área del intercambio de calor corresponde con la [Ecuación 18](#) y el área del fondo toriesférico, [Ecuación 19](#).

$$A_{cilindro} = \pi \cdot D_R \cdot h \quad (18)$$

$$A_{fondo_toriesferico} = \frac{\pi}{4} \cdot D_R^2 \cdot 1,25 \quad (19)$$

De estas dos ecuaciones obtenemos un valor del área cilíndrica de 14,7 m^2 , con el diámetro del escalado y la altura que ocupa la solución, y un área del fondo toriesférico de 3,93 m^2 , al sumar estas dos áreas obtenemos que el valor del área total es de 18,63 m^2 que se usa en la [Ecuación 20](#), ya que el calor cedido por el agua caliente debe de ser igual al necesario por la melaza. En esta ecuación se puede realizar este tipo de variación de temperatura sin la media logarítmica porque el análisis se hace sobre el intercambiador de calor.

$$Q_c = U \cdot A \cdot \Delta T = U \cdot A \cdot (T_e - T_s) \quad (20)$$

No sabemos la temperatura de salida del agua que se usa para calentar la melaza, pero sabemos el coeficiente global de transferencia, que es de 15 $J/(s \cdot m^2 \cdot ^\circ C)$, que la temperatura de entrada del agua es de 80 $^\circ C$ y que la mínima temperatura a la que puede salir es de 5 $^\circ C$. Obtenemos un valor de

la temperatura de salida del agua de **10,14° C**. [24]

Finalmente con la [Ecuación 21](#) podemos calcular cuál es el caudal de agua que necesitamos para el calor que necesitamos intercambiar, ya que sabemos cual es el calor que necesitamos intercambiar, la c_p del agua, 4.186 J/(kg °C) y la variación de temperatura.

$$Q_c = m_a \cdot c_p \cdot \Delta T \quad (21)$$

Se obtiene un valor del caudal de agua de **0,0668 kg/s**. Así, este es el caudal necesario para poder calentar nuestra melaza hasta la temperatura de trabajo, en este momento se inocularía el microorganismo en las condiciones óptimas y dado que se trata de una fermentación, habría que refrigerar el reactor, ya que esta es exotérmica, y habría que calcular el caudal de agua necesario para ello, en este caso glicolítica con un intercambiador de tipo serpentín. Esto es porque en la bibliografía se dice que es la mejor para este tipo de procesos, además de que no es demasiado cara.

La fermentación de la glucosa produce un calor correspondiente a la [Ecuación 22](#) que se necesita neutralizar.

$$Q = m_{C_6H_{12}O_6} \cdot \Delta H_r \quad (22)$$

Si tenemos 624,13 Kg de azúcar, se usa en los estudios como sinónimo de glucosa, y sabemos que el peso molecular de la glucosa es de 180,156 g/mol, con lo que tenemos 3.464,39 mol de glucosa. La entalpía de la reacción de

glicólisis es de -120 KJ/mol, por lo que por medio de la [Ecuación 22](#) se calcula que el calor que tiene que ser cedido, por medio de la refrigeración, debe de ser de **-415.726,8 KJ**, el tiempo durante el cual se lleva cabo la fermentación es de 30 h, por lo que el calor a intercambiar por unidad de tiempo es de -3.849,32 J/s.

Gracias a la [Ecuación 23](#) podemos saber cual es el caudal necesario para que se contrarreste el calor de la fermentación, ya que sabemos que en este tipo de serpentines con este refrigerante el salto de temperatura del liquido refrigerante es de 5°C o K y la capacidad calorífica del agua glicolada es de 3.118,27 J/(kg · K). [\[24\]](#)

$$Q_r = m_r \cdot c_{pr} \cdot \Delta T_r \quad (23)$$

La cantidad de caudal necesario para refrigerar esto es de **0,2469 kg/s**. Para saber cual es el área necesaria del serpentín, cumpliendo con este intercambio de calor podemos hacer uso de la [Ecuación 24](#), cuyos valores también están tabulados para este tipo de proceso y reactor, cuyo valor de U es de 34,09 J/(s · m² K). [\[24\]](#)

$$Q_r = U \cdot A_s \cdot \Delta T_{ml} \quad (24)$$

Y el ΔT_{ml} viene dado por la [Ecuación 25](#).

$$\Delta T_{ml} = \frac{\Delta T_1 - \Delta T_2}{\ln\left(\frac{\Delta T_1}{\Delta T_2}\right)} = \frac{(T_{op} - T_e) - (T_{op} - T_s)}{\ln\left(\frac{T_{op}-T_e}{T_{op}-T_s}\right)} \quad (25)$$

Así el valor de ΔT_{ml} es de **35,44 K**, ya que el valor de la temperatura de salida del refrigerante es de 278 K, la de entrada de 273 K y la de operación del reactor de 311 K. Este resultado se sustituye en la [Ecuación 24](#) y se obtiene un valor del área de **3,19 m²**.

Ya que sabemos el valor del área del serpentín y los diámetros de los serpentines más normalizados son de 0.025 m y 0.020 m, se decidió escoger un diámetro de 0.025 m, calculamos la longitud necesaria del serpentín con la [Ecuación 26](#), obteniendo un valor de **40.62 m**.

$$L = \frac{A_s}{D_{tubo} \cdot \pi} = \frac{3.19}{0.025 \cdot \pi} \quad (26)$$

4.1.7 Tanques de almacenaje

Para poder realizar el proceso necesitamos ciertos componentes: melaza, extracto de levadura, K_2HPO_4 y NaOH para regular el pH del medio y estos hay que almacenarlos, el almacenaje se lleva a cabo semanalmente.

En el caso más ideal se producen 3.7 batch por cada reactor, semanalmente se llevarían a cabo 11 batch, en el caso de que estuviesen los 3 reactores en funcionamiento, ya que se tiene la idea de ampliarlo, se pueden cumplir con las necesidades semanales si se se tienen en cuenta estos datos.

Como se necesita de melaza una cantidad de 1.250 Kg/batch, se necesita 13.750 Kg de melaza, se sabe que la densidad de la melaza es de 1,4 Kg/L, por lo que se almacenaría 9.822 L, con un tanque de 10 m^3 sería suficiente. Como suplemento se tiene el extracto de levadura, de esto se añade 15 g/L, se llevan a cabo 6.000 L por reactor, que son 66.000 L semanales los que se producen, 990 Kg de extracto levadura se necesitarían, gracias a su densidad que es 490 Kg/m^3 se sabe que serían 2 m^3 , habría que sobredimensionarlo para que no se queden vacíos ya que la bomba no podría aspirar el líquido del fondo del tanque, así que nuestro tanque tendría que ser de 3 m^3 , aquí también se tiene en cuenta el necesario para el crecimiento celular porque es una pequeña cantidad, por eso se sobredimensiona mucho más que en otros casos, ya que en el crecimiento celular solo se necesitan 5 L. Adicionalmente se tiene que tener un tanque de NaOH 10 M, si se produce 6.000 L de ácido láctico, esto serían 6.174 Kg, en moles serían 68.539 mol, por la reacción de disociación del ácido láctico se sabe que esto son 95 mol de protones de hidrógeno que tienen que ser neutralizados. Como se sabe que la neutralización del ácido y la base es 1:1, se sabe que necesitamos 95 mol de $[OH^-]$ y que el NaOH es 10 M, por lo tanto necesitamos 9.5 L de NaOH por cada batch, semanalmente se lleva a cabo 11 batch por lo tanto se necesitan 105 L, sobredimensionándolo con un tanque de 150 L sería suficiente. También se necesita K_2HPO_4 , en este caso se añaden 5 g en el cultivo por cada litro de fermentación, por lo que sería 1.200 g, su densidad es de 2,44 g/cm^3 , por lo tanto serían 492 m^3 , 5410 L semanales serían los necesarios. Así se puede usar un tanque de 5.5 m^3 .

4.2 Modo de operación

El modo de operación de nuestra planta industrial para llevar a cabo la fermentación es en batch, esto es porque como se puede leer en la bibliografía se llega a producir una mejor fermentación, más rápida y con mejor producción de ácido láctico, además de esto el microorganismo de nuestra planta será llevada a cabo en otro reactor, esto es porque nuestro proceso es anaerobio, pero gracias a que nuestro microorganismo es anaerobio facultativo no tenemos que preocuparnos por la tasa de oxígeno en el reactor de *E.faecalis*, ya que se produce el crecimiento celular de nuestra bacteria hasta que la tasa de oxígeno llega a ser 0, y entonces el microorganismo es inoculado al reactor de fermentación. Para cada uno de los ciclos que se llevan a cabo la inoculación del microorganismo debe de ser al 4% en volumen, por lo cual como se produce 6 m^3 de ácido láctico, se debe preparar 0,24 m^3 del microorganismo para cada uno de los ciclos.

Como se necesita una composición de 30 g/L de sacarosa y por cada batch se tiene 240 L, se necesitan 7,2 Kg de sacarosa/ batch, se producen 11 batch semanales, por lo que se necesita 79,2 Kg semanales, la densidad de la sacarosa es de 1,59 g/cm^3 , necesitando un volumen de 49,811 L, con un tanque de 100 L sería suficiente

4.2.1 Downstream

La separación y purificación del ácido láctico es difícil, esto es porque el agua tiene una alta afinidad por él y a que posee una baja volatilidad. Debido

a esto y a que la mayoría de procesos tienen como limitación la cantidad de ácido láctico que se purifica o separa, queda una alternativa que puede con la cantidad de producción que se plantea en este documento. Para ello primero se realiza una esterificación con alcohol para que el producto sea más volátil y poder purificarlo con un posterior proceso de destilación más una hidrólisis final; las ventajas de este método es que a parte de poder purificar grandes cantidades, logra una alta recuperación de ácido láctico reduciendo las impurezas que aparecerían en la destilación sin esterificación, como por ejemplo el sulfato cálcico. [4]

4.2.2 Diagrama de proceso

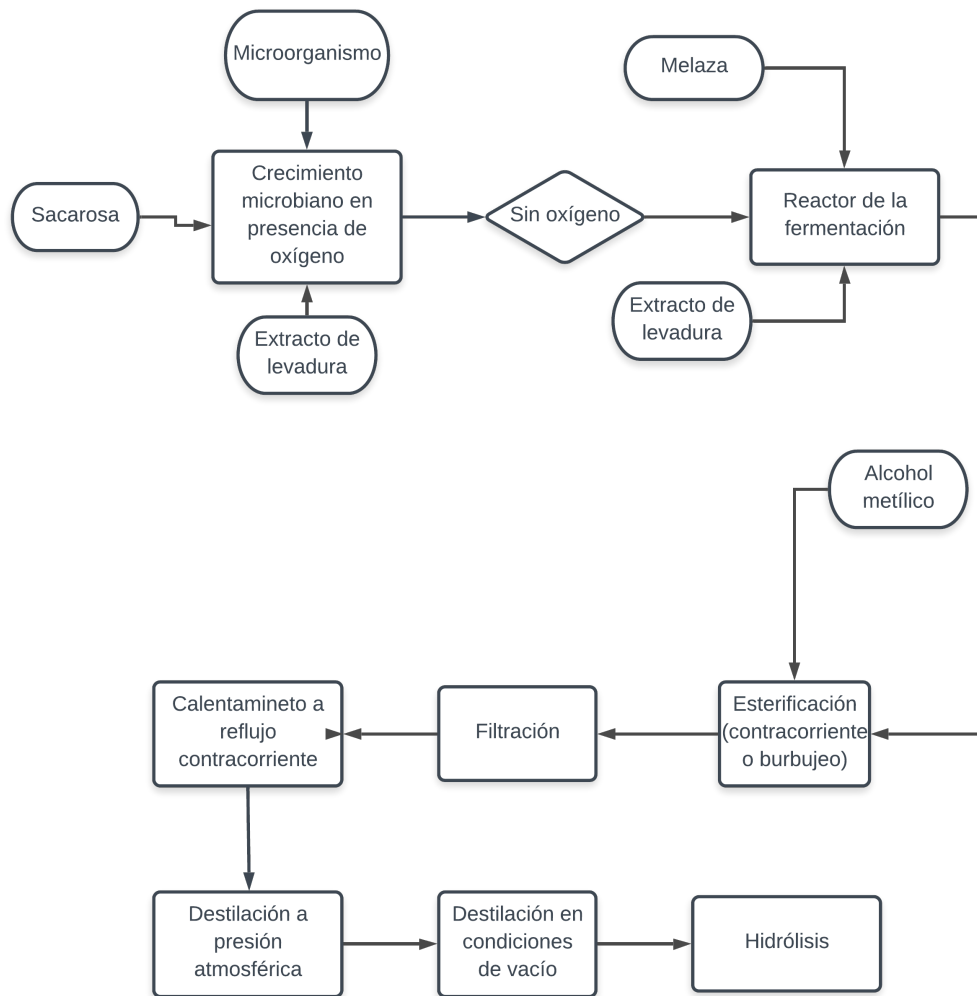


Figura 10: Diagrama de proceso

5 Resultados experimentales

5.1 Producción de ácido láctico

De la bibliografía se obtuvieron que los resultados experimentales en las condiciones descritas en los apartados anteriores tuvo un contenido de ácido láctico al 98.9 %, con un rendimiento del 98 %, y una productividad final de 4.3 g/(l· h). Las condiciones de trabajo se sabía que serían las más óptimas ya que en otros estudios se vio como afectaba el pH, la cantidad de extracto de levadura y la concentración de las diferentes melazas. Podemos ver los datos en la [Tabla 3](#).

Contenido L(+)-ácido láctico(%)	Rendimiento ácido láctico(%)	Productividad (g/(lh))	Producción ácido láctico (g)
98.9	98	4.3	66.64

Tabla 3: Tabla de los resultados experimentales.

[14]

La fermentación experimental fue de 1L, con 68 g de azúcar, como se tuvo un rendimiento del 98 % se produjeron 66.64 g de ácido láctico. Cuando se llevó a cabo el escalado, no se realizaron los cálculos con este rendimiento y productividad porque esta disminuye con la cantidad que se produce, por lo que se hizo una media para calcular el rendimiento, también se verifico que suele ser la producción y rendimiento de las producciones de ácido láctico con diferentes desechos agrícolas en varias condiciones, tampoco se supuso su mejor rendimiento ya que no se deseaba idealizar el proceso.

5.2 Método de purificación

El método de purificación se basa en una destilación reactiva. Se lleva a cabo una esterificación con alcohol metílico, etílico o isopropílico. Esta esterificación tiene ventajas porque se puede partir del ácido tal y como sale de la producción, sin necesidad de realizar un tratamiento previo. A continuación, hay que llevar a cabo una filtración para eliminar restos de células muertas y otros sólidos. En el caso de que se quiera usar el ácido láctico como materia prima para PLA o solvente este proceso tiene la ventaja de que después de la purificación se puede usar directamente, aunque con la finalidad de este estudio haría falta llevar a cabo ciertas posteriores purificaciones (El rendimiento en este caso llegaría a un 90 %). En este caso, que es en batch, se lleva a cabo un calentamiento a reflujo de la mezcla que hemos obtenido de la filtración, y a continuación, la destilación a presión atmosférica del alcohol en exceso y, finalmente, la destilación del ester en condiciones de vacío e hidrólisis. Con respecto a la columna para realizar la esterificación, el alcohol puede ser introducido a contracorriente o burbujearse. Los vapores que salen de esta columna están formados por el exceso de alcohol, ácido láctico, éster y agua, estos tienen que ser llevados a una columna de destilación fraccionada para recuperar el alcohol usado, y el residuo de lactato de metilo se hidroliza y se concentra al vacío. [25]

Las condiciones óptimas para esta esterificación son que por cada mol de ácido láctico necesitamos 7 mol de alcohol metílico, 2 mL de ácido sulfúrico y llevar a cabo durante 8 horas el calentamiento a la temperatura de reflujo, 80-100°C , también se llevo a comprobar que el alcohol metílico da mejores

resultados que los otros dos alcoholes. [25] Obteniendo el ácido láctico en estado líquido.

6 Estimación de costes

Para llevar a cabo la construcción de una planta industrial, sea del tipo que sea, hay que tener en cuenta la viabilidad económica, que es un factor importante. Para esto se realiza un balance económico de los costes y beneficios. Estos se calculan gracias al tiempo que se necesita para amortizar la inversión inicial. Para ello también hacemos uso de las divisas actuales entre Europa y América, cuyo cambio es de $1 \text{ €} = 1.11 \text{ \$}$.

El tiempo de vida útil de este tipo de plantas se determina en el BOE, actualmente esta determinada para 15 años, y se supone que todo el ácido láctico es usado como materia prima para productos farmacéuticos o cosméticos.

6.1 Estudio de mercado

Como hemos dicho anteriormente el ácido láctico está en auge en el mercado, gracias a todas las utilidades que le damos. El precio oscila alrededor de los 2-3\$ en función de la pureza.[\[26\]](#)

Con los datos obtenidos del mercado actual se ha llevado a cabo una previsión de mercado del ácido láctico hasta el año 2025 como podemos ver en la [Figura 11](#). Este aumento de la producción indica una fuerte demanda, y que cada vez crece más. Así podemos determinar que el mercado de ácido láctico es algo sólido en lo cual poder invertir.

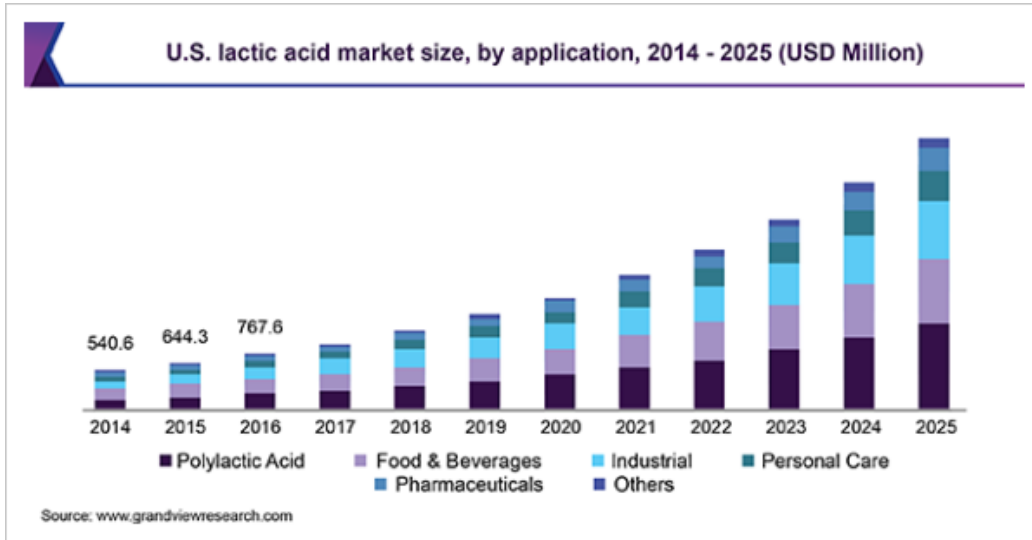


Figura 11: Estudio de mercado hasta el 2025.

[27]

6.2 Coste inicial

El coste inicial es el capital que se necesita para poner en marcha el proyecto. En el coste inicial tenemos el coste de la maquinaria, el coste de la parcela y el coste de la construcción de la fábrica. El coste de la parcela se calcula con la [Ecuación 27](#).

$$Coste_{parcela} = A_{parcela} \cdot Precio/m^2 \quad (27)$$

Para poder tener una superficie suficiente y poder llevar a cabo el proyecto cómodamente, además de en el futuro poder llevar a cabo una posible ampliación, se han estimado que 8.000 m^2 sería suficiente para este proyecto, el precio general del suelo en España por metro cuadrado es de 100€ , así

nuestra parcela nos costaría alrededor de 800.000€.

El precio de la construcción se estima en 2.700.000 €.

Para calcular los equipos se dispone de catálogos de los cuales se obtiene el precio del equipo. El reactor seleccionado tiene un coste de 30.000 \$, se decidió que la producción de la planta sería la de 2 tanques, aunque estén en funcionamiento al mismo tiempo solo 2 de ellos se comprarán 3, esto es porque así mientras uno de ellos esta limpiándose no perdemos esta producción, también porque si hay algún problema con uno de ellos se puede usar el 3º mientras este es arreglado o que se puede poner a trabajar los 3 si se quiere una mayor cantidad de producción. Adicionalmente, se necesita otro reactor para llevar a cabo la esterificación para producir la separación y otro para el crecimiento de *E.faecalis*. El coste de los 5 reactores es de 150.000 \$.[22] Anteriormente se determinó el volumen necesario de los tanques de almacenamiento, un tanque de almacenamiento de 10 m³ para la melaza, con un precio de 11.000 \$, un tanque de almacenamiento de 3000 L para el extracto de levadura el coste de este tanque de almacenamiento es de 2.900 \$, otro tanque de almacenamiento para el NaOH de 150 L, este tanque tiene un valor de 700\$, otro de 5.5 m³ para el K₂HPO₄, un tanque de este tamaño cuesta 4.000\$ y por último, uno de sacarosa de 100 L con un coste de 500\$.[28] Se necesitan varios intercambiadores de calor, tanto para el reactor como para la purificación, se decidió comprar 5 de estos con un precio de 1.000 \$ por cada uno de ellos.[29] Las 2 columnas de destilación para llevar a cabo la purificación tiene un precio de 135.000 \$ cada una. [30] Y el coste de envasado de 10.000\$ en todo el equipo.

Equipo	Precio unitario	Cantidad	Precio total
Reactores	30.000 \$	5	150.000 \$
Tanque 10 m^3	11.000 \$	1	11.000 \$
Tanque 3000 L	2.900 \$	1	2.900 \$
Tanque 150 L	700 \$	1	700 \$
Tanque 5.500 L	4.000 \$	1	4.000 \$
Tanque 100 L	500 \$	1	500 \$
Intercambiador de calor	1.000 \$	5	5.000 \$
Columnas de destilación	135.000 \$	2	270.000 \$
Maquinaria de envasado	10.000 \$	1	10.000 \$
Total			455.100 \$ = 401.000 €

Tabla 4: Tabla de los costes.

La automatización y los sistemas de control de los equipos se supone en un valor del 20% de los equipos, siendo en este caso de 80.200 €.

Si al cálculo de los costes de equipo le sumamos la automatización y los sistemas de control, el precio de la construcción y de la parcela correspondería con los costes iniciales, que serían de **3.981.200 €**.

6.3 Gastos anuales

6.3.1 Materias primas

Aunque al principio solo vayamos a tener dos reactores trabajando los costes se realizan en base a los 3 ya que sería el caso en el que tenemos más costes. En este hay que tener en cuenta el coste de la melaza, este tiene un coste de 0.38€/Kg, como por batch tenemos 1.250 Kg y teniendo en cuenta que se llevan a cabo 170 ciclos anuales por reactor esto son 637.500 Kg anuales, así tenemos un coste de 242.250 €. [31] El coste del extracto de levadura es de 375\$/tonelada, si producimos 3.060.000 L de ácido láctico y se usan 15 g/L, anualmente se necesitan 45.900 Kg, se necesitan 46 toneladas que tiene un precio de 17.250\$. [32] En el caso del NaOH por batch necesitamos 9.5 L, a 170 batch y con 3 reactores serían 4.845 L los necesarios, el coste del NaOH es de 2€/L, por lo que nos costaría anualmente 9.690 €. [33] En el caso del K_2HPO_4 se sabe que se usa 5 g/L, que supondrían 15.300 Kg, este compuesto tiene un precio de 600\$/tonelada, obteniendo un coste anual de 9.180\$. [34] Finalmente, se tiene en cuenta que la sacarosa tiene un precio de 7\$/Kg, y usamos 7,2 Kg/batch, se producen 170 batch/reactor anuales, así que se necesitan 3.672 Kg, con un coste de 25.704 \$. [35]. También hay que comprar una cepa, este sería un único gasto de 140 €, pero si ocurriese algo con la cepa habría que comprarla cada vez que pasase algo como una contaminación, muerte celular, etc. Por último, habría que contratar una empresa de gestión medioambiental para los residuos, con un precio de 50.000€.

Materia	Precio unitario	Cantidad	Precio total
Melaza	0.38€/Kg	637.500 Kg	242.250 €
Extracto de levadura	375\$/tonelada	46 toneladas	17.250 \$
NaOH 10 M	2€/L	4.845 L	9.690 €
K_2HPO_4	600 \$/tonelada	15.300 Kg	9.180\$
Sacarosa	7\$/Kg	3.672 Kg	25.704 \$
Enterococcus faecalis	140€	1 cepa	140€
Gestión medioambiental	50.000€	1	50.000€
Total		349.048 €	

Tabla 5: Tabla de los gastos.

6.3.2 Gastos de personal

Ya que la planta trabaja constantemente los trabajadores tienen varios turnos, en horarios rotativos, y se decidió contratar a 2 directores de planta con un salario anual de 80.000 € anuales, esto son 160.000 € anuales, 2 ingenieros de planta con un sueldo anual de 60.000 €, 10 ingenieros con un salario anual de 50.000€ que serían 500.000 €, 8 personas de mantenimiento y limpieza con un salario anual de 22.000 €, y 4 personas de administración y servicio con un salario anual de 22.000 €, que en total serían **1.036.000 €**.^{[36][37][38]}

Personal	Salario anual	Cantidad	Precio total
Director de planta	80.000 €	2	160.000€
Ingeniero de planta	60.000 €	2	120.000€
Ingeniero	50.000 €	10	500.000 €
Mantenimiento y limpieza	22.000 €	8	176.000 €
Administración y servicio	20.000 €	4	80.000 €
Total			1.036.000 €

Tabla 6: Tabla de los costes de personal.

6.3.3 Gasto energético

Para calcular el gasto energético tenemos el coste de la potencia de la electricidad que es de 0.14€kW/año , si al año se estima que se consume $2.423.008\text{ kW}$ tenemos un coste variable de ***339.222 €***. [39]

6.3.4 Otros gastos

En gastos de seguro se estima 25.000 € , en gastos de vigilancia para cámaras, y alarmas 10.000 € y 15.000 € para otros posibles gastos que no hayan sido contemplados, siendo en total ***50.000 €***.

6.4 Amortización

6.4.1 Beneficios

Para calcular la amortización necesitamos saber cuales son las ganancias al vender el ácido láctico. 2.040.000 L son lo que producimos anualmente, se suponen dos precios diferentes de la venta del producto porque se supone que no se vende solo para una finalidad. Este ácido láctico en Kg es 2.099.160 Kg, suponemos que se obtiene un 80% del producto anual, por lo que, la cantidad que se vende al año es de 1.679.328 Kg, la mitad de este ácido, 839.664 Kg, tiene un precio de 3€/Kg, generando un beneficio de 2.518.992 €, y la otra mitad tendrá un precio de 2€/Kg, con un beneficio de 1.679.328 €. Obteniendo un beneficio total de **4.198.320 €**.^{[40][41]}

6.4.2 Cálculo amortización

Al realizar el balance de amortización, y sabiendo que la amortización se lleva a cabo para un periodo de una media de 10 años según el BOE para una planta industrial. A parte de esto, también se ha pensado que el coste inicial se consiga al hacer un prestamos al banco, por lo tanto este préstamo también habría que devolverlo mes a mes, se estimó que tendría un interés del 2.5% y se planeo para devolver en 10 años, lo que habría que devolver son 4.976.500 €, y anualmente serían 497.650 €. ^[42] La amortización la calculamos con la [Ecuación 28](#).

$$\begin{aligned}
 \textit{Amortizacion} &= \textit{Beneficios} - \textit{Gastos} = 4.198.320 \\
 -349.048 - 1.036.000 - 339.222 - 50.000 - 497.650 &= 1.926.400 \quad (28)
 \end{aligned}$$

Así se obtendrían unos beneficios de 1.926.400€.

En cambio si no se hiciera el prestamos al banco y se dispusiera de ese dinero o se hiciese por medio de inversionistas y se quisiera saber cual es en este caso, sería con la [Ecuación 29](#).

$$\begin{aligned}
 \textit{Amortizacion} &= \textit{Beneficios} - \textit{Gastos} = 4.198.320 \\
 -349.048 - 1.036.000 - 339.222 - 50.000 &= 2.424.050 \quad (29)
 \end{aligned}$$

El coste inicial habría que dividirlo entre 7 años, sería de 568.743€y a la amortización habría que restarle esto para obtener los beneficios reales, serían de 1.855.307 €.

7 Riesgo, seguridad y medio ambiente

Los principales riesgos de las plantas industriales son de incendios, explosiones y/o fugas. Por esto hay muchas leyes y decretos que determinan como tienen que ser o que tienen que tener. Un ejemplo son:

- Real Decreto 948/2005, de 29 de julio, en este se aprueban medidas de control de riesgos inherentes a los accidentes graves en los que intervengan sustancias peligrosas.
- Real Decreto 2267/2004, de 3 de diciembre, en el que se aprueba Reglamento de seguridad contra incendios en los establecimientos industriales, este también determina que si es de riesgo intrínseco medio con un máximo de 50 trabajadores debe haber una salida de emergencia.
- Se debe instalar una válvula de venteo en todos los tanques de almacenamiento, ya sean de proceso o no.
- El Real Decreto 109/2010, de 5 de febrero regula los almacenes farmacéuticos y los productos farmacéuticos.
- El Real Decreto 1087/2005, de 16 de septiembre, regula la legislación sobre los productos parafarmacéuticos.
- Según el artículo 32.1. Las operaciones de producción se llevan a cabo con instrucciones y procedimientos establecidos y de conforme con las normas de correcta fabricación. Con recursos adecuados y suficientes para realizar controles en el proceso de fabricación. Las desviaciones y

los defectos se deben documentar y deben ser objeto de una investigación.

- Según el artículo 32.2. Se deben adoptar las medidas técnicas y/u organizativas para evitar contaminaciones cruzadas y mezclas de productos.
- En el anexo II del Reglamento (CE) n.º 1170/2009, de la Comisión, de 30 de noviembre de 2009, se aplicarán los criterios de pureza que establece la legislación para la utilización en la fabricación de productos alimenticios.
- El Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo nos dice que el microorganismo usado en este proyecto pertenece al grupo de riesgo 2.
- En el caso de los residuos generados se tienen dos clases de vertidos: del proceso industrial y del uso doméstico. El del proceso industrial también se divide en dos: del proceso de fabricación y de la limpieza del equipo. El del proceso de fabricación se trata de los residuos de las células muertas, el residuo de la melaza del proceso de producción, un posible resto del ácido láctico producido y de los compuestos añadidos, estos residuos se almacenarían y se llevarían a un gestor medioambiental el cual se encargaría de ello, el de la limpieza del equipo sería agua caliente que es lo que se usa en la esterilización, pero como pueden poseer compuestos de nuestro proceso también se deben tratar con el gestor medioambiental. En el caso de los residuos domésticos, son los

realizados por la utilización de los lavabos por parte del personal de la planta, estos residuos serían enviados directamente a una EDAR.

- De los residuos explicados se sabe que el proceso de este proyecto no genera residuos tóxicos o perjudiciales para el medio ambiente.

8 Conclusiones

Después de haber visto todo el proyecto se puede determinar que:

- Tras la revisión bibliográfica científica se seleccionó el microorganismo *Enterococcus faecalis* como el más adecuado para la producción del ácido láctico.
- Como fuente de carbono se decidió emplear melazas provenientes de la industria azucarera, porque tiene un elevado porcentaje de glucosa, porque no hay que llevar a cabo procesos previos de preparación y tratamiento (upstream) y porque en el lugar de producción es una materia prima fácilmente accesible.
- Se escaló el proceso a un reactor de $8 m^3$ empleando criterios de similitud geométrica y potencia suministrada por unidad de volumen constante.
- Se realizaron simulaciones del proceso para el crecimiento de biomasa, la generación del producto y el consumo de la azúcar utilizando programas informáticos tipo Matlab y Simulink.
- Tras a la revisión bibliográfica científica se determinaron las condiciones óptimas de trabajo; desde la composición inicial del medio de cultivo necesario para el crecimiento óptimo del microorganismo hasta los cálculos necesarios para el control del proceso de fermentación que incluyen concentración de sustrato, temperatura y pH óptimos así como el control del punto final del proceso.

- Tras la revisión bibliográfica se describió el mejor método de purificación.
- Se llevó a cabo la estimación de costes y se determinó una buena viabilidad económica.
- Se comprueba que la finalidad última del proyecto que es producir a partir de una economía circular es viable ya que partiendo del residuo de otra empresa, la melaza, se ha obtenido un producto para la sociedad sin generar otro tipo de residuo peligroso desde el punto de vista medioambiental.
- En el diseño del proceso se ha planteado la posibilidad de generar ese producto según la pureza requerida por el consumidor, lo que hace también que sea versátil.

Referencias

- [1] Parés, R. y Juárez, A. Bioquímica de los microorganismos. 1997. Reverté S. A.
- [2] Conozcamos Las Características De Cada Una De Las Medicinas. (2019). Ácido láctico: ¿Qué es?, para qué sirve, nombre comercial y más.. [online] Available at: <http://farmaciainformativa.com/c-dermatologico/acido-lactico/#Quimica>[Accessed 21 Apr. 2019].
- [3] Eis.uva.es. (2019). Ácido láctico. [online] Available at: http://www.eis.uva.es/~biopolimeros/monica/acido_lactico.htm [Accessed 21 Apr. 2019].
- [4] Méndez-Alva, J., Pérez-Cisneros, E. and Morales-Rodríguez, R. (n.d.). Diseño conceptual de una planta de producción de ácido láctico a partir de residuos de la industria azucarera. Jóvenes en la ciencia, pp.736-740. [Accessed 21 Apr. 2019].
- [5] Archivosdemedicinadeldeporte.com. (2019). [online] Available at:http://archivosdemedicinadeldeporte.com/articulos/upload/Revision_acido_lactico_27_120.pdf [Accessed 21 Apr. 2019].
- [6] Anon, (2019). Benavente, Martha. (2011). Estudio de la fermentación láctica para la extracción de quitina a partir de desechos de crustáceos. Nexo Revista Científica. 24. 33-42. [online] Available at: https://www.researchgate.net/publication/306223520_Estudio_de_la_fermentacion_lactica_para_la_extraccion_de_quitina_a

- [partir_de_desechos_de_crustaceos/figures?lo=1](#) [Accessed 1 May 2019].
- [7] Biolaster.com. (2019). Ácido Láctico. Biolaster. [online] Available at: <https://www.biolaster.com/productos/analisis-lactato/utilidad-acido-lactico/> [Accessed 1 May 2019].
- [8] Ácido láctico. (2019). ¿Qué Es La Acidosis Láctica? Síntomas, Tratamiento y Diagnóstico.. [online] Available at: <https://www.acidolactico.org/acidosis-lactica/> [Accessed 2 May 2019].
- [9] Serna Cock, L. and Rodríguez de Stouvenel, A. (2005). Produccion Biotecnológica de Ácido Láctico: Estado del Arte. Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal, [online] (1), p.11. Available at: http://www.eis.uva.es/~biopolimeros/alberto/_private/acido%20lactico.pdf [Accessed 2 May 2019].
- [10] Hyperphysics.phy-astr.gsu.edu. (2019). Sugars. [online] Available at: <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbasees/Organic/sugar.html> [Accessed 25 Apr. 2019].
- [11] Cmaseanalitica.com. (2019). [online] Available at: <http://www.cmaseanalitica.com/pdf/melaza.pdf> [Accessed 22 Jul. 2019].
- [12] Azucarera.es. (2019). [online] Available at: <https://www.azucarera.es/wp-content/uploads/2018/06/Dossier-Prensa-Azucarera.pdf> [Accessed 22 Jul. 2019].

- [13] Bulut, S., Elibol, M. and Ozer, D. (2004). Effect of different carbon sources on l(+) -lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. *Biochemical Engineering Journal*, 21(1), pp.33-37.
- [14] Wee, Y., Kim, J., Yun, J. and Ryu, H. (2004). Utilization of sugar molasses for economical l(+)-lactic acid production by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(6-7), pp.568-573.
- [15] Lifeder. (2019). *Enterococcus faecalis*: características, morfología, patogenicia - Lifeder. [online] Available at: <https://www.lifeder.com/enterococcus-faecalis/> [Accessed 5 Jun. 2019].
- [16] Characteristics and glycerol metabolism of fumarate-reducing *Enterococcus faecalis*. H. W. Ryu, K. H. Kang, J. G. Pan, H. N. Chang *Biotechnol Bioeng*. 2001 Jan 5; 72(1): 119–124. [Accessed 4 Jun. 2019].
- [17] Conde Estévez, D. (2019). Factores de riesgo para la adquisición de Bacteriemia por *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*. Doctorado. Universitat Autònoma de Barcelona. [Accessed 5 Jun. 2019].
- [18] Valbruna.com.mx. (2019). ACEROS INOXIDABLES AUSTENITICOS – Valbruna México. [online] Available at: <http://valbruna.com.mx/clasificacion-de-los-acero-inoxidables/aceros-inoxidables-austeniticos/> [Accessed 16 Jun. 2019].
- [19] Liu, S. (2019). Chapter 17 - Bioreactor Design Operation. In: S. Liu, ed., *Bioprocess Engineering*, 2nd ed. [online] Suny Esf Department of Paper and Bioprocess Engineering, Syracuse, NY, USA:

- Elsevier, pp.1007-1058. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444637833000174> [Accessed 17 Jun. 2019].
- [20] Nandasana, A.; Kumar, S., “Kinetic modeling of lactic acid production from molasses using *Enterococcus faecalis* RKY1”, *Biochemical Engineering Journal*, vol. 38, n.º 3, 2008, pp. 277-284, fecha de consulta 27 junio 2019, .
- [21] The European Fermentation Industry A Case Study, Carbohydrates Sector Group, fecha de consulta 24 junio 2019.
- [22] “Fermentador/tanque De Fermentación/fermentación Tanque/biorreactor - Buy Fermentor,Fermentor,Bioreactor Product on Alibaba.com”, www.alibaba.com, 2019, fecha de consulta 1 julio 2019, en <https://spanish.alibaba.com/product-detail/Fermentor-fermentation-tank-fermenting-tank-bioreactor-388331771.html?spm=a2700.galleryofferlist.normalList.92.34657cceRGNUjA>
- [23] Association of Metallurgical Engineers of Serbia (AMES), INVESTIGATING THE COOLING RATE OF CANE MOLASSES AS QUENCHING MEDIUM FOR 0.61 % C HIGH CARBON STEELS, Serbia, 2016, pp. 39-50, fecha de consulta 2 julio 2019, en http://metalurgija.org.rs/mjom/vol22/no1/6_Dodo_MME-2201.pdf.

- [24] del Pozo García, M.; Díaz Llorens, F.; Procas, S.; Marquino, A.; Tellado del Pozo, A.; Vila Torrent, A., “Planta de producción de ácido láctico”, 2010, Universitat Autònoma de Barcelona.
- [25] Schamis, E., “Purificación del ácido láctico : Purificación del ácido láctico : Estudio previo”, Universidad de buenos aires, fecha de consulta 5 julio 2019, en https://digital.bl.fcen.uba.ar/download/tesis/tesis_n0826_Schamis.pdf
- [26] Martín, V., academia.edu, 2019, fecha de consulta 5 julio 2019, en https://www.academia.edu/6683585/Mini_estudio_mercado_acido_lactico.
- [27] “Lactic Acid Market Size & Share Industry Growth Report, 2018-2025”, Grandviewresearch.com, 2019, fecha de consulta 5 julio 2019, en <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/lactic-acid-and-poly-lactic-acid-market>.
- [28] “Tanque De Almacenamiento De Agua De Acero Inoxidable - Buy Tanque De Almacenamiento De Leche,Tanque De Almacenamiento De Aceite,Tanque De Almacenamiento 10000 Litros Product on Alibaba.com”, www.alibaba.com, 2019, fecha de consulta 22 julio 2019, en <https://spanish.alibaba.com/product-detail/Stainless-Steel-Water-Storage-Tank-60802795603.html?spm=a2700.galleryofferlist.normalList.26.45325fb3QLDXLM&s=p>.
- [29] “Intercambiador De Calor Industrial Con Placa De Titanio Precio - Buy Intercambiador De Calor Industrial,Placa

- De Titanio,Intercambiador De Placas Product on Alibaba.com”, www.alibaba.com, 2019, fecha de consulta 23 julio 2019, en <https://spanish.alibaba.com/product-detail/industrial-heat-exchanger-with-titanium-plate-60433107192.html?spm=a2700.galleryofferlist.normalList.10.61f8469aD1zUhF&s=p>.
- [30] “1200l Industrial Flauta Columna De Destilación Precio Para Ginebra Equipo - Buy Columna De Destilación De Flauta,Torres De Destilación Máquina De Ginebra Equipo De Destilería De Brandy,Columna De Destilación Industrial Precio Product on Alibaba.com”, www.alibaba.com, 2019, fecha de consulta 23 julio 2019, en <https://spanish.alibaba.com/product-detail/1200L-industrial-flute-distillation-column-price-62166890614.html?spm=a2700.galleryofferlist.normalList.37.57b2584c2YVI64&s=p>.
- [31] 2019, fecha de consulta 23 julio 2019, en <https://www.agroterra.com/s/melaza+cana>.
- [32] “Encuentre el mejor fabricante de extracto de levadura precio y extracto de levadura precio para el mercado de hablantes de spanish en alibaba.com”, Spanish.alibaba.com, 2019, fecha de consulta 23 julio 2019, en <https://spanish.alibaba.com/f/extracto-de-levadura-precio.html>.
- [33] 2019, fecha de consulta 27 julio 2019, en https://www.fishersci.co.uk/shop/products/sodium-hydroxide-solution-10m-10n_

ca-40-w-v-standard-solution-ready-to-use-volumetric-analysis-5/
p-7073195.

- [34] “Catálogo de fabricantes de K₂hpo₄ Precio de alta calidad y K₂hpo₄ Precio en Alibaba.com”, Spanish.alibaba.com, 2019, fecha de consulta 23 julio 2019, en <https://spanish.alibaba.com/g/k2hpo4-price.html>.
- [35] “Catálogo de fabricantes de K₂hpo₄ Precio de alta calidad y K₂hpo₄ Precio en Alibaba.com”, Spanish.alibaba.com, 2019, fecha de consulta 27 julio 2019, en <https://spanish.alibaba.com/g/k2hpo4-price.html>.
- [36] Michaelpage.es, 2019, fecha de consulta 27 julio 2019, en https://www.michaelpage.es/sites/michaelpage.es/files/ER_PageExecutive_2018.pdf.
- [37] “¿Cuáles son los sueldos de ingenieros en España?”, Blog de Empleo - Jobandtalent, 2019, fecha de consulta 27 julio 2019, en <https://blog.jobandtalent.com/sueldos-de-ingenieros-espana/>.
- [38] mantenimiento, T., “Salarios para empleos de Técnico/a en mantenimiento en España — Indeed.es”, Indeed.es, 2019, fecha de consulta 27 julio 2019, en <https://www.indeed.es/salaries/T\unhbox\voidb@x\bgroup\let\unhbox\voidb@x\setbox\@tempboxa\hbox{e\global\mathchardef\accent@spacefactor\spacefactor}\accent19e\egroup\spacefactor\accent@spacefactor\futurelet\@let@token\penalty\@M\hskip\z@skipcnico/a-en-mantenimiento-Salaries>.
- [39] “Apartado 7: Evaluación Económica.”, Universidad autónoma de Barcelona.

- [40] “Ácido láctico alimentario (25 litros)”, Vadequimica.com, 2019, fecha de consulta 27 julio 2019, en <https://www.vadequimica.com/acido-lactico-alimentario-25litros.html>.
- [41] 80 %, Á.; faltar, “Creandocosmetica Ácido Láctico 80%”, Creando Cosmética, 2019, fecha de consulta 27 julio 2019, en <https://creandocosmetica.com/activos-y-aditivos-cosmeticos/173-acido-lactico-80.html>.
- [42] “Préstamos para empresas: cómo financiar tu negocio”, HelpMyCash.com, 2019, fecha de consulta 27 julio 2019, en <https://www.helpmycash.com/creditos/prestamos-para-empresas/>.