



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

CAMPUS D'ALCOI

Diseño del bioproceso productivo de Ácido Hialurónico

TRABAJO FIN DE GRADO

Alumno: **Jordi Arévalo Aguado**

Tutor: Lucas Santos-Juanes Jordá

Titulación: Grado en Ingeniería Química

Fecha de defensa: **Septiembre de 2019**

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	9
1.1	¿QUÉ ES UN BIOPROCESO?	9
1.2	CARACTERÍSTICAS DE BIOPROCESOS INDUSTRIALES	9
1.3	BIOCATALIZADORES	10
1.4	TIPOS DE BIOPROCESOS	12
1.5	IMPORTANCIA DE LOS BIOPROCESOS.....	13
1.6	MERCADO	14
1.7	ÁCIDO HIALURÓNICO	17
1.8	HISTORIA DEL ÁCIDO HIALURÓNICO Y SU INVESTIGACIÓN.....	19
1.9	Usos.....	21
1.10	EVOLUCIÓN DE LA PRODUCCIÓN	25
1.11	PRODUCCIÓN POR VÍA DE EXTRACCIÓN DE PARTES DE ANIMALES.....	26
1.12	PRODUCCIÓN POR VÍA BIOQUÍMICA	26
2	OBJETIVOS	29
3	METODOLOGÍA	30
3.1	DESCRIPCIÓN DEL MICROORGANISMO Y LAS CONDICIONES DE TRABAJO	30
3.2	DESCRIPCIÓN MATERIAS PRIMAS	32
3.3	DESCRIPCIÓN DEL PROCESO	37
3.4	DESCRIPCIÓN DEL EQUIPO Y ESCALADO	38
3.5	DESCRIPCIÓN ESTUDIO ECONÓMICO	42
4	EXPERIMENTAL (CÁLCULOS)	46
4.1	CÁLCULO DEL TAMAÑO DEL REACTOR/REACTORES	46
4.2	CÁLCULO DEL ESCALADO, REVOLUCIONES POR MINUTO DEL AGITADOR, DIÁMETROS DE LOS REACTORES Y AGITADOR Y ESCALADO DEL AIREADOR.....	49
4.3	CÁLCULO DE LAS CANTIDADES NECESARIAS DE MATERIAS PRIMAS	53
4.4	CÁLCULO DEL TAMAÑO DE LOS TANQUES DONDE SE REALIZARÁ LA HIDRÓLISIS ÁCIDA Y DE LAS CANTIDADES DE ÁCIDO Y AGUA NECESARIAS	68

4.5	CÁLCULO DE LA CANTIDAD DE NaOH A AÑADIR PARA NEUTRALIZAR EL ÁCIDO DEL PROCESO DE HIDRÓLISIS	71
4.6	CÁLCULO DE LA CANTIDAD DE AGUA A EVAPORAR TRAS LA HIDRÓLISIS ÁCIDA.....	73
4.7	CÁLCULO DEL MEDIO DE CRECIMIENTO DEL MICROORGANISMO.....	73
4.8	CÁLCULO DE LOS PARÁMETROS DE LA OPERACIÓN DE PURIFICACIÓN DEL ÁCIDO HIALURÓNICO AL FINAL DEL PROCESO	75
4.9	CÁLCULO DEL ÁREA TOTAL DEL INTERCAMBIADOR DE CALOR.....	77
5	ANÁLISIS ECONÓMICO	84
5.1	PRESUPUESTO DE INVERSIÓN	84
5.2	PRESUPUESTO DE EXPLOTACIÓN.....	86
5.3	VAN.....	93
5.4	TIR	94
5.5	PAY-BACK.....	94
6	DISEÑO DE LA PLANTA	95
7	LEGISLACIÓN Y NORMATIVA.....	96
7.1	LEGISLACIÓN Y NORMAS APLICABLES A LA PLANTA INDUSTRIAL	96
7.2	FICHA DA DATOS DE SEGURIDAD (FDS) SEGÚN LOS GRADOS DE NFPA	98
7.3	PELIGROSIDAD DEL MICROORGANISMO SEGÚN SU NIVEL DE BIOSEGURIDAD	102
8	CONCLUSIONES	103
9	BIBLIOGRAFÍA	104

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. INDUSTRIAS DONDE MÁS SE UTILIZAN LOS BIOPROCESOS	15
TABLA 2. VOLUMEN DE MERCADO DE LOS BIOPROCESOS EN EL AÑO 2000	16
TABLA 3. CONVERSIÓN DE GLUCOSA EN AH SEGÚN RATIOS C:N	53
TABLA 4. KG DE GLUCOSA NECESARIOS.....	54
TABLA 5. KG DE CELULOSA NECESARIA.....	56
TABLA 6. KG DE PIELES DE NARANJA NECESARIAS	57
TABLA 7. COMPOSICIÓN MÁSCICA DE LA MOLÉCULA DE GLUCOSA.....	58
TABLA 8. PORCENTAJES DE EXTRACTO DE LEVADURA Y CASEÍNA DE PEPTONA.....	59
TABLA 9. KG NECESARIOS DE EXTRACTO DE LEVADURA	60
TABLA 10. KG DE CASEÍNA DE PEPTONA NECESARIOS	61
TABLA 11. KG DE K ₂ HPO ₄ NECESARIOS	63
TABLA 12. KG DE MGCL ₂ NECESARIOS.....	64
TABLA 13. KG DE NA ₂ CO ₃ NECESARIOS.....	65
TABLA 14. KG DE GLUTAMINA NECESARIOS	66
TABLA 15. KG DE GLUTAMATO	67
TABLA 16. KG DE ÁCIDO OXÁLICO NECESARIOS	68
TABLA 17. KG DE FUENTE DE CARBONO NECESARIOS PARA CUMPLIR 1 CICLO	68
TABLA 18. KG DE NAOH NECESARIOS.....	72
TABLA 19. G DE MEDIO THB NECESARIOS ASÍ COMO SU VOLUMEN DE AGUA	75
TABLA 20. LITROS DE ETANOL NECESARIOS PARA LOS LAVADOS FINALES DEL PRODUCTO	77
TABLA 21. PRESUPUESTO DE INVERSIÓN (€).....	84
TABLA 22. PRECIO DE LAS MATERIAS PRIMAS (€/AÑO)	86
TABLA 23. COSTES DE LOS SUELDOS (€/AÑO).....	87
TABLA 24. COSTE DE LA ENERGÍA (€/AÑO).....	88
TABLA 25. COSTE DE LOS LITROS DE AGUA CONSUMIDA (€/AÑO)	89

TABLA 26. COSTE DEL MANTENIMIENTO DE LA MAQUINARIA (€/AÑO)	90
TABLA 27. COSTE TOTAL DE LAS AMORTIZACIONES (€/AÑO).....	91
TABLA 28. PRESUPUESTO DE EXPLOTACIÓN Y DE INSTALACIÓN	92
TABLA 29. BENEFICIOS DE LA VENTA DE ÁCIDO HIALURÓNICO (€/AÑO).....	92
TABLA 30. FDS SEGÚN GRADOS DE NFPA DE LOS COMPUESTOS DEL BIOPROCESO.....	101
TABLA 31. FDS DEL PROCESO GENERAL.....	102
TABLA 32. NIVEL DE BIOSEGURIDAD DEL MICROORGANISMO	102

Resumen

En este trabajo fin de grado se ha estudiado la viabilidad de un proceso de producción de ácido hialurónico a escala industrial. Se ha fijado una producción de 1 millón de toneladas al año. Se han contrastado y seleccionado las diferentes condiciones del proceso, así como materias primas y el microorganismo a utilizar a partir de artículos científicos. El microorganismo utilizado ha sido *Streptococcus equi subsp. Zooepidemicus*, en unas condiciones de *pH* neutro y una temperatura de 36°C que son las adecuadas para este microorganismo. La fuente de carbono del proceso se ha elegido la glucosa y se ha mantenido un ratio *C:N* de 7.5. Se han escalado las cantidades de cada materia prima, así como el volumen y dimensiones de los equipos junto con el diseño de un intercambiador de calor para el fermentador principal del proceso. Finalmente se ha hecho un análisis económico de la viabilidad de la planta mediante el uso del VAN, el TIR y el Pay-Back. Además, se ha incluido un diseño de la planta para tener una idea espacial del proceso.

Palabras clave: Bioproceso, ácido hialurónico, microorganismo, escalado, producción.

Resum

En aquest treball fi de grau, s'ha estudiat la viabilitat d'un procés de producció d'àcid hialurònic a escala industrial. S'ha fixat un a producció d'1 milió de tones a l'any. S'han contrastat i seleccionat les diferents condicions del procés així com les matèries primes i el microorganisme a utilitzar a partir d'articles científics. El microorganisme a utilitzar ha sigut *Streptococcus equi subsp. Zooepidemicus*, en unes condicions de *pH* neutres i una temperatura de 36°C que son les adequades per a aquest microorganisme. La font de carboni del procés s'ha elegit glucosa i s'ha mantingut un rati *C:N* de 7.5. S'han escalat les quantitats de cada matèria prima, així com el volum i dimensions dels equips juntament amb el disseny d'un intercanviador de calor per al fermentador principal del procés. Finalment, s'ha fet un anàlisi econòmic de la viabilitat de la planta mitjançant l'ús del VAN, TIR i Pay-Back. A més, s'ha inclòs un disseny de la planta per a tenir una idea espacial del procés.

Paraules clau: Bioprocés, àcid hialurònic, microorganisme, escalat, producció.

Abstract

In this degree final thesis, it has been studied the viability of a hyaluronic acid industrial production process. The production has been set in 1 million tonnes per year. The different conditions and raw materials as well as the microorganism have been contrasted and selected from scientific articles. The microorganism selected, was *Streptococcus equi subsp. Zooepidemicus*, in neutral *pH* conditions and a temperature of 36 °C which are the most suited for this microorganism. The carbon source of the process has been the glucose, and it has been maintained a *C:N* ratio of 7.5. Each raw material quantity as well as the volume and dimensions of the different equipment has been scaled up along with the design of a heat exchanger for the main fermentator of the process. Finally, an economical analysis has been done in order to check the viability of the plan through the use of techniques such as *VAN*, *TIR* and *Pay-Back*. Also, a plant design in order to have an spatial thought of it has been included.

Keywords: Bioprocess, hyaluronic acid, microorganism, scaled up, production.

1 Introducción

1.1 ¿Qué es un bioproceso?

Un bioproceso es un proceso específico en el que se utilizan microorganismos o enzimas con el fin de obtener un determinado producto. Unos determinados sustratos serán transformados por acción de estos microorganismos, enzimas o células en biomasa y productos. Básicamente se puede resumir en la Ilustración 1. Definición de bioproceso

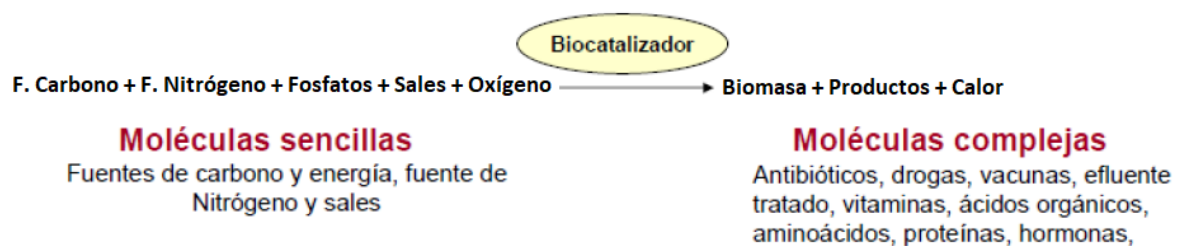


Ilustración 1. Definición de bioproceso

Donde el biocatalizador sería el susodicho microorganismo, enzima, células, hongos, microalgas... Un bioproceso toma lugar bajo unas ciertas condiciones muy específicas, es por ello por lo que todo debe estar muy controlado en cada momento, tanto temperatura, como *pH*, niveles de oxígeno disueltos... En caso de no conseguir controlar estos parámetros adecuadamente, es posible que el biocatalizador como un microorganismo, no llegue a crecer adecuadamente o incluso muera. Es por ello por lo que se suelen utilizar biorreactores donde todos estos parámetros puedan ser controlados. Además, habrá una liberación de CO_2 y de calor al medio.

1.2 Características de bioprocesos industriales

1.2.1 Características cinéticas

En cuanto a la cinética de estas reacciones, por norma general suelen ser más lentas que los procesos químicos. Por otro lado, son reacciones auto catalíticas como se ha visto. No obstante, este tipo de procesos tiene una muy fuerte dependencia de las condiciones ambientales, por lo que hay que controlar muy a conciencia las condiciones al trabajar.

Hay reacciones que pueden sufrir inhibición tanto por parte del producto, del sustrato o incluso por ambos. El producto puede ocupar el centro activo de una enzima evitando así que reaccione con el sustrato para seguir dando producto.

1.2.2 Características termodinámicas y de transferencia de materia

En cuanto a la termodinámica de las biorreacciones, éstas, suelen presentar bajas entalpías de reacción. La entalpía de reacción no es más que, al tener lugar una reacción, se crean y se destruyen enlaces entre átomos, provocando un cambio en la energía del sistema. El cambio de energía que tiene lugar durante una reacción será la entalpía de reacción. También, a diferencia de algunos procesos químicos en los que hay que aumentar en gran medida la temperatura y hay que aplicar grandes presiones, en un bioproceso la temperatura y la presión de operación suelen tener unos valores moderados, ya que hay que tener en cuenta de que si se trabaja con microorganismos estos podrían morir si hay una temperatura muy alta.

En un bioproceso, para que haya transferencia de materia, debe haber contacto entre 2 estados, sólido-líquido, líquido-gas, líquido-líquido... Materia en estado sólido suele estar presente ya que las fuentes de carbono o nitrógeno, por ejemplo, suelen estar en este estado, por lo que prácticamente siempre se trabajará con esto.

1.3 Biocatalizadores

1.3.1 Enzimas

Las enzimas son proteínas en las que entra el sustrato y toma lugar la reacción para producir un producto. El lugar donde entra el sustrato se conoce como centro activo y tiene una configuración espacial y de cargas que son complementarias a la del sustrato.

Las enzimas encuentran su fuente de origen en uno de estos tres casos:

- Enzimas de origen animal, donde estas provienen mayormente de órganos, huesos o mucosas corporales.

- Enzimas de origen vegetal, donde provienen de frutos de árboles como papayas, soja, cítricos o ricino, la enzima de la cual es una muy potente toxina que puede provocar incluso la muerte.
- Enzimas de origen microbiano, provenientes de levaduras, hongos o bacterias

Según el proceso a trabajar, convendrá más la utilización de unos o de otros ya que parámetros tan básicos como el rango de temperatura, de *pH*, su coste o incluso la especificidad del sustrato pueden afectarles en gran medida.

1.3.2 Microorganismos

Ocupan el mayor porcentaje de uso en cuanto a biocatalizador. Tienen una clasificación muy marcada:

- Según su fuente de carbono, si necesitan carbono inorgánico se tratará de un microorganismo autótrofo. Por el contrario, si necesita una fuente de carbono orgánico se hablará de heterótrofos.
- Según su fuente de energía pueden ser quimiótrofos si su energía procede de energía química o fotótrofos si procede de la energía solar.
- Según su estructura interna se puede hablar de microorganismos procariontes los cuales no poseen ni un núcleo ni organelos o por el contrario eucariontes, los cuales si que poseen ambos.

Su uso es muy atractivo debido en gran medida a varias características:

- Gran variedad de microorganismos, con una gran cantidad de estos por descubrir.
- Poseen unas capacidades metabólicas muy amplias, las más amplias de entre todos los seres vivos. Debido a las capacidades de biosíntesis y degradativas que poseen los microorganismos abren las puertas de un gran número de aplicaciones.
- Su crecimiento es muy rápido a comparación de otros seres vivos, y además poseen una muy fácil manipulación lo cual fomenta sus usos industriales.

1.4 Tipos de bioprocesos

Se distinguen tres tipos:

1.4.1 Discontinuo o por lotes

Suele ser la forma de llevar a cabo un bioproceso más común y el que se utilizará en este trabajo. Al introducir todas las materias primas en el medio y estar adecuado, se introduce el microorganismo. Se deja un tiempo en el que el microorganismo va produciendo el producto deseado y al final de este, se abre el fermentador y se cosecha el producto generado. Durante este tipo de llevar a cabo un bioproceso existen varias fases:

- Fase *lag*. Es la fase inicial en la que el microorganismo se debe acostumbrar al medio
- Fase exponencial. Es la fase en la que la velocidad de producción del microorganismo crece en mayor medida
- Fase lineal. Puede darse el caso en que un nutriente llegue a ser limitante, bajando la rápida subida de velocidad de producción
- Fase estacionaria. Las condiciones del medio empiezan a ser muy justas, es decir los nutrientes empiezan a encontrarse en concentraciones limitantes manteniendo la velocidad de producción constante durante un periodo de tiempo
- Fase declive. Las células empiezan a morir a un ritmo notable.

1.4.2 Continuo

El medio está siendo añadido continuamente, sin parar a un ritmo constante. Al otro lado hay una salida de medio, manteniendo así el volumen constante.

1.4.3 Semicontinuos

En un medio continuo a veces se presenta la dificultad de cosechar y diluir. Este tipo se opera parecido a los discontinuos, pero se va cosechando y introduciendo medio nuevo cada cierto tiempo.

1.5 Importancia de los bioprocesos

Los bioprocesos tienen una alta importancia debido a su alta intervención en numerosos sectores como:

- Medicina. Producción de medicamentos y vacunas. Un ejemplo sería la producción de la vacuna contra el tétanos, producida normalmente gracias al microorganismo *Clostridium tetani*, así como la insulina que se produce normalmente gracias a la *Escherichia coli*. (V. Goeddel, y otros, 1978)
- Sector alimentario. Producción de alcoholes, por ejemplo.
- Sector de materiales. El caso de polímeros como el Xantanos, proveniente de *Xanthomonas Campestris*. (Palaniraj & Jayaraman, 2011)

Ya desde la antigüedad, los bioprocesos han ayudado al ser humano a sobrevivir y a cumplir ciertas necesidades. Los primeros bioprocesos aparecieron hace ya miles de años, empezado por el antiguo Egipto, los cuales utilizaban ya estos bioprocesos para elaborar cerveza y pan, dos de los elementos con más antigüedad de la historia del ser humano. Allá por el segundo milenio antes de cristo, hay pruebas de procesos de destilación para producción de Etanol.

Remontándonos ya al siglo XVIII, nos topamos con el investigador Edgar Jenner, el cual se dio cuenta que entre la población rural era común contraer la viruela, pero concretamente vacuna. Esta variante era mucho más leve que su contraparte humana y vio que aquellos que la contraían, posteriormente eran inmunes a la humana. Tras experimentar con algún niño confirmo su hipótesis y así es como descubrió oficialmente la primera vacuna de la historia de la humanidad.

En el siglo XIX, los conocimientos sobre sistemas biológicos aumentaron, dando paso a lo que se conoce como la biotecnología moderna.

Finalmente, a principios del siglo XX, se lograron llevar a cabo los primeros bioprocesos a escala industrial, trataban de fermentaciones con el fin de obtener ácido cítrico y penicilina. En la segunda mitad de siglo, Eli Lilly consiguió obtener el primer producto genéticamente modificado, insulina humana.

Como se ha visto, el ser humano empezó realizando bioprocesos muy básicos en los que solo utilizaban levaduras y hongos, de ahí el ser humano ha ido evolucionando y ampliando su conocimiento hasta el punto de que, actualmente, utiliza catalizadores como enzimas o células animales. Otras opciones han sido utilizadas, aunque en menor proporción, hablamos por ejemplo de células vegetales. (Heinzle, Biwer, & Cooney, 2006)

1.6 Mercado

Actualmente, la industria global de los bioprocesos se encuentra al alza, debido mayormente a las ventajas que pueden presentar los bioprocesos frente a los procesos tradicionales como puede ser los métodos de producción no nocivos para la salud y la menor contaminación que supone la utilización de estos procesos.

Durante los últimos años, la concienciación por parte de la gente sobre la contaminación que está causando el hombre y el grave estado del planeta Tierra, hace que se fomente el desarrollo de procesos que impliquen el menor impacto ambiental posible. El desarrollo de bioprocesos en sustitución de procesos convencionales los cuales producían unos altos niveles de contaminación tanto a las aguas como al aire y los suelos es un hecho. Por esto, las industrias llevan años viendo y explotando una oportunidad de negocio en todos aquellos productos que puedan ser producidos biológicamente, ya sean medicamentos o combustibles.

Es por todo esto por lo que es innegable la importancia que tienen los bioprocesos en la industria, lo cual repercute directamente en la economía (Heinzle, Biwer, & Cooney, 2006). A continuación, se muestra una tabla con las industrias que más utilizan los bioprocesos:

	Escala	Productos
Productos químicos básicos	Muy grande	Moléculas orgánicas pequeñas
Productos químicos complejos	Media	Moléculas orgánicas pequeñas
Detergentes	Grande	Enzimas
Salud / Cosmética	Pequeña/Media	Proteínas y pequeñas moléculas
Farmacéutica convencional	Media	Moléculas orgánicas pequeñas
Biofarmacéutica	Pequeña	Proteínas
Alimentaria	Muy grande	Proteínas y demás
Minería de metales	Muy grande	Metales y compuestos metálicos
Tratamientos de residuos	Muy grande	Purificación de aguas, aire y suelos

Tabla 1. Industrias donde más se utilizan los Bioprocesos

Como se puede observar, a la cabeza de la utilización de bioprocesos están la industria química con la producción de productos químicos básicos junto con la industria alimentaria, la minería de metales y tratamientos de residuos. La industria de productos químicos básicos se centra en la producción de moléculas orgánicas pequeñas, la minería de metales utiliza bioprocesos para producir los propios metales e incluso algún compuesto metálico, así como la desulfuración de combustibles fósiles o la recuperación de metales de una solución. No obstante, en la industria de los metales se están estudiando aun aplicaciones de bioprocesos a metales como cobre y oro. (Lawrence, 1998) Por otro lado, en lo que concierne a los tratamientos de residuos, la utilización de microorganismos para la purificación de aguas, suelos y aires está ampliamente estudiado.

En cuanto al volumen de mercado de los bioproductos, lo más (A. Selyanin, Ya. Boykov, & N. Khabarov, 2015) actualizado que se ha encontrado han sido datos del año 2000, no obstante, servirán para hacerse una idea del mercado que había entonces y mas o menos como seguirá la tendencia. En el siguiente gráfico se muestra el volumen de mercado de los bioproductos en el año 2000 teniendo las ventas totales estimadas un valor de entorno a 60 mil millones de dólares (Heinzle, Biwer, & Cooney, 2006):

	% De ventas	Productos típicos
Antibióticos	42	Penicilinas
Proteínas terapéuticas	25	Insulina
Otros productos farmacéuticos	17	Esteroides
Aminoácidos	8	Glutamato
Enzimas	3	Celulasa
Ácidos orgánicos	3	Ácido cítrico
Vitaminas	1	B12
Polisacáridos	1	Xantano

Tabla 2. Volumen de mercado de los bioprocesos en el año 2000

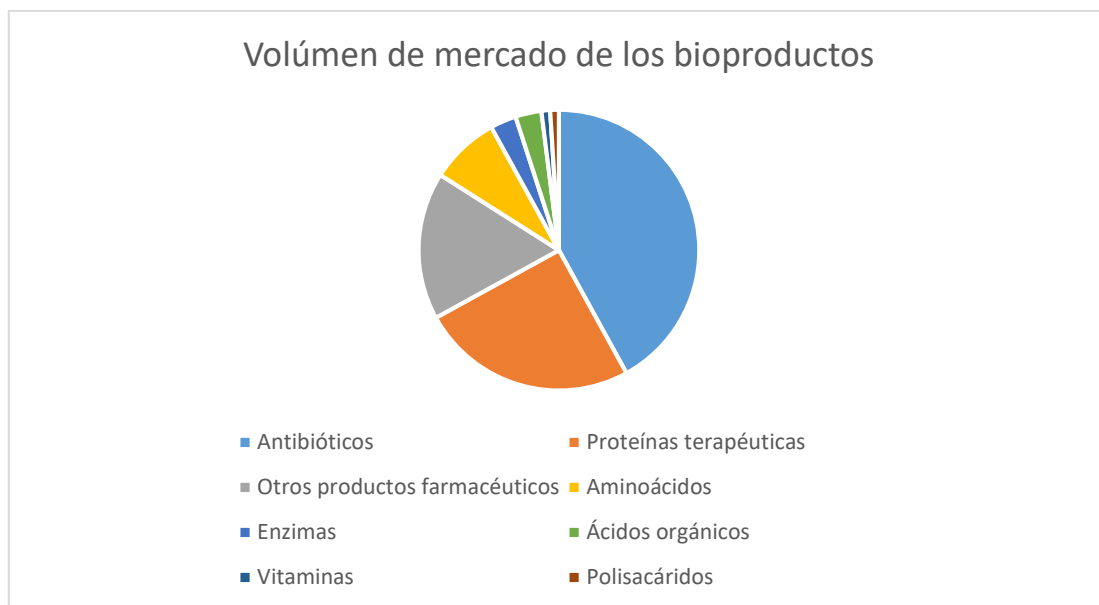


Gráfico 1. Volumen de mercado de los bioprocesos en el año 2000

Se puede ver como los antibióticos solos representan casi el 42% del total de ventas de bioproductos, esto es completamente deducible debido a la cantidad de personas en el mundo y la cantidad de enfermedades que se pueden desarrollar. En segundo lugar, con un 25% se encuentran las proteínas terapéuticas como la insulina. La insulina por ejemplo es una hormona que facilita el uso de la glucosa que se encuentra en sangre, no obstante, un gran porcentaje de la población sufre algún tipo de diabetes, con lo que o su cuerpo no produce insulina o no la produce en la cantidad que su cuerpo necesita por lo que necesitan de inyecciones de insulina para solucionar este

problema. Seguidamente se encuentran otros productos farmacéuticos varios en un 17%, y otros productos que representan un 16% del total, como son aminoácidos, ácidos orgánicos o vitaminas.

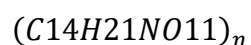
1.7 Ácido hialurónico

1.7.1 ¿Qué es?

En 1934, una pareja de investigadores, John Palmer y Karl Meyer, descubrieron a partir de su extracción del humor vítreo de ganado bovino, la existencia de un polisacárido con un muy raro alto peso molecular al cual llamaron Ácido Hialurónico (HA), nombre proveniente de la unión de dos palabras, Ácido urónico y hialoideo, palabra que hace referencia a su parecido con el cristal. Aunque en un primer momento se descubrió en el humor vítreo de ganado bobino, no se tardó en seguir investigando este compuesto y en descubrir de su existencia en numerosas partes de los tejidos de los seres vivos vertebrados, como por ejemplo en los cordones umbilicales, en los fluidos de las articulaciones, en la piel, en crestas de gallo... (A. Selyanin, Ya. Boykov, & N. Khabarov, 2015)

Este compuesto, está formado por disacáridos como el ácido glucurónico y el N-Acetilglucosamina, los cuales se encuentran unidos por enlaces $\beta(1-3)$ y $\beta(1-4)$. En la **Ilustración 2. Monómero de Ácido Hialurónico**, puede observar la estructura del monómero del ácido hialurónico. Como se puede observar, está compuesto por Ácido glucurónico y N-Acetilglucosamina los cuales forman cadenas de monómeros muy numerosas (Hui Sze, C. Brownlie, & A. Love, 2016).

La fórmula de su molécula es la siguiente:



La molécula de ácido hialurónico está compuesta por 14 átomos de Carbono, 21 átomos de Hidrógeno, 1 átomo de Nitrógeno y finalmente 11 átomos de Oxígeno. Esto significa que el monómero tiene un peso molecular de 379 g/mol. No obstante, el peso molecular del ácido hialurónico varía mucho dependiendo de la forma en que se haya sintetizado o de donde se encuentre. Los pesos moleculares del ácido hialurónico pueden variar enormemente, desde un orden de magnitud de 10^4 hasta incluso a ordenes de magnitud de 10^7 .

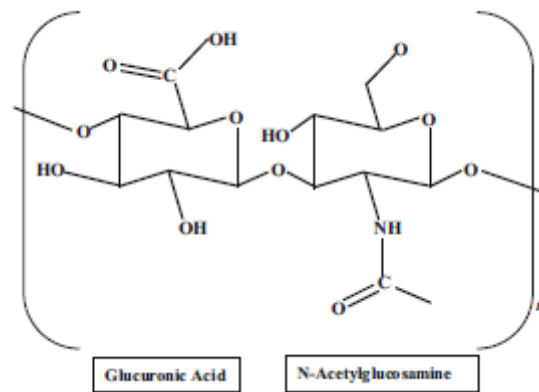


Ilustración 2. Monómero de Ácido Hialurónico (Hui Sze, C. Brownlie, & A. Love, 2016)

Actualmente, los métodos de obtención de Ácido Hialurónico a niveles que sea viable su comercialización son principalmente a partir de producción mediante microorganismos, como por ejemplo de las familias *Bifidobacterium*, *Streptococcus* o *Bacillus*, o a partir de tejidos de seres vivos vertebrados como pueden ser las crestas de gallo, las cuales poseen una alta cantidad de Ácido Hialurónico en relación con otros métodos de obtención a partir de otros restos de seres vivos como pieles o humor vítreo como se ha mencionado anteriormente (Hui Sze, C. Brownlie, & A. Love, 2016).

El Ácido hialurónico posee unas propiedades únicas. Es un biopolímero lineal, es decir, son macromoléculas (proteínas, polisacáridos...) que se puede encontrar en gran parte de los seres vivos vertebrados y que además forman largas cadenas de átomos. Se encuentra en la matriz extracelular de los tejidos neurales, conectivos y en los epiteliales de los vertebrados. Como se verá más adelante, tiene un alto uso y valor comercial en los sectores de cosmética y farmacéutica debido a sus propiedades viscoelásticas, a su alta retención de la humedad y a su gran biocompatibilidad entre otros. Es por esto por lo que, tiene gran uso en trato de heridas, inflamaciones y actualmente se está investigando su uso con el fin de intentar curar o paliar los efectos del cáncer (Brown & Jones, 2005).

Un ser humano medio, con un peso en torno a 70 kg, tiene en su cuerpo aproximadamente 15 gramos de ácido hialurónico en el cuerpo y cada día se degrada y sintetiza más o menos un tercio de éste (Chemik, 2012).

Es una molécula que naturalmente tiene carga negativa debido a los grupos carbonilos que contiene, es por esto por lo que tiene la capacidad de unirse a grandes cantidades de agua para así formar un gel viscoso el cual es de alta utilidad en numerosos sectores.

1.8 Historia del Ácido Hialurónico y su investigación

El descubrimiento de este compuesto dio que hablar ya que poseía propiedades únicas, haciéndolo así diferente del resto de glicosaminoglicanos. El ácido hialurónico contenía ácidos urónicos y aminoazúcares y sin embargo no contenía trazas de pentosa ni sulfatos.

Como se ha dicho anteriormente, se descubrió en 1934 por parte de John Palmer y Karl Meyer a partir de extraerlo del humor vítreo del ganado bovino. A partir de este descubrimiento, numerosos investigadores empezaron a estudiar este nuevo compuesto.

En 1928, el médico e investigador F. Duran i Reynals, fue capaz de encontrar en testículos de conejo, un compuesto activo el cual inyectándolo junto a tinta negra se observaba una propagación muy rápida del color negro a través del tejido conectivo. Al seguir investigando, se descubrió que se estaba produciendo un aumento de la permeabilidad del tejido conectivo, debido a una despolimerización de su Ácido Hialurónico, su sustancia básica. Se concluyó que este extracto contenía una enzima específica, a la que se le dio el nombre de “*hialuronidasa*”. Este descubrimiento, significó que existía una enzima que podía romper selectivamente la molécula de Ácido Hialurónico y además, ayudó a definir su estructura.

En 1937 F. Kendall fue capaz de aislar hialuronano a partir de los grupos A y C de *Streptococcus* lo cual, tuvo una notable importancia debido a que actualmente, los grupos de *Streptococcus* son la fuente de producción industrial más económica y fiable de Ácido Hialurónico.

En 1943, los investigadores E.A. Balazs y L. Piller descubrieron que, en el caso de las rodillas perrunas, la sustancia intercelular del tejido conectivo de la sinovia contiene mucosa viscosa suficiente como para sustituir la eliminada de la rodilla por motivos diversos. Estos estudios permitieron realizar estudios sobre el rol del ácido hialurónico en rodillas, sanas y con alguna clase de traumatismo.

En 1949, se publicó por parte de los investigadores C. Ragan y K. Mayer, el que sería el primer estudio en el cual se compararían diferentes fluidos sinoviales, sanos y con algún tipo de patología,

mediante la determinación de dos propiedades del Ácido Hialurónico, su viscosidad y su concentración.

En el periodo de entre 1948 y 1951, los investigadores dedicaron gran parte de sus esfuerzos en intentar definir la estructura del Ácido Hialurónico. Finalmente, en 1951, los científicos A. G. Ogston y J. E. Stanier sacaron a la luz la primera información relevante hasta la fecha acerca de la estructura de la macromolécula de Ácido Hialurónico en solución acuosa. Consiguieron definir que a mayores concentraciones de hialuronano en disolución, mayor es la relación entre la viscosidad y los gradientes de velocidad. Además, en 1955 a través de medición de la dispersión de luz, se confirmó que tenía una configuración helicoidal irregular.

Durante la primera mitad del Siglo XX, existían varios caminos en la investigación del Ácido Hialurónico. En la segunda mitad de siglo, estos caminos se dividieron en diferentes ramas, las cuales tocan un amplio rango de campos de la ciencia, entre los que se incluyen la medicina, la bioquímica o la glicobiología, término aceptado a finales de siglo y que estudia función, biología y estructura de los carbohidratos.

R. Fuoss describió que la viscosidad del Ácido Hialurónico dependía en cierto grado del valor de pH en el que se encuentre y de la fuerza iónica de la disolución, con lo que se pudo concluir que, dependiendo de la presencia de sales inorgánicas en disolución, este valor de viscosidad variará.

Finalmente, en el 1954 Meyer redactó un artículo, publicado en la prestigiosa revista *Nature*, en el cual se especificaba la estructura del disacárido resultante de la escisión por parte de la streptococcus hialuronidasa de las moléculas de Ácido Hialurónico (A. Selyanin, Ya. Boykov, & N. Khabarov, 2015). Esta estructura se muestra en la **Ilustración 3**. *Estructura del disacárido obtenido de la escisión del Ácido Hialurónico por parte de la Hialuronidasa*

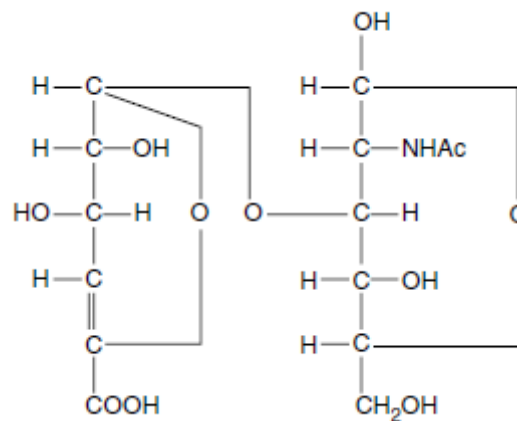


Ilustración 3. Estructura del disacárido obtenido de la escisión del Ácido Hialurónico por parte de la Hialuronidasa

1.9 Usos

Como se ha visto en el apartado anterior, a lo largo de la historia el ácido hialurónico ha sido estudiado mayormente en ámbitos médicos. Es por esto que, debido a sus características propiedades, sus usos más comunes son tanto en este campo de la medicina como en el campo de la cosmética.

1.9.1 Campo de la medicina

Como se ha explicado anteriormente, a mediados de siglo XX, se descubrió la presencia de ácido hialurónico en tejidos y fluidos de animales vertebrados, así como en humanos. El primer uso con fines medicinales como tal, fue durante la Segunda Guerra Mundial cuando, para tratar soldados con heridas por congelamiento, se utilizaron unos vendajes fabricados a partir de un extracto de cordón umbilical. Gran parte del éxito de estos vendajes es atribuido al ácido hialurónico debido a que está presente en gran medida en el cordón umbilical. En los años posteriores, se estuvieron estudiando posibles aplicaciones médicas para el compuesto. Por ejemplo, en el año 1950, E.A. Balazs estudió su uso en casos de desprendimiento de retina. Años después, se empezó a inyectar a caballos de carreras que sufrían de artritis. Además, un hecho que sería muy importante en el campo de la oftalmología unos años después fue cuando R. Miller lo utilizó en lentes intraoculares previamente implantadas (A. Selyanin, Ya. Boykov, & N. Khabarov, 2015).

En el campo de la medicina, el ácido hialurónico se ha centrado en 3 principales aplicaciones: su uso para paliar los efectos de la Osteoartritis, su uso en cirugía y sanación de heridas e implantación del embrión humano (Brown & Jones, 2005).

La osteoartritis es una enfermedad degenerativa la cual afecta a las articulaciones y que daña los cartílagos de éstas. El hecho de que los cartílagos se vayan dañando, da lugar a que los huesos se friccionen entre ellos dando paso a dolores y pérdidas de movimiento en las articulaciones. En el caso de esta enfermedad, se está estudiando y usando el ácido hialurónico como solución. El ácido se inyecta intraarticularmente con el fin de evitar las rozaduras entre huesos. Con estas inyecciones se pretende sustituir el ácido hialurónico propio de la articulación que se va degradando o desapareciendo en los pacientes de la enfermedad, actuando como una especie de lubricante evitando fricciones, dolor e hinchazones. Aunque principalmente su uso sea en rodillas afectadas por la osteoartritis, técnicamente se podría aplicar a todas las articulaciones sinoviales, que son todas aquellas articulaciones móviles que están recubiertas por una cápsula articular, en el interior de la cual se encuentra el líquido sinovial que es el encargado de lubricar la articulación evitando así fricciones entre huesos.



Ilustración 4. Imagen de una rodilla que sufre Osteoartritis antes y después de inyectar el AH

En cuanto a su uso en cirugía y sanación de heridas, su principal uso es en implantación de lentes intraoculares artificiales y en un gel viscoelástico, así como cicatrizantes.

A partir del ácido hialurónico se han desarrollado productos para diversos fines como es el caso de hidrogeles o jaleas cicatrizantes. La jalea cicatrizante a partir de ácido hialurónico que se ha extraído previamente del cordón umbilical de placentas humanas ha sido probada y ha obtenido exitosos resultados.

Diversos estudios han determinado que el ácido hialurónico es capaz de regular procesos clave durante la cicatrización de una herida como son, la angiogénesis o formación de vasos sanguíneos, la migración celular y las inflamaciones. Además, se ha estudiado las diferentes propiedades médicas que tiene este compuesto según su peso molecular. Un AH de bajo peso molecular dará lugar a unas fuertes propiedades proinflamatorias mientras que, por otro lado, un AH de alto peso molecular contará con unas características antiinflamatorias e inmunosupresoras, es decir, reduce la actividad del sistema inmune el cual sufre alteraciones debido a la herida o enfermedad.

Recientemente, está aumentando el uso, desarrollo y avances en la fabricación de hidrogeles a partir de ácido hialurónico. Un hidrogel es una cadena polimérica hidratada cuyo rango de aplicación es muy amplio, dependiendo sus características del campo de aplicación. En concreto, las características del ácido hialurónico hacen que éste pueda ser modificado o moldeado en hidrogeles con fines biomédicos. Esto, junto con su alta capacidad para sanar heridas y sus capacidades para degradarse mediante hialuronidasas o vía oxidativa es por lo que se trata de usar para la fabricación de hidrogeles, habiendo algunos ya en uso clínico tanto en seres humanos como en animales. El hidrogel a partir de ácido hialurónico tiene muchos usos, algunos de ellos son su utilización con fines de reparación neuronal o utilización de hidrogel a partir de ácido hialurónico para controlar el comportamiento de las células madre neurales (N. Collins, 2014).

En cuanto a su uso en implantación de embriones, la utilización de este compuesto se haya en el medio de cultivo a la hora de realizar una inseminación in vitro.

A la hora de realizar una inseminación in vitro, la implantación del embrión es aquella etapa que limitará las probabilidades de éxito. Además, también es necesario el uso de un medio de cultivo durante el proceso de crecimiento del embrión en el laboratorio. Este medio de cultivo debe ser una firme representación de lo que supondría un útero de mujer ya que. Finalmente, a la hora de realizar la implantación, el proceso a través del cual lo embriones se introducirán en el útero materno se llama transferencia embrionaria. El ácido hialurónico es un compuesto altamente

presente en el útero femenino. El compuesto tiene una muy alta importancia debido a su alta participación en gran número de procesos esenciales durante la implantación del embrión en el útero femenino, como por ejemplo el crecimiento del embrión o en la migración, unión, desarrollo y diferenciación de las células. Además, de lo que también es capaz este compuesto, es de unirse al receptor CD44 (el cual es una molécula de adhesión que interviene en las interacciones entre las células y la matriz extracelular o simplemente entre células) favoreciendo así la unión entre los 2 tipos de células (Brown & Jones, 2005).

1.9.2 Campo de la cosmética

El campo de la cosmética es uno de los más interesantes para el mercado del ácido hialurónico, siendo uno de los objetivos más importantes del mercado actual el de la hidratación de la piel. Es uno de los componentes más usados en cremas, polvos y demás elementos de maquillaje o tratamiento y cuidado de la piel debido a sus altas propiedades para la retención de humedad, su alta biocompatibilidad y sus propiedades viscoelásticas

Con la edad, la piel de las personas va perdiendo la capacidad de retener agua y balancear la cantidad de humedad que esta contiene, esto se traduce en pérdida de firmeza y un aspecto más viejo y arrugado. Como ya se ha mencionado, este compuesto se caracteriza por una gran retención de la humedad, es por esto que está considerado un compuesto clave para paliar los efectos de envejecimiento en la piel.

Hay además, un compuesto derivado del ácido hialurónico que no es más que una sal de sodio, llamada Hialuronato de sodio que también se usa en numerosos productos de cuidados faciales sin embargo, esta sal tiene una ventaja adicional que es que facilita que la piel absorba este compuesto más rápido aún, que el ácido hialurónico.

El ácido hialurónico y sus sales y derivados son los ingredientes activos de la mayoría de productos cosméticos con aplicaciones faciales, ojos, anti-celulíticos e incluso en la zona del cuello, estando presente en estos productos en unas concentraciones de hasta un 2%. En 1982 Estée Lauder fue la primera persona en utilizar Ácido Hialurónico de animal con fines cosméticos. Los resultados fueron publicados en un artículo el cual indicó que todas las formulaciones de ácido hialurónico 0.1%, significaron una mejora significativa en la hidratación de la piel y en su elasticidad. (CITAR PDF COSMÉTICA) No obstante, durante el experimento se aplicaron diferentes ácidos

hialurónicos con un amplio rango de pesos moleculares y, aunque todos los experimentos mostraban unos resultados satisfactorios, aquellos ácidos con bajos pesos moleculares demostraron una mayor facilidad durante el proceso de penetrar en la piel en contraposición a un peso molecular mayor el cual se quedará en la superficie, depositándose sobre la piel, lo cual forma una película viscoelástica, protegiendo la capa más superficial de la piel, con una muy mayor capacidad de retención de agua, lo cual actuará como un humectante, eliminando la aparición de arrugas desde la capa más exterior de la piel (Chemik, 2012).

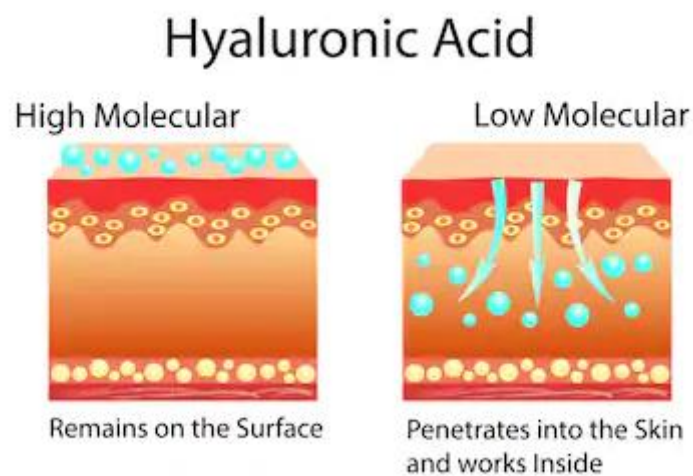


Ilustración 5. Representación gráfica de la diferente penetración del Ácido hialurónico en la piel según su peso molecular.

1.10 Evolución de la producción

La actual producción mundial de ácido hialurónico mayoritariamente proviene de dos vías de producción, o bien mediante un proceso de extracción de partes de animales que tengan un gran contenido de éste, como son las crestas de gallo, o bien mediante un proceso bioquímico utilizando microorganismos. Se espera que para el año 2026, llegue a un valor total de mercado entorno a 15.25 mil millones de dólares americanos, registrando un *CAGR* (Tasa anual compuesta de crecimiento) de entorno al 7.8% (Grand View Research, 2019).

1.11 Producción por vía de extracción de partes de animales

Desde que, en 1934, la pareja de investigadores John Palmer y Karl Meyer consiguieran aislar ácido hialurónico a partir del humor vítreo bovino, se empezó a experimentar con otros tejidos animales como crestas de gallo o cordón umbilical humano para ver si se podía extraer también de éstos. Los resultados obtenidos a través de los años han indicado que es la máxima concentración obtenida es de 7500 µg por cada gramo de tejido animal en crestas de gallo.

Este método se sigue usando para extraer ácido hialurónico de tejidos animales, no obstante, se encuentra cada vez más en desuso debido en gran parte a las laboriosas condiciones de trabajo como puede ser el tener que moler los tejidos animales, las repetidas extracciones con diferentes solventes de carácter orgánico o el posterior tratamiento y manejo del ácido. Otro problema sería que, al ser ácido hialurónico de origen animal, podría estar unido a agentes contaminantes como la proteína “*hialuronidasa*”. que como se ha indicado anteriormente es capaz de degradar el ácido hialurónico. La extracción de partes de animales es un proceso con un alto coste económico ya que se requieren unas instalaciones de considerable tamaño para almacenar tanto equipo como materias primas del proceso. También, es un proceso que toma mucho tiempo de completar.

Por el contrario, el otro método que es una producción a partir de microorganismos se encuentra en auge, por lo que será el proceso que estudiar en este trabajo (Hui Sze, C. Brownlie, & A. Love, 2016).

1.12 Producción por vía bioquímica

Actualmente, a la hora de producir Ácido hialurónico industrialmente, el método más viable y utilizado es mediante la utilización de microorganismos de la familia *Streptococcus*.

La familia de microorganismos *Streptococcus* tienen la característica de ser Grampositivas, lo que se traduce en que, al añadirles un tinte, debido a las características de la envoltura celular, puede entrar en ésta. Por otro lado, si fuera Gramnegativa el tinte no entraría ya que estas poseen una doble envoltura celular. Además, esta familia de microorganismos también posee la característica de ser inmóviles y no formar esporas. La mayoría de los *Streptococcus* son anaerobias facultativas, es decir, pueden crecer y desarrollarse tanto en ausencia como en presencia de oxígeno en el medio. Por otro lado, el resto si que son estrictamente anaerobias, por lo que se desarrollarían sin la

presencia de oxígeno en el medio. El Ácido Hialurónico será producido por estos microorganismos, en concreto lo producirán los grupos A y C extracelularmente, por lo que más adelante no habrá que romper las células para extraerlo.

El grupo C de esta familia de microorganismos, posee las características más altas de producción y además no son patógenos para el ser humano, por lo que será el que se use para la síntesis del producto en vez del grupo A de la misma familia. En la industria, las cepas que más se utilizan son la *S. equi subsp zooepidemicus* y la *S. equi subsp. equi*.

Generalmente, las cepas de *Streptococcus* para producir ácido hialurónico utilizarán o necesitarán como fuente de carbono, glucosa. La concentración de glucosa en el medio variará entre un 5% y un 10%. No obstante, no es la única fuente de carbono que se puede utilizar, lactosa, sacarosa o dextrina darán un rendimiento parecido, presentando incluso más ventajas ya que suelen tener un precio menor a la glucosa, por lo que será un factor que estudiar si se quieren reducir costes.

El uso de glucosa como fuente de carbono ha sido ampliamente estudiado durante los años ya que es una de las fuentes de carbono que mayor rendimiento da. En el año 2009 los investigadores Don y Shoparwe demostraron que cuando se trabaja en discontinuo con un sistema de aireación y con un sistema de agitado, si se trabajaba con una concentración de glucosa en torno a 40 g/L, se obtenía un mayor rendimiento que utilizando 10 g/L, no obstante, si se aumentaba esta concentración a unos 50 g/L empezaba a darse un caso de inhibición por sustrato.

A parte de las fuentes de carbono, las fuentes de nitrógeno han sido ampliamente estudiadas también. En 2009 el investigador Zee-Wee estudió con su equipo el efecto de varias fuentes de carbono, tanto inorgánicas como orgánicas. En el artículo consigue demostrar que el microorganismo *S. Zooepidemicus* tuvo un muy pobre crecimiento al utilizar una fuente de nitrógeno inorgánica como era el $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ y una nula producción de ácido hialurónico. Demostraron que la mayor concentración celular, así como la mayor biosíntesis de ácido hialurónico fue posible gracias a la utilización de fuentes de nitrógeno orgánicas (Lai, Abdul Rahim, Ariff, & Mohamad, 2011). Los medios con fuentes de nitrógeno como caseína de peptona y extracto de levadura consiguen obtener las mayores producciones de ácido hialurónico (A. Vazquez, I. Montemayor, Fraguas, & A. Murado, 2010).

En cuanto a la ruta biosintética del Ácido Hialurónico en *Streptococcus*, se puede ver en la Ilustración 5. Suponiendo como fuente de carbono la glucosa, gracias a la enzima Glucoquinasa se obtiene la Glucosa-6-Fosfato. La Fosfoglucosa-Isomerasa es una enzima la cual, cataliza la reacción reversible de Glucosa-6-Fosfato a Fructosa-6-Fosfato. Una vez se tienen las dos vías principales, mediante la vía de la Glucosa-6-Fosfato, tras una serie de reacciones, se obtendrá el Ácido glucurónico mientras que de la otra vía y a partir de la N-AcetilGlucosamina-6-Fosfato se obtendrá el N-AcetilGlucosamina, el segundo componente del ácido hialurónico.

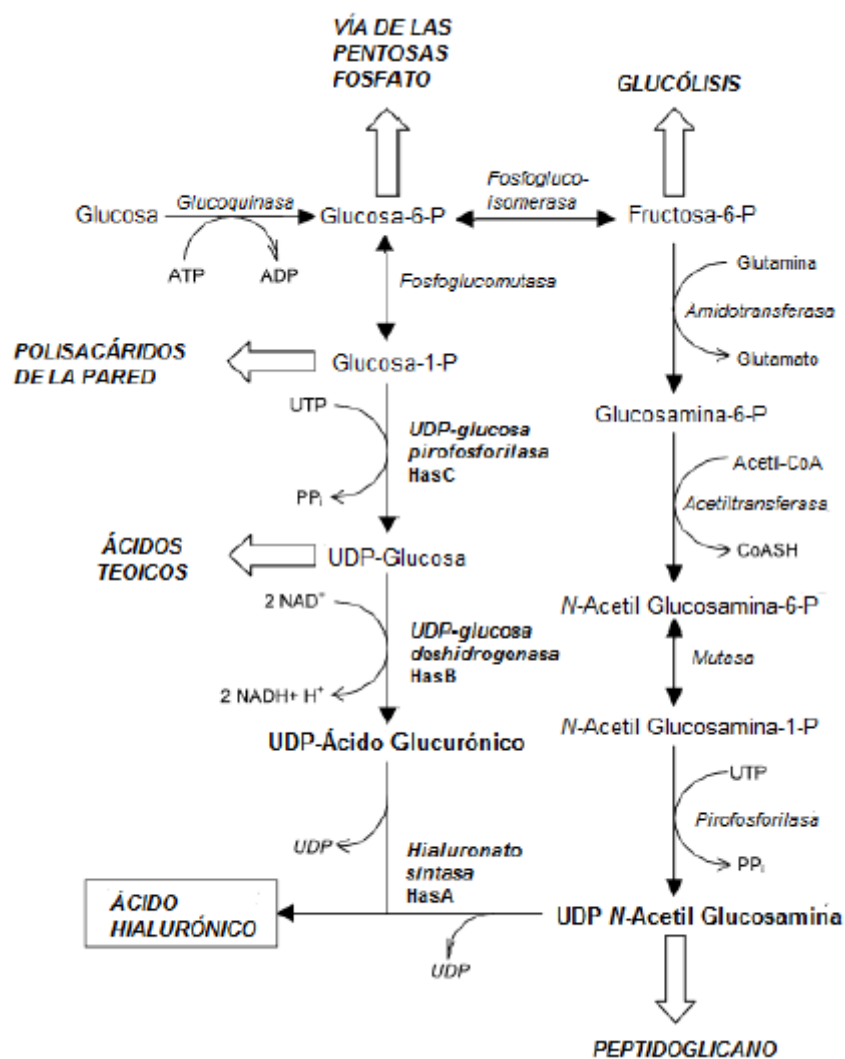


Ilustración 6. Ruta biosintética Ácido Hialurónico en *Streptococcus*

2 Objetivos

El principal objetivo de este Trabajo Final de Grado es el diseño de un proceso de producción industrial de ácido hialurónico por vía biológica. 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

3 Metodología

3.1 Descripción del microorganismo y las condiciones de trabajo

Como se ha mencionado, el principal objetivo de este Trabajo Final de Grado es el desarrollo o diseño de un proceso de producción de ácido hialurónico mediante vía biológica y ver su rentabilidad. Para esto, es necesario primero definir el proceso, teniendo claro el punto de inicio y el punto final, a qué condiciones se van a trabajar y que fuentes de carbono, nitrógeno, microorganismos y demás, se van a utilizar.

Con el fin de definir el mejor proceso posible, se buscaron en bibliografía gran cantidad de artículos en los que estudiaran un proceso para obtener ácido hialurónico y comparar los rendimientos obtenidos con el fin de seleccionar y desarrollar el que mayor cantidad obtuviera al final.

Se encontró un artículo (Im, Song, Kang, & Kang, 2009), en el que estudiaban, cambiando fuentes de carbono, nitrógeno y demás como se podría obtener la cantidad máxima de producto añadiendo que fuentes y en que cantidades, por lo que el diseño del proceso de este trabajo se va a basar muy fuertemente en este artículo, utilizando en la medida de lo posible, las mismas características de proceso, condiciones y relaciones de tamaño en los equipos con el fin de ser lo más fiel al proceso original e intentar obtener los mismos rendimientos o lo más parecido posible. En el artículo trabajan a escala de laboratorio y además lo transportan a una planta piloto, los datos de la cual servirán más adelante para realizar el escalado de este trabajo.

El proceso que seguir básicamente se ha explicado anteriormente. A partir de una fuente de carbono, en este caso la glucosa, se va a acabar produciendo ácido hialurónico.

Para empezar, en el artículo seleccionan el microorganismo. El microorganismo seleccionado pertenece a la familia de *Streptococcus sp.*, en concreto se trata de una mutación hecha por los investigadores en la cual eliminaron toda posibilidad de aparición de la enzima hialuronidasa, la cual como se ha explicado anteriormente degrada al ácido hialurónico.

Una vez tienen el microorganismo, los investigadores dedican el artículo a ir probando combinaciones de fuentes de carbono, nitrógeno, fosfato y fuentes minerales, incluso barajando la posibilidad de añadir ácidos orgánicos y aminoácidos para estudiar el aumento o disminución del

rendimiento. La optimización del proceso se realizó mediante optimización de dos pasos, siendo el primero una optimización de un factor a la vez seguido por un segundo método que será un diseño de Taguchi o también conocido como arreglo ortogonal.

Una optimización de un factor a la vez es un método científico en el cual se modifica una variable cada vez con el fin de visualizar el efecto de cada una de las variables en la respuesta. En este caso fue utilizado para ver, por ejemplo, en el caso de las fuentes de carbono, cual de ellas nos daría un rendimiento mayor. Se utilizó para elegir todas y cada una de las materias primas, fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, fuentes de fosfatos y fuentes minerales. Por otro lado, el diseño de Taguchi o arreglo ortogonal se trata de un método diseñado para elegir una variable que será la que mejor funcione en las condiciones o entorno elegido. En el caso del artículo se utilizó para, después de seleccionar cada una de las fuentes de nutrientes, ver en que concentración se deberían añadir para optimizar el proceso.

En el susodicho artículo, trabajan en una escala de laboratorio cuando tratan de optimizar el proceso, no obstante, reproducen el trabajo a una de planta piloto en un recipiente de 75 Litros.

A escala de planta piloto consiguen obtener un rendimiento de aproximadamente 6.94 g/L que servirá de guía a la hora de realizar este trabajo ya que se utilizará como el rendimiento del proceso a escala industrial.

El peso molecular del ácido hialurónico obtenido será bastante alto de entre $1.5 \cdot 10^6$ Da a $5.9 \cdot 10^6$ Da lo que abre la posibilidad de que se le de uso farmacéutico o del campo de la medicina, lo cual le da la posibilidad de venderse a un alto precio.

La temperatura de trabajo del proceso en el fermentador principal deberá ser de 36°C o lo más cercano a esta temperatura posible. Esto es debido a que el microorganismo, *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus*, tiene una temperatura de crecimiento de 37°C y un rango de temperaturas muy cercano a esta. Además, este microorganismo, se trata de un microorganismo aerobio, es decir, necesitará oxígeno para crecer, por ello en el fermentador deberá añadirse un sistema de aireación con el que asegurar su crecimiento.

El microorganismo se adquirirá en pequeños viales, significará que se tendrá que realizar un proceso de propagación con el fin de conseguir que se reproduzca para poder inocularlo al reactor más adelante. Con el fin de poder facilitar el proceso de reproducción del microorganismo, en la

ficha técnica de una empresa de la cual se puede obtener el microorganismo, facilitan además del vial, información sobre 3 soluciones que utilizar para hacerlo crecer. Una se trata de un medio específico llamado *Brain Heart Infusión Agar/Broth* el cual está hecho a partir de extractos de cerebro y corazón de cerdo, otra se trata de un medio específico también, hecho a partir de un caldo de agar con sangre de oveja y por último y el que se utilizará en este trabajo al igual que en el artículo será el medio Todd-Hewitt Broth, el cual es un medio muy específico que se adquirirá sólido y siguiendo las instrucciones de dilución, por cada 37 g del medio se utilizarán 1000 ml de agua, se utilizará para cultivar el microorganismo. El proceso de crecimiento debe realizarse a una temperatura de 37 grados centígrados y durante 24 y 48 horas.

El microorganismo, a parte de una temperatura recomendada de 37 grados centígrados, necesita un *pH* neutro, es decir, un valor de en torno a 7 (Im, Song, Kang, & Kang, 2009)

Para llevar a cabo el proceso, el fermentador necesitará un sistema de aireación. Ya se ha explicado que este proceso se puede llevar a cabo tanto de forma anaerobia como aerobia. No obstante, se demostró que realizar el proceso en un medio con presencia de oxígeno debido a una aireación afectará al rendimiento global del proceso ya que aumentará el nivel de producción de ácido hialurónico en contraposición de si se realiza de forma anaerobia.

La producción de ácido hialurónico mediante un bioproceso se realiza en la gran mayoría de los casos en discontinuo. Un cultivo que se lleva a cabo de forma discontinua, Batch o por lotes, se caracteriza por tener paradas, es decir, a diferencia de un proceso continuo que se va alimentando y vaciando continuamente, un proceso discontinuo tanto para alimentarlo como para vaciarlo, el proceso debe interrumpirse. Cuando se trabaja de esta forma, se suele tener más de 1 equipo de proceso ya que durante la carga y descarga de uno de ellos, el otro o los otros pueden seguir trabajando, evitando así las pérdidas de tiempo excesivas o también se usan más de uno en caso de avería no parar toda la producción.

3.2 Descripción materias primas

Como se ha explicado anteriormente, un bioproceso necesita para llevarse a cabo fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, fosfatos y minerales ya que es lo que el microorganismo en cuestión transformará en el producto buscado. No obstante, en este trabajo, además, siguiendo con el consejo del artículo guía, se van a añadir a todo lo anterior tanto aminoácidos como ácidos

orgánicos. Las materias primas utilizadas durante el desarrollo del proceso y para procesos paralelos como la hidrólisis ácida se detallan a continuación:

3.2.1 Fuente de carbono

En el proceso, se va a utilizar glucosa como fuente de carbono. La glucosa es la principal fuente de energía de los seres vivos. Ayuda a mantener el cuerpo activo y a asegurar el buen funcionamiento de las funciones vitales. Es un compuesto muy utilizado en las fermentaciones ya que su fermentación puede dar lugar a productos como el vino, la cerveza o incluso etanol. En su estructura, cuenta con un 40% de carbono, los cálculos pertinentes se desarrollarán más adelante en su sección. La glucosa es un elemento que se encuentra en gran infinidad de frutas. Es un producto un tanto caro si se va a utilizar directamente como fuente de carbono ya que debido a su precio y a las cantidades necesarias industrialmente supondría un alto coste. Es por esto por lo que en este proceso se va a utilizar glucosa como fuente de carbono solo que no se va a adquirir directamente, sino que se va a obtener a partir de pieles de naranja. Las pieles de naranja son desechos de la industria de los cítricos ya que normalmente a estas industrias solo les interesa el zumo que estas producen, es por esto que por un precio muy bajo se puede conseguir una gran cantidad. Estos desechos de la industria de los cítricos tienen un porcentaje en celulosa de un 33.98% (Rivas, Mills, & D. Jones, 2013), la celulosa se puede convertir en glucosa mediante un proceso de hidrólisis ácida, por lo que de este modo, partiendo de pieles de naranja se va a obtener la glucosa necesaria para el proceso.

La glucosa en este trabajo se va a implementar en el medio en un porcentaje de 6.36%. En un principio, en el artículo del cual se está adaptando el proceso a escala industrial (Im, Song, Kang, & Kang, 2009), aplican un porcentaje de glucosa en el medio del 4%, sin embargo, el rendimiento de gramos de ácido hialurónico generados dividido entre los gramos de glucosa introducidos en el medio que se encontró en otro artículo fue del 11% (Chen, Chen, Huang, & Chen, 2008), que aplicando los cálculos correspondientes se transformó en un porcentaje de glucosa en el medio del 6.36%. Se presentó el problema de elegir cual de los dos porcentajes se aplicaría en el medio, se optó por escoger la situación más desfavorable y se eligió el mayor porcentaje de glucosa posible ya que con ese porcentaje se aseguraba el cumplir las condiciones establecidas en un medio con menor concentración de glucosa.

3.2.2 Fuente de nitrógeno

Industrialmente, las fuentes de nitrógeno más utilizadas son el amoníaco o la urea. No obstante, hay veces que se requiere nitrógeno orgánico en el medio por lo que se pueden utilizar sueros o soja. Otro ejemplo de fuente de nitrógeno cuyo uso está bastante extendido es el extracto de levadura, el cual 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. Otro ejemplo de una fuente con un uso en un muy amplio rango de microorganismos son las peptonas, las cuales consisten en hidrolizados de proteínas. Algunas pueden tener un precio un tanto elevado, aunque esto no impide su amplio uso.

En este trabajo se van a utilizar como fuentes de nitrógeno 2 compuestos, caseína de peptona y extracto de levadura. Cada compuesto representará un porcentaje del total de fuente de nitrógeno introducido al medio. La caseína de peptona será un 57% (Im, Song, Kang, & Kang, 2009) del total de fuente de nitrógeno introducido al medio, y además su contenido en nitrógeno es de un 13% (Britania, s.f.). Por otro lado, el extracto de levadura supondrá un 43% (Chen, Chen, Huang, & Chen, 2008) con un contenido en nitrógeno medio del 10.9% (Britania, s.f.). La proporción en la que se encontrarán en el medio seguirá el ratio Carbono:Nitrógeno de 7.5 (Chen, Chen, Huang, & Chen, 2008), es decir, habrá 7.5 veces más carbono en el medio que nitrógeno, por lo que a partir de esto se calculará más adelante la cantidad de estas dos fuentes en el medio.

3.2.3 Fuente de fosfatos

El fósforo tiene una presencia importante en la molécula ATP (trifosfato de adenosina), la cual es la que se encarga de proporcionar energía a los seres vivos y es la fuente principal de energía que utilizan las células en realizar sus actividades.

En el artículo de referencia, estudian la posibilidad (Im, Song, Kang, & Kang, 2009) de utilizar diversas fuentes de fosfatos como son $(NH_4)_2HPO_4$, Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , Na_3PO_4 , y por último KH_2PO_4 . Todas las fuentes de fosfatos fueron estudiadas bajo las mismas condiciones y usando el mismo porcentaje de cada una de ellas cada vez. Finalmente, se demostró que con la que se conseguía un mejor rendimiento era el KH_2PO_4 . Esta fuente de fosfato se encontrará en el medio en un porcentaje del 0.25%, y para medir la cantidad que es este porcentaje se utilizará el porcentaje de la glucosa como referencia.

3.2.4 Fuentes minerales

La ausencia de fuentes minerales puede limitar la actividad del microorganismo, reduciendo el rendimiento de la reacción.

En el artículo de referencia (Im, Song, Kang, & Kang, 2009), estudian la posibilidad de utilizar diversas fuentes de minerales como son $CuSO_4$, $CoSO_4$, $ZnCl$, $ZnSO_4$, NaF , $CaCl_2$, KCl , $FeCl_2$, $FeSO_4$, $MnSO_4$, $BaCl_2$, $CuCl_2$ y por último $MgCl_2$. Todas las fuentes de minerales fueron estudiadas bajo las mismas condiciones y usando el mismo porcentaje de cada una de ellas cada vez. Finalmente, se demostró que con la que se conseguía un mejor rendimiento era el $MgCl_2$. Esta fuente de minerales se encontrará en el medio en un porcentaje del 0.05%, y para medir la cantidad que es este porcentaje se utilizará el porcentaje de la glucosa como referencia.

3.2.5 NaCl

La utilización de cloruro de sodio puede ser beneficioso para el medio en cantidades moderadas, ya que en altas podría afectar negativamente al microorganismo.

La concentración de $NaCl$ en el medio será del 0.5% utilizando la concentración de glucosa como referencia.

3.2.6 Aminoácidos

En el artículo (Im, Song, Kang, & Kang, 2009), se estudia los efectos que tendría la adición de diversos aminoácidos a la producción de ácido hialurónico final. Los aminoácidos tienen la función principal de evitar el agotamiento de nutrientes en el medio y mantener la fase de crecimiento.

Estudian diferentes aminoácidos y el porcentaje en el que se encontrarán en el medio viendo si aumentaba el rendimiento. Fueron capaces de determinar que el rendimiento sufría aumentos notables, lo que permitía su inclusión en el medio. Los porcentajes son muy pequeños, con variaciones igual de pequeñas. Finalmente, determinan que aminoácidos añadir en este caso, glutamina y glutamato. La concentración óptima para añadir estos aminoácidos es de 0.04% y 0.06%.

3.2.7 Ácidos orgánicos

En el artículo (Im, Song, Kang, & Kang, 2009), se estudia los efectos que tendría la adición de diversos ácidos orgánicos a la producción de ácido hialurónico final.

Estudian la utilización de diversos ácidos orgánicos para al final determinar que el ácido oxálico es el que más aumenta el rendimiento del proceso. Seguidamente, estudian que concentración en el medio es la óptima, en este caso 0.02%.

3.2.8 Ácido sulfúrico

Anteriormente se ha explicado que la glucosa a utilizar provendrá de la transformación de celulosa contenida en las pieles de naranja, para ello, se ha de realizar un proceso de hidrólisis ácida en la que se utilizará ácido sulfúrico 2.5M, el cual será diluido a partir de ácido sulfúrico concentrado comercial al 98%.

3.2.9 Hidróxido de sodio

El ácido anteriormente utilizado, debe ser neutralizado, puesto que afectaría al *pH* del medio, afectando negativamente al rendimiento y muy posiblemente matando los microorganismos encargados de la producción. Se utilizará *NaOH* sólido para neutralizar el ácido. Hay que tener en cuenta a la hora de los cálculos que el ácido sulfúrico es diprótico, es decir tiene 2 protones mientras que el hidróxido de sodio solo tiene 1 molécula de OH^- . El hidróxido de sodio comercial que se adquirirá tendrá una pureza del 98% aproximadamente.

3.2.10 Etanol

Para el proceso de purificación del ácido hialurónico, ya al final del todo, se utilizará etanol para hacerlo precipitar y lavarlo. Para hacerlo precipitar se utilizará etanol al 95%. Este etanol se recircula al evaporador y se recupera hasta un 80%. Para el lavado final, estará en una concentración del 80%.

3.3 Descripción del proceso

A continuación, se van a describir los pasos del proceso y se van a detallar las características de cada una de sus partes:

3.3.1 Crecimiento del microorganismo

La primera parte del proceso consistirá en hacer crecer el microorganismo en un medio adecuado para poder seguir las operaciones. El microorganismo se adquirirá junto con el medio *THB* para su preparación. Lo primero será diluir el medio en agua, por cada 37 gramos de medio, se utilizarán 1000 ml de agua (En la sección de cálculo se detallará más a fondo las proporciones y el escalado al trabajo). El microorganismo se dejará crecer en este medio durante un periodo de unas 24 horas, si es más incluso mejor. Una vez dejado crecer, se introducirá en el fermentador principal.

3.3.2 Hidrólisis ácida de las pieles de naranja

Unas horas después de introducir el microorganismo en el medio de crecimiento, se puede empezar a ir realizando el proceso de hidrólisis ácida de las pieles de naranja con el fin de obtener la glucosa, la cual será la fuente de carbono principal del proceso. Tras introducir el ácido concentrado y diluirlo hasta una concentración de 2.5 M, se calienta el medio hasta 120 grados centígrados y se introducen las pieles de naranja y se deja durante 2 horas. Una vez finalizado, se añade el hidróxido de sodio con el fin de neutralizar el medio a un *pH* de 7, y la disolución con glucosa ya neutralizada pasa por un evaporador, el cual se encargará de evaporar la parte del agua sobrante para que la glucosa se encuentre en el porcentaje correcto en el medio, 6.36%. Tras el evaporador, del cual saldrá a una temperatura de entorno a 55 grados, se introduce en el fermentador principal.

3.3.3 Adición de materias primas y microorganismos en el fermentador

A medida que la disolución sale del evaporador y se introduce en el fermentador central, se esperará a que la temperatura baje a la adecuada para el microorganismo y el proceso, 36 grados, para ello estará el sistema de refrigeración del fermentador. Conseguida la temperatura adecuada, se añadirá el microorganismo al medio y las materias primas en las proporciones indicadas y se dejara el proceso durante unas 24 horas. Tras este tiempo, se supone que se habrá conseguido la producción deseada y se purgarán las células muertas gracias a una llave en el inferior del

fermentador. Una vez queda solo el sobrenadante, este pasa a un tanque del doble de tamaño para su purificación.

3.3.4 Purificación del producto mediante la adición de etanol

Tras la eliminación de las células y haber transportado el sobrenadante al tanque de un tamaño mayor, se añadirá un volumen de etanol igual al sobrenadante al 95% y se dejará durante un tiempo. Tras este tiempo el ácido hialurónico habrá precipitado. Con una llave en la parte inferior del tanque se recuperará este ácido precipitado y se pasará a un tanque mucho más pequeño. En este tanque mas pequeño se depositará el ácido hialurónico precipitado y se lavará con etanol al 80% con los mismos litros de etanol por cada kilogramo de producto y se dejará secar, repitiendo este proceso durante cinco veces y finalmente obteniendo un ácido hialurónico de un muy alto peso molecular y con una pureza del 80%.

3.4 Descripción del equipo y escalado

Se va a desarrollar el equipo utilizado y el escalado realizado para llevarlo a grandes dimensiones. Hay que añadir que en los tanques que necesiten controlar la temperatura, si no tienen control propio de temperatura se deberá utilizar y programar un controlador *PID*.

3.4.1 Crecimiento del microorganismo

Para el crecimiento del microorganismo será necesario un recipiente donde llevar a cabo el cultivo, un Erlenmeyer de unos 2 Litros con un agitador calefactado será suficiente. Además, también hará falta una autoclave para esterilizar el medio de cultivo.



Ilustración 7. Autoclave

3.4.2 Hidrólisis ácida de las pieles de naranja

Para la hidrólisis ácida, puesto que se hará en 2 tanques diferentes por motivos de seguridad, se necesitarán 2 tanques calefactados de 850 Litros cada uno, los cálculos de los volúmenes de los tanques se detallarán en su sección de cálculos. Además, también serán necesarios dos evaporadores que evaporen parte del agua de la disolución para concentrar la glucosa antes de introducirla en el fermentador.



Ilustración 8. Tanque para la hidrólisis ácida



Ilustración 9. Evaporador de película descendente

3.4.3 Fermentador

Para la operación principal serán necesarios dos fermentadores cónicos refrigerados de unos 700 litros, cálculos detallados en su sección, y con control de temperatura. Si no se encuentran refrigerados, se procederá a la utilización de un intercambiador de calor para disipar el posible calor excesivo de la reacción.



Ilustración 10. Biorreactor

3.4.4 Purificación del producto mediante la adición de etanol

Para la purificación del etanol, se necesitarán 2 tanques con un volumen al menos el doble del volumen operativo del fermentador, ya que se debe usar la misma cantidad de etanol por cantidad de disolución. Además, para el lavado posterior, se necesitará un tanque no muy grande para que quepan el producto de ambos fermentadores y los litros de etanol necesarios para lavarlos.

3.4.5 Escalado

Los escalados en este trabajo, permiten en su gran mayoría aplicar sencillas reglas de tres. Sabiendo el valor que se utilizaría en una escala de planta piloto, se lleva a las características industriales. No obstante, hay parámetros que no es adecuado utilizar este atajo, estos son los siguientes:

3.4.5.1 Parámetros del fermentador principal

El escalado pretende mantener una similitud geométrica, es decir las razones entre las longitudes correspondientes deben ser iguales o lo más parecidas en los dos sistemas que se están utilizando. En este trabajo se ha utilizado la técnica de la mantención de potencia por unidad de volumen (P/V).

$$\left. \frac{P}{V} \right\}_P = \left. \frac{P}{V} \right\}_G \quad (1)$$

Los subíndices P y G hacen referencia a la escala correspondiente a la planta piloto y a la escala correspondiente a gran escala o escala industrial respectivamente.

La expresión anterior se puede sustituir por:

$$\frac{P}{V} = \frac{\rho \cdot N^3 \cdot D\alpha^5}{D\alpha^3} \quad (2)$$

Donde:

- El parámetro ρ corresponde a la densidad del medio $\left(\frac{Kg}{m^3}\right)$.

- El parámetro N corresponde al número de revoluciones por minuto (rpm).
- El parámetro Da corresponde al diámetro del agitador (m).

La expresión quedaría:

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

Anulando las densidades ya que el medio será el mismo para ambos casos y simplificando exponentes queda la ecuación final con la que se va a trabajar:

$$N^3 \cdot Da^2 \}_P = N^3 \cdot Da^2 \}_G \quad (4)$$

3.4.5.2 Aireado

El escalado del aireado es un cálculo más complejo que el resto que se ha hecho anteriormente. Para que el escalado sea válido, el K_{la} , también conocido como el coeficiente global de transferencia de oxígeno deberá ser el mismo en ambas situaciones. Este coeficiente dependerá del tamaño de burbuja, el tiempo de contacto con el medio...

En este escalado del aireado se va a suponer que el K_{la} será el mismo ya que durante todo el proceso se ha seguido la regla de similitud geométrica, es por esto por lo que se permite suponer que tendrá aproximadamente el mismo valor por lo que con una sencilla regla de 3 se puede calcular el valor en el reactor industrial tendiendo el valor de la planta piloto:

3.5 Descripción estudio económico

Una vez finalizados los cálculos y se tienen todas las materias primas y equipos, se procederá a realizar un análisis económico del proceso y ver si es viable o no llevarlo a cabo. Se va a realizar un análisis de rentabilidad calculando el VAN , el TIR y el $Pay - Back$. Para el cálculo de estos parámetros primero se deben calcular el presupuesto de inversión y el presupuesto de explotación:

3.5.1 Presupuesto de inversión

El presupuesto de inversión constituye la suma de los precios de toda la maquinaria y equipos necesarios para el desarrollo del proyecto. Los precios de las maquinarias y equipos serán en base a búsqueda de equipos similares en catálogos online.

3.5.2 Presupuesto de explotación

El presupuesto de explotación constituye el coste de realizar el proceso en 1 año. Se calculará como la suma de los salarios, materias primas, energía, agua, mantenimiento de maquinaria, e incluso las amortizaciones.

3.5.3 Análisis de rentabilidad

Para realizar el análisis de rentabilidad se va a emplear el *VAN*, *TIR* y el Pay-Back. Para todos estos cálculos se va a suponer que la explotación de la planta será de 10 años. Se necesitará saber el desembolso inicial, el cual será el presupuesto de inversión, así como el flujo de caja, el cual se define como:

$$\text{Flujo de caja (Año)} = \text{Ventas (año)} - \text{Presupuesto de explotación} \quad (5)$$

Se considerará un flujo de caja constante para los 10 años.

3.5.3.1 VAN

El *VAN* es el valor actual neto, lo que se traduce como un criterio de inversión con el que conocer cuanto se va a ganar o perder con la inversión. La fórmula se define como:

$$VAN = -D_0 + \sum_{t=1}^n \frac{F}{(1+k)^t} \quad (6)$$

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.

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.

3.5.3.2 TIR

Este índice es la Tasa Interna de Retorno. Indica la rentabilidad de la inversión, es decir, el porcentaje de beneficio o pérdida que tendrá una inversión. %. Es la tasa de descuento que iguala en el momento inicial, la corriente de cobros con la de pagos. Para considerar que la inversión es rentable este tiene que estar entre el 5% y el 100%. Una cantidad menor al 5%, tendrá un margen de riesgo frente a beneficios demasiado bajo y, por otro lado, valores cercanos al 100% parecen bastante irreales puesto que otorgan un beneficio estratosférico y una fracción muy pequeña de los negocios llegan a este porcentaje. Es por esto por lo que los resultados más reales suelen ser los que se encuentran más cerca del 5% que del 100%. La fórmula del TIR genera un VAN igual a 0. En este caso, el cálculo se ha realizado de la siguiente manera:

$$0 = -D_0 + \sum_{t=1}^n \frac{F}{(1 + TIR)^t} \quad (7)$$

Donde D_0 es el desembolso inicial y F el flujo de caja.

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

3.5.3.3 Pay-Back

Es un índice que dará el valor de número de años en los que se tardará en recuperar el desembolso inicial realizado, es decir, el presupuesto de instalación. La fórmula es la siguiente:

$$T = \frac{D_0}{F} \quad (8)$$

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

4 Experimental (Cálculos)

Se va a detallar los cálculos que se han llevado a cabo con el fin de diseñar el proceso de producción de ácido hialurónico.

Se van a realizar los cálculos para una producción de 1 tonelada al año.

4.1 Cálculo del tamaño del reactor/reactores

Lo primero será calcular el número de ciclos necesarios para cumplir el objetivo de producción de 1 tonelada, para ello necesitaremos saber el número de horas laborables al año, así como el número de horas que se tardará en realizar cada ciclo para poder dividirlos y hallar el número de ciclos.

Lo primero, con el fin de hallar el número de horas laborables, se han buscado los días laborables en la Comunidad Valenciana en 2019, descontando fiestas nacionales, de la comunidad, así como sábados y domingos. Estos han sido:

$$\text{Días laborables en 2019 en la comunidad valenciana} = 250 \text{ días}$$

A estos 250 días se les descontará 1 mes (30 días) de vacaciones, mantenimiento...

$$\text{Días laborables reales en 2019 en la Comunidad Valenciana} = 250 - 30 = 220 \text{ días}$$

Estos días los pasamos a horas para averiguar el número de horas laborables al año. Esto se hará multiplicando el número de días por las horas que tiene cada uno de esos días.

$$\text{Horas laborables en 2019} = 220 \text{ días} * 24 \text{ horas} = \mathbf{5280} \text{ horas/año}$$

Ahora vamos a por el tiempo de cada uno de los ciclos. Según el artículo, un ciclo de producción está completo en 24 horas.

$$\text{Tiempo de ciclo estricto} = 24 \text{ horas}$$

No obstante, por motivos de previsión, se le va a añadir un 20% de duración en caso de previsión frente averías, malfuncionamiento, y lo más importante, por añadir los tiempos de carga y descarga del reactor ya que como se ha dicho antes se va a trabajar en continuo.

$$\textit{Tiempo real de ciclo} = 24 \textit{ horas} + 0.2 * 24 \textit{ horas} = 28.8 \textit{ horas}$$

Redondeamos:

$$\textit{Tiempo real de ciclo} = \mathbf{29 \textit{ horas}}$$

Ahora que ya sabemos el tiempo que tardaremos en completar un ciclo, así como el número de horas que se trabajarán al año, estamos en disposición de calcular el número de ciclos que nos harán falta para completar la producción. Este valor se calculará dividiendo el número de horas laborables al año entre el tiempo de cada uno de los ciclos:

$$\textit{Número de ciclos} = \frac{\textit{Número de horas laborables al año}}{\textit{Tiempo de ciclo}} \quad (9)$$

$$\textit{Número de ciclos} = \frac{5280 \frac{\textit{horas}}{\textit{año}}}{29 \textit{ horas}} = 182.07 \textit{ ciclos/año}$$

Si redondeamos hacia arriba este valor obtenemos que el número de ciclos necesarios al año será de:

$$\textit{Número de ciclos} = \mathbf{183 \textit{ ciclos/año}}$$

Ahora ya conocemos el número de ciclos que necesitaremos llevar a cabo para cumplir la producción. Este valor nos servirá para calcular ahora el tamaño del reactor o reactores que necesitaremos.

Se ha explicado antes que, siguiendo el artículo de referencia, se obtendría supuestamente un rendimiento de 6.94 g/L de ácido hialurónico al final del proceso. Se va a ver cuantos litros se necesitarían para obtener el millón de gramos que supone 1 tonelada:

La cuestión es, si con 1 Litro somos capaces de producir 6.94 gramos de ácido hialurónico, cuantos litros serán necesarios para producir 1 millón de gramos de ácido hialurónico. Se calculará de la siguiente forma:

$$\begin{aligned} \text{Litros necesarios para 1 tonelada} &= \frac{1 \cdot 10^6 \text{ gramos} \cdot 1 \text{ Litro}}{6.94 \text{ gramos}} = \\ &= \mathbf{144092.22 \text{ Litros totales}} \end{aligned}$$

Ya sabemos los litros necesarios totales, así como los ciclos, con esta información seremos capaces de sacar los litros necesarios por ciclo mediante una simple división. Hay que decir que los litros necesarios por ciclo serán una guía para saber que tamaño deben de tener los fermentadores principales.

$$\text{Litros por ciclo} = \frac{\text{Litros totales}}{\text{Ciclos}} = \frac{144092.22}{183} = \mathbf{787.39 \text{ Litros/ciclo}}$$

Una vez hallada la cantidad de litros que se requieren por cada litro, se puede estimar de que tamaño se necesitará el reactor o reactores. Redondeando por seguridad, será:

*1 reactor con volumen operativo de **800 Litros***

Ó

*2 reactores con volumen operativo de **400 Litros***

Se va a optar por 2 reactores con un volumen operativo de 400 Litros. Esto es debido a que, en caso de avería del reactor, si se tuviera 1 solo, la producción automáticamente se pararía, lo que equivaldría a grandes pérdidas económicas y de reputación de la posible empresa.

No obstante, estos 400 Litros por ciclo se tratarían del volumen operativo del reactor. Hay que tener en cuenta que, si se pretende ser lo más fiel posible al artículo base para así obtener los rendimientos y el proceso lo más parecido posible, hay que seguir sus relaciones de volumen del reactor/volumen operativo de éste. Esta relación es importante seguirla ya que, por ejemplo, como se esta trabajando con una fermentación, se liberará CO₂ al sistema y si no hay espacio suficiente para la liberación de éste puede haber problemas.

En el artículo trabajan con un reactor de 75 Litros con un volumen operativo real de 45 Litros, por lo que se va a intentar llevar esta ratio al proceso de estudio.

$$\text{Ratio}]_P = \text{Ratio}]_G \quad (10)$$

$$\frac{75 \text{ Litros (Reactor)}}{45 \text{ Litros (Operativos)}} = \frac{x \text{ Litros (Reactor)}}{800 \text{ Litros (Operativos)}}$$

$$\text{Litros (Reactor) a gran escala} = \frac{75}{45} \cdot 800 = \mathbf{1333.33 \text{ Litros}}$$

Se va a redondear por seguridad y por facilidad para encontrar un reactor de determinados litros a la hora de comprarlo, a pesar de que afecte un poco al ratio calculado:

Redondeando:

1 Reactor de 1400 Litros

Ó

2 Reactores de 700 Litros

Ahora ya se sabe que se deben comprar 2 reactores de 700 Litros con un volumen operativo de 400 Litros.

4.2 Cálculo del escalado, revoluciones por minuto del agitador, diámetros de los reactores y agitador y escalado del aireador.

Como se ha explicado en su sección correspondiente, el escalado pretende mantener una similitud geométrica, es decir las razones entre las longitudes correspondientes deben ser iguales o lo más parecidas en los dos sistemas que se están utilizando. En este trabajo se ha utilizado la técnica de la mantención de potencia por unidad de volumen (P/V). La fórmula tras los despejes hechos anteriormente se refleja como:

$$N^3 \cdot D a^2 \}_P = N^3 \cdot D a^2 \}_G \quad (11)$$

4.2.1 Cálculo del diámetro y altura del reactor industrial

Primero se deben calcular el diámetro y la altura del reactor que se debe utilizar en la industria. Esto se ha de hacer manteniendo la similitud geométrica con el de la planta piloto.

Los datos de la planta piloto son los siguientes:

- Diámetro del agitador: 120 *mm*
- Diámetro del recipiente: 350 *mm*
- Rpm del agitador: 400 *rpm*
- Volumen del reactor: 75 *Litros*

Con los datos de la planta piloto se va a tratar de mantener una relación de altura/diámetro (H/D) con los reactores industriales. Se hace hincapié en que se va a tratar de mantener la relación en la medida de lo posible ya que posteriormente habrá que fijarse y buscar los reactores que ofrecen los diferentes fabricantes.

De los datos de la planta piloto se conoce el diámetro del reactor, por lo que se va a proceder al cálculo de la altura de éste mediante la fórmula del volumen del cilindro, puesto que es la forma más común en reactores. La fórmula del volumen de un reactor es:

$$V = \pi \cdot \left(\frac{D}{2}\right)^2 \cdot H \quad (12)$$

Donde:

- V hace referencia al volumen del reactor (m^3)
- D hace referencia al diámetro del reactor (m^2)
- H hace referencia a la altura del reactor (m)

Sustituyendo los datos anteriores se calcula la altura del reactor de la planta piloto:

$$0.075 = \pi \cdot \left(\frac{0.35}{2}\right)^2 \cdot H$$

$$H = 0.78 \text{ m}$$

Se sabe que la altura del reactor de la planta piloto es de 0.78 m. Hay que decir que esta medida es estimada ya que el reactor de la planta podría no seguir al cien por cien una forma cilíndrica, no obstante, esta estimación es suficiente para servir de guía.

La relación altura/diámetro será entonces de:

$$\frac{H}{D} = \frac{780}{350} = 2.23$$

$$H = 2.23 \cdot D$$

Sabiendo cual es la relación entre altura y diámetro, se puede trasladar a la planta industrial para diseñar el reactor. De la planta industrial se conoce que los volúmenes de los reactores han de ser de 700 Litros. Por lo que utilizando la fórmula del volumen usada anteriormente:

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

No se conoce ni la altura ni el diámetro del reactor, no obstante, con la relación obtenida anteriormente tenemos que:

$$H = 2.23D \quad (13)$$

$$0.7 = \pi \cdot \left(\frac{D}{2}\right)^2 \cdot 2.23D$$

Despejando el diámetro:

$$D = 0.737 \text{ m} = 0.74 \text{ m} = \mathbf{740 \text{ mm de diámetro}}$$

Por lo que la altura del reactor deberá ser según la relación anterior:

$$H = 2.23D = 2.23 \cdot 0.74 = \mathbf{1.65 \text{ m de altura}}$$

Las dimensiones que tendrá el reactor industrial son:

Una altura de 1.65 metros con un diámetro de 0.74 metros.

4.2.2 Diámetro y velocidad del agitador

Una vez se tienen la altura y el diámetro, de los reactores a diseñar, se tratará de mantener la relación de diámetros entre el reactor de la planta piloto y el de la planta industrial. Con ello se calculará el diámetro del agitador. La relación de diámetros será la siguiente:

$$\left. \frac{Drea}{Dag} \right\}_P = \left. \frac{Drea}{Dag} \right\}_G \quad (14)$$

Sustituyendo:

$$\frac{350}{120} = \frac{730}{Dag}$$

$$\text{Diámetro de agitador} = 250.29 \text{ mm} = \mathbf{251 \text{ mm}}$$

Una vez se tienen todos los datos, se introducen en la ecuación despejada anteriormente y se sacará el número de revoluciones:

$$N^3 \cdot Da^2 \}_P = N^3 \cdot Da^2 \}_G$$

$$400^3 \cdot 120^2 = N^3 \cdot 251$$

$$N = 244.57 \text{ rpm} = \mathbf{245 \text{ rpm}}$$

El agitador tendrá un diámetro de 251 mm y una velocidad de giro de 245 rpm.

4.2.3 Escalado del aireado

Según el razonamiento explicado en su sección, se procede al cálculo del aireado en el fermentador principal mediante el uso de una regla de tres:

- Ratio de aireado del reactor en la planta piloto: 0.5 vvm

$$\begin{aligned} \text{Ratio aireado reactor industrial} &= \\ &= \frac{\text{Ratio aireado planta piloto} \cdot \text{Volumen reactor industrial}}{\text{Volumen reactor planta piloto}} \end{aligned} \quad (15)$$

$$= \frac{0.5 \cdot 700}{75} = 4.7 \text{ vvm}$$

El ratio de aireado para el reactor industrial es de 4.7 vvm

4.3 Cálculo de las cantidades necesarias de materias primas

4.3.1 Cálculo de la cantidad de fuente de carbono necesaria

4.3.1.1 Cantidad de Glucosa

Se va a proceder al cálculo de la cantidad de fuente de carbono, en este caso glucosa necesaria para cada reactor, para un ciclo y el total necesario para la producción total de ácido hialurónico.

Según bibliografía, la tasa de conversión de la glucosa en ácido hialurónico para ratios carbono:nitrógeno de 1.3:1, 2:1 y 4:1 son de:

Ratio Carbono : Nitrógeno	$Y_{P/S}$
1.3 : 1	0.1
2 : 1	0.12
4 : 1	0.11

Tabla 3. Conversión de glucosa en AH según ratios C:N

Como se puede observar, el ratio $Y_{P/S}$ para los 3 ratios de Carbono : Nitrógeno dados, no varía en gran medida, es por esto que al ratio Carbono : Nitrógeno de trabajo, el cual es de 7.5: 1 se va a suponer que será de un valor medio de los 3 dados, en concreto de 0.11 $\frac{\text{g de ácido hialurónico}}{\text{g de glucosa}}$. Este ratio significa que por cada 100 gramos de glucosa utilizados, 11 se transformarán en ácido hialurónico.

En el artículo guía, con el proceso que siguen, al final del proceso, la producción de ácido hialurónico es de 7 g/L. Como se está siguiendo ese proceso, se va a suponer que esa será la producción al final de nuestro proceso.

Se va a multiplicar la producción de 7 g/L por los litros operativos de uno de los reactores, 400 L, con el fin de ver la producción obtenida por 1 reactor al final del proceso, con esto y aplicando

el rendimiento de 0.11 explicado anteriormente se obtendrán los gramos de glucosa necesarios para uno de los reactores de 1 ciclo.

Producción al final del proceso de 1 reactor = $7 \cdot 400 = \mathbf{2800}$ g por reactor y ciclo

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Producción al final del proceso de 1 reactor}}{\text{g de glucosa necesarios}} \quad (16)$$

$$0.11 = \frac{2800}{\text{g de glucosa}}$$

$$\text{Glucosa para 1 reactor} = 25454.55 \text{ g} = \mathbf{25.46 \text{ kg}}$$

Luego para un ciclo entero:

$$\text{Glucosa para 1 ciclo} = 25454.55 \cdot 2 = 50909.1 \text{ g} = \mathbf{51 \text{ kg}}$$

Para el total de producción ya se ha definido que se necesitará llevar a cabo 183 ciclos por lo que la cantidad total de glucosa necesaria para llevar a cabo la producción marcada es de:

$$\text{Glucosa total} = 51 \cdot 183 = \mathbf{9333 \text{ kg}}$$

La tabla resumen de la glucosa necesaria para la producción se muestra a continuación:

	kg de glucosa necesaria
1 Reactor	25.46
1 Ciclo	51
Producción total	9333

Tabla 4. kg de glucosa necesarios

4.3.1.2 Cálculo de celulosa y pieles de naranja necesaria

Se ha elegido que la glucosa sea la fuente de carbono del proceso, no obstante, si se optara por comprar directamente la glucosa los costes aumentarían en gran medida debido al elevado coste que tiene la glucosa, es por esto por lo que se obtendrá mediante una hidrólisis ácida de pieles de naranja las cuales tienen una concentración del 33.98% (Rivas, Mills, & D. Jones, 2013)

aproximadamente de celulosa, que mediante la hidrólisis ácida se transformará en la glucosa del proceso.

Según bibliografía el rendimiento de la transformación de la celulosa en glucosa es del 22%, por lo que, sabiendo la cantidad de glucosa necesaria, se puede calcular la cantidad de celulosa que se tiene que utilizar para cumplir la producción. Esta se calculará aplicando inversamente el rendimiento a la cantidad de glucosa necesaria:

Para un reactor:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Kg Glucosa}}{\text{Kg Celulosa}} \cdot 100 \quad (17)$$

$$22 = \frac{25.46}{\text{Kg Celulosa}} \cdot 100$$

$$\text{Kg Celulosa} = \mathbf{115.73 \text{ Kg para un reactor}}$$

Si se redondea el valor hacia arriba, se obtiene un valor de:

$$\text{Kg de celulosa para un reactor} = \mathbf{116 \text{ Kg}}$$

Para un ciclo entero:

$$22 = \frac{51}{\text{Kg Celulosa}} \cdot 100$$

$$\text{Kg Celulosa} = \mathbf{231.82 \text{ Kg para un ciclo}}$$

Si se redondea el valor hacia arriba, se obtiene un valor de:

$$\text{Kg Celulosa para un ciclo} = \mathbf{232 \text{ Kg}}$$

Para la producción total:

$$22 = \frac{9333}{\text{Kg de Celulosa}} \cdot 100$$

$$\text{Kg de Celulosa} = \mathbf{42422.73 \text{ Kg para la producción total}}$$

Si se redondea el valor hacia arriba, se obtiene un valor de:

$$\text{Kg de Celulosa para la producción total} = \mathbf{42423 \text{ Kg}}$$

La tabla resumen de la celulosa necesaria para la producción se muestra a continuación:

	Kg de Celulosa necesaria
1 Reactor	116
1 Ciclo	232
Producción total	42423

Tabla 5. kg de celulosa necesaria

Una vez se han calculado los kg de celulosa necesaria para cumplir la producción de glucosa, se van a calcular los kg de pieles de naranja de las que se obtendrá la celulosa. Sabiendo que contienen un 33,98% de celulosa, aplicando el porcentaje inversamente a la cantidad de celulosa necesaria, se calcularán los kg de pieles de naranja necesarios:

Para un reactor:

$$\% \text{ de celulosa en pieles de naranja} = \frac{\text{kg de celulosa}}{\text{kg de pieles de naranja}} \cdot 100 \quad (18)$$

$$\text{kg de pieles de naranja para un reactor} = \frac{116 \cdot 100}{33.98} = \mathbf{341.38 \text{ kg}}$$

Para un ciclo:

$$\text{kg de pieles de naranja para un ciclo} = \frac{232 \cdot 100}{33.98} = \mathbf{682.76 \text{ kg}}$$

Para el total de la producción:

$$\text{kg de pieles de naranja para el total} = \frac{42423 \cdot 100}{33.98} = \mathbf{124846.97 \text{ kg}}$$

Si se redondea el valor hacia arriba, se obtiene un valor de:

$$\text{kg de pieles de naranja para el total} = \mathbf{124847 \text{ kg}}$$

La tabla resumen de las pieles de naranja necesarias para la producción se muestra a continuación:

	Kg de pieles de naranja necesarias
1 Reactor	341.38
1 Ciclo	682.76
Producción total	124847

Tabla 6. kg de pieles de naranja necesarias

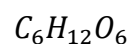
4.3.2 Cálculo de la cantidad de fuente de nitrógeno necesaria

Se va a proceder al cálculo de la cantidad de fuente de nitrógeno necesaria para cada reactor, para un ciclo y el total necesario para la producción total de ácido hialurónico. Al contrario que la fuente de carbono que se trata solo de glucosa, la fuente de nitrógeno estará compuesta tanto por Extracto de Levadura como por Caseína de peptona.

Anteriormente, se ha indicado que el ratio C:N era de 7.5, por lo que habrá 7.5 veces más fuente de carbono que de nitrógeno.

La fuente de carbono se ha definido que sería la glucosa, no obstante, no toda la glucosa es carbono, por lo que habrá que calcular primero que porcentaje de carbono contiene la glucosa. Esto se va a calcular a partir de su fórmula molecular:

La fórmula molecular de la glucosa es:



Como se puede observar, una molécula de glucosa contiene 6 átomos de carbono, 12 de hidrógeno y 6 de oxígeno. Además, cuenta con una masa molar de $180.15654 \frac{g}{mol}$.

Multiplicando los átomos de cada compuesto por su propia masa molar y se dividen por la masa total de la molécula de glucosa, se obtendrá en que porcentaje se encuentran en la glucosa. La siguiente tabla muestra los porcentajes:

Compuestos	Peso atómico	Número de átomos en la molécula	Masa en la molécula
C	12.0105	6	72.063
H	1.00797	12	12.09564
O	15.9994	6	95.9964

Tabla 7. Composición másica de la molécula de glucosa

Una vez se tiene la masa de cada compuesto dentro de la molécula de glucosa, se procede a dividirla entre la masa de la propia glucosa para ver en que porcentaje se encuentran. Como solo interesa el porcentaje de carbono en la molécula, solo se detallará el cálculo de éste:

$$\text{Porcentaje de carbono en la molécula de glucosa (\%)} = \frac{72.063}{180.15654} \cdot 100 = \mathbf{40\%}$$

Una vez se ha hallado que la molécula de glucosa tiene un 40% de carbono, se va a ver cuanto carbono real se utiliza por ciclo con lo que, aplicando el ratio C:N descrito anteriormente, se calculara la cantidad de nitrógeno necesaria para llevar a cabo el proceso.

La cantidad de glucosa necesaria para un reactor es de 25.46 kg, teniendo en cuenta que solo un 40% de ésta será carbono, la cantidad de carbono necesario por reactor es de:

$$\text{kg de carbono por reactor} = 0.4 \cdot 25.46 = \mathbf{10.19 \text{ kg}}$$

Sabiendo los kilogramos de carbono por cada reactor y el ratio C:N se calcula la cantidad de nitrógeno necesario en el medio:

$$\text{kg de nitrógeno por reactor} = \frac{10.19}{7.5} = \mathbf{1.36 \text{ kg}}$$

El motivo de dividir entre 7.5 es debido a que ha de haber 7.5 veces más carbono que nitrógeno.

Ya se ha explicado que el nitrógeno del medio vendrá de dos fuentes, de extracto de levadura y de caseína de peptona, cada uno de ellos estará a un porcentaje el cual es conocido y, además, como se conoce que porcentaje de fuente de nitrógeno hay en el medio se puede calcular que cantidad de cada fuente hay que añadir. Los datos de las 2 fuentes de nitrógeno son los siguientes:

Fuentes de nitrógeno	% de Fuente de nitrógeno que le corresponde	Contenido en nitrógeno (%)
Extracto de levadura	43	10.9
Caseína de peptona	57	13

Tabla 8. Porcentajes de Extracto de levadura y Caseína de peptona

Los datos del % de fuente de nitrógeno que le corresponde a cada compuesto, se han sacado del artículo del cual se está llevando a cabo el proceso a gran escala. Por otro lado, el contenido en nitrógeno de ellos se ha adquirido de las fichas técnicas de dos empresas de estos dos productos.

Teniendo los datos ya claros, se va a proceder al cálculo de las cantidades necesarias de cada uno de los compuestos.

4.3.2.1 Extracto de levadura

Primero, se va a calcular la cantidad de extracto de levadura necesario por reactor, por ciclo completo y finalmente para cumplir la producción total. En el paso previo se ha calculado la cantidad de nitrógeno necesario por cada reactor, 1.36 kg . Este valor se va a multiplicar por el porcentaje de extracto de levadura que le corresponde y sabiendo el porcentaje de nitrógeno que tiene, se calculará la cantidad necesaria:

Para 1 reactor:

$$\text{kg de Nitrógeno proporcionados por el extracto de levadura} = 1.36 \cdot 0.43 = 0.585 \text{ kg}$$

Una vez se sabe cuánto nitrógeno aportará el extracto de levadura, sabiendo el porcentaje en que se encuentra, se puede calcular la cantidad de extracto de levadura que habrá que añadir al reactor para cumplir el proceso. El extracto de levadura contiene un 10.9% de nitrógeno por lo que la cantidad necesaria de extracto de levadura para proporcionar 0.585 kg de Nitrógeno al proceso será de aproximadamente 11 veces más:

$$\text{kg extracto de levadura por reactor} = \frac{0.585}{0.109} = 5.37 \text{ kg}$$

Multiplicando por 2 se calculará la cantidad necesaria para un ciclo:

$$\text{kg extracto de levadura por ciclo} = 5.37 \cdot 2 = 10.74 \text{ kg}$$

Finalmente, multiplicando por el número de ciclos se calculará la cantidad de extracto de levadura necesaria para completar la producción total:

$$kg \text{ extracto de levadura total} = 10.74 \cdot 183 = \mathbf{1965.42 \text{ kg}}$$

A continuación, se muestra una tabla resumen de las cantidades necesarias de extracto de levadura para cumplir las especificaciones del proceso:

	kg de extracto de levadura necesarios
1 Reactor	5.37
1 Ciclo	10.74
Producción total	1965.42

Tabla 9. kg necesarios de extracto de levadura

4.3.2.2 Caseína de peptona

Seguidamente, se va a calcular la cantidad de caseína de peptona necesaria por reactor, por ciclo completo y finalmente para cumplir la producción total. En el paso previo se ha calculado la cantidad de nitrógeno necesario por cada reactor, 1.36 kg . Este valor se va a multiplicar por el porcentaje de caseína de peptona que le corresponde y sabiendo el porcentaje de nitrógeno que tiene, se calculará la cantidad necesaria:

Para 1 reactor:

$$kg \text{ de Nitrógeno proporcionados por la caseína de peptona} = 1.36 \cdot 0.57 = 0.775 \text{ kg}$$

Una vez se sabe cuánto nitrógeno aportará la caseína de peptona, sabiendo el porcentaje en que se encuentra, se puede calcular la cantidad de caseína de peptona que habrá que añadir al reactor para cumplir el proceso. La caseína de peptona contiene un 13% de nitrógeno por lo que la cantidad necesaria de caseína de peptona para proporcionar 0.775 kg de Nitrógeno al proceso será de aproximadamente 13 veces más:

$$kg \text{ caseína de peptona por reactor} = \frac{0.775}{0.13} = \mathbf{5.96 \text{ kg}}$$

Multiplicando por 2 se calculará la cantidad necesaria para un ciclo:

$$kg \text{ extracto de levadura por ciclo} = 5.96 \cdot 2 = \mathbf{11.92 \text{ kg}}$$

Finalmente, multiplicando por el número de ciclos se calculará la cantidad de extracto de levadura necesaria para completar la producción total:

$$kg \text{ extracto de levadura total} = 11.92 \cdot 183 = \mathbf{2181.36 \text{ kg}}$$

A continuación, se muestra una tabla resumen de las cantidades necesarias de extracto de levadura para cumplir las especificaciones del proceso:

	kg de caseína de peptona necesarios
1 Reactor	5.96
1 Ciclo	11.92
Producción total	2181.36

Tabla 10. kg de caseína de peptona necesarios

4.3.2.3 Comprobación del porcentaje de Fuente de nitrógeno en el medio

Los kilogramos totales de fuente de nitrógeno a aplicar al medio serán la suma de los kg totales de extracto de levadura más los kilogramos totales de la caseína de peptona:

$$\begin{aligned}
 \text{kg totales de nitrógeno por reactor} &= & (19) \\
 &= \text{kg totales de extracto de levadura} \\
 &+ \text{kg totales de caseína de peptona}
 \end{aligned}$$

$$\text{kg totales de nitrógeno por reactor} = 5.37 + 5.96 = \mathbf{11.37 \text{ kg}}$$

Ya se sabe que por cada reactor habrán 11.37 kg de fuentes de nitrógeno. Ya que aproximadamente un 90% de lo que habrá en el reactor es agua, se va a suponer que la densidad de la mezcla será la del agua, aproximando a:

$$\rho_{\text{agua}} = 1 \frac{\text{kg}}{\text{l}}$$

Utilizando esta aproximación, y sabiendo que el reactor tiene un volumen operativo de 400 litros, el peso total de la mezcla será de:

$$\text{Peso total de la mezcla} = \rho_{\text{agua}} \cdot L \text{ operativos del reactor} \quad (20)$$

$$\text{Peso total de la mezcla} = 1 \cdot 400 = 400 \text{ kg}$$

Sabiendo ya que el peso total de la mezcla es de aproximadamente 400 kg , y que hay 11.37 kg de fuentes de nitrógeno, se va a calcular en porcentaje de fuente de nitrógeno hay en el medio:

$$\begin{aligned} \text{\% de fuente de nitrógeno en el medio} & \quad (21) \\ & = \frac{\text{kg de fuente de nitrógeno}}{\text{kg totales de la mezcla}} \cdot 100 \end{aligned}$$

$$\text{\% de fuente de nitrógeno en el medio} = \frac{11.37}{400} \cdot 100 = \mathbf{2.84\%}$$

En el artículo del cual se ha obtenido esta reacción, el porcentaje de fuente de nitrógeno en el medio compone un 1.75% del total (Im, Song, Kang, & Kang, 2009), sin embargo, en este trabajo compone un 2.84%. Esto es debido a que en dicho artículo el porcentaje de fuente de carbono en el medio era de un 4%, no obstante, para este trabajo se utilizó un 6.36% ya que al utilizar el rendimiento de reacción del 11% que venía de otra bibliografía (Chen, Chen, Huang, & Chen, 2008), se obtenía este valor, el cual se utilizará ya que utilizar un medio con más fuente de carbono supone un escenario más desfavorable a la hora de los cálculos lo cual dará un mayor margen de maniobra. Con todo esto se concluye que para mantener el ratio C:N de 7.5 que es lo que de verdad importa, el porcentaje de fuente de nitrógeno en el medio aumentará, en este caso de 1.75% a 2.84% como se ha explicado anteriormente.

4.3.3 Cálculo de la cantidad de fuente de fosfato necesaria

La fuente de fosfato a utilizar será K_2HPO_4 , en el medio debe encontrarse en un porcentaje de entorno al 0.25%. No obstante, comercialmente, el K_2HPO_4 no tiene una pureza del 100% sino del 98%, cosa que habrá que tener en cuenta a la hora de añadirlo en la disolución y habrá que añadir un poco más. Sabiendo la cantidad de glucosa que se encontrará en el medio y cuál es su porcentaje, usando su valor como referencia se podrá calcular la cantidad a añadir de fuente de fosfato con una simple regla de 3:

$$\text{kg de } K_2HPO_4 \text{ por reactor} = \frac{\text{kg de glucosa} \cdot \text{\% de } K_2HPO_4}{\text{\% glucosa}} \quad (22)$$

$$\text{kg de } K_2HPO_4 \text{ por reactor} = \frac{25.46 \cdot 0.25}{6.36} = \mathbf{1 \text{ kg}}$$

No obstante, esta cantidad sería si fuese puro, como el que se comprará a los proveedores tendrá una pureza de un 98%, se necesitará un poco más por reactor:

$$\text{kg de } K_2HPO_4 \text{ por reactor (98\%)} = \frac{1}{0.98} = \mathbf{1.02 \text{ kg}}$$

Ahora que ya se saben los kilogramos por reactor, se calculará la cantidad por ciclo multiplicando por 2:

$$\text{kg de } K_2HPO_4(98\%) \text{ por ciclo} = 1.02 \cdot 2 = \mathbf{2.04 \text{ kg}}$$

Lo mismo ahora para el total de producción si se multiplica por 183 que es el número total de ciclos:

$$\text{kg de } K_2HPO_4(98\%) \text{ totales} = 2.04 \cdot 183 = \mathbf{373.32 \text{ kg}}$$

A continuación, se muestra una tabla resumen de las cantidades necesarias de K_2HPO_4 para cumplir las especificaciones del proceso:

	kg de K_2HPO_4 al 98%
1 Reactor	1.02
1 Ciclo	2.04
Producción total	373.32

Tabla 11. kg de K_2HPO_4 necesarios

4.3.4 Cálculo de la cantidad de fuente de minerales

La fuente de minerales a utilizar será $MgCl_2$, en el medio debe encontrarse en un porcentaje de entorno al 0.05%. Sabiendo la cantidad de glucosa que se encontrará en el medio y cuál es su porcentaje, usando su valor como referencia se podrá calcular la cantidad a añadir de fuente de minerales con una simple regla de 3:

$$\text{kg de } MgCl_2 \text{ por reactor} = \frac{\text{kg de glucosa} \cdot \% \text{ de } MgCl_2}{\% \text{ glucosa}} \quad (23)$$

$$\text{kg de } MgCl_2 \text{ por reactor} = \frac{25.46 \cdot 0.05}{6.36} = \mathbf{0.2 \text{ kg}}$$

Ahora que ya se saben los kilogramos por reactor, se calculará la cantidad por ciclo multiplicando por 2:

$$kg \text{ de } MgCl_2 \text{ por ciclo} = 0.2 \cdot 2 = \mathbf{0.4 \text{ kg}}$$

Lo mismo ahora para el total de producción si se multiplica por 183 que es el número total de ciclos:

$$kg \text{ de } MgCl_2 \text{ totales} = 0.4 \cdot 183 = \mathbf{73.2 \text{ kg}}$$

A continuación, se muestra una tabla resumen de las cantidades necesarias de $MgCl_2$ para cumplir las especificaciones del proceso:

	kg de $MgCl_2$
1 Reactor	0.2
1 Ciclo	0.4
Producción total	73.2

Tabla 12. kg de $MgCl_2$ necesarios

4.3.5 Cálculo de la cantidad de NaCl

Se va a añadir $NaCl$ para aumentar el rendimiento, en el medio debe encontrarse en un porcentaje de entorno al 0.5%. No obstante, el cloruro de sodio industrialmente tiene una pureza del 99% cosa que habrá que tener en cuenta a la hora de añadirlo en la disolución y habrá que añadir un poco más. Sabiendo la cantidad de glucosa que se encontrará en el medio y cuál es su porcentaje, usando su valor como referencia se podrá calcular la cantidad a añadir de $NaCl$ con una simple regla de 3:

$$kg \text{ de } NaCl \text{ por reactor} = \frac{kg \text{ de glucosa} \cdot \% \text{ de } NaCl}{\% \text{ glucosa}} \quad (24)$$

$$kg \text{ de } NaCl \text{ por reactor} = \frac{25.46 \cdot 0.5}{6.36} = \mathbf{2 \text{ kg}}$$

No obstante, esta cantidad sería si fuese puro, como el que se comprará a los proveedores tendrá una pureza de un 99%, se necesitará un poco más por reactor:

$$kg \text{ de } NaCl \text{ (99\%)} \text{ por reactor} = \frac{2}{0.99} = \mathbf{2.02 \text{ kg}}$$

Ahora que ya se saben los kilogramos por reactor, se calculará la cantidad por ciclo multiplicando por 2:

$$\text{kg de NaCl (99\%)} \text{ por ciclo} = 2.02 \cdot 2 = \mathbf{4.04 \text{ kg}}$$

Lo mismo ahora para el total de producción si se multiplica por 183 que es el número total de ciclos:

$$\text{kg de NaCl (99\%)} \text{ totales} = 4.04 \cdot 183 = \mathbf{739.32 \text{ kg}}$$

A continuación, se muestra una tabla resumen de las cantidades necesarias de *NaCl* para cumplir las especificaciones del proceso:

	kg de <i>NaCl</i> al 99%
1 Reactor	2.02
1 Ciclo	4.04
Producción total	739.32

Tabla 13. kg de *NaCl* necesarios

4.3.6 Cálculo de la cantidad de Glutamina

Se va a añadir glutamina para aumentar el rendimiento, en el medio debe encontrarse en un porcentaje de entorno al 0.04%. No obstante, la glutamina que se adquirirá tiene una pureza de entorno a un 98%. Sabiendo la cantidad de glucosa que se encontrará en el medio y cuál es su porcentaje, usando su valor como referencia se podrá calcular la cantidad a añadir de glutamina con una simple regla de 3:

$$\text{kg de glutamina por reactor} = \frac{\text{kg de glucosa} \cdot \% \text{ glutamina}}{\% \text{ glucosa}} \quad (25)$$

$$\text{kg de glutamina por reactor} = \frac{25.46 \cdot 0.04}{6.36} = \mathbf{0.16 \text{ kg}}$$

No obstante, esta cantidad sería si fuese puro, como el que se comprará a los proveedores tendrá una pureza de un 98%, se necesitará un poco más por reactor:

$$\text{kg de glutamina por reactor (98\%)} = \frac{0.16}{0.98} = \mathbf{0.164 \text{ kg}}$$

Ahora que ya se saben los kilogramos por reactor, se calculará la cantidad por ciclo multiplicando por 2:

$$\text{kg de glutamina (98\%) por ciclo} = 0.164 \cdot 2 = \mathbf{0.328 \text{ kg}}$$

Lo mismo ahora para el total de producción si se multiplica por 183 que es el número total de ciclos:

$$\text{kg de glutamina (98\%) totales} = 0.328 \cdot 183 = \mathbf{60.024 \text{ kg}}$$

A continuación, se muestra una tabla resumen de las cantidades necesarias de glutamina para cumplir las especificaciones del proceso:

	kg de glutamina al 98%
1 Reactor	0.164
1 Ciclo	0.328
Producción total	60.024

Tabla 14. kg de glutamina necesarios

4.3.7 Cálculo de la cantidad de Glutamato

Se va a añadir glutamato para aumentar el rendimiento, en el medio debe encontrarse en un porcentaje de entorno al 0.06%. No obstante, el glutamato que se adquirirá tiene una pureza de entorno a un 99%. Sabiendo la cantidad de glucosa que se encontrará en el medio y cuál es su porcentaje, usando su valor como referencia se podrá calcular la cantidad a añadir de glutamato con una simple regla de 3:

$$\text{kg de glutamato por reactor} = \frac{\text{kg de glucosa} \cdot \% \text{ glutamato}}{\% \text{ glucosa en el reactor}} \quad (26)$$

$$\text{kg de glutamato por reactor} = \frac{25.46 \cdot 0.06}{6.36} = \mathbf{0.24 \text{ kg}}$$

No obstante, esta cantidad sería si fuese puro, como el que se comprará a los proveedores tendrá una pureza de un 99%, se necesitará un poco más por reactor:

$$\text{kg de glutamato (99\%) por reactor} = \frac{0.24}{0.99} = \mathbf{0.243 \text{ kg}}$$

Ahora que ya se saben los kilogramos por reactor, se calculará la cantidad por ciclo multiplicando por 2:

$$\text{kg de glutamato (99\%) por ciclo} = 0.243 \cdot 2 = \mathbf{0.486 \text{ kg}}$$

Lo mismo ahora para el total de producción si se multiplica por 183 que es el número total de ciclos:

$$\text{kg de glutamato (99\%) totales} = 0.486 \cdot 183 = \mathbf{88.94 \text{ kg}}$$

A continuación, se muestra una tabla resumen de las cantidades necesarias de glutamato para cumplir las especificaciones del proceso:

	kg de glutamato (99%)
1 Reactor	0.243
1 Ciclo	0.486
Producción total	88.94

Tabla 15. kg de glutamato

4.3.8 Cálculo de la cantidad de Ácido Oxálico

Se va a añadir ácido oxálico para aumentar el rendimiento, en el medio debe encontrarse en un porcentaje de entorno al 0.02%. Sabiendo la cantidad de glucosa que se encontrará en el medio y cuál es su porcentaje, usando su valor como referencia se podrá calcular la cantidad a añadir de ácido oxálico con una simple regla de 3:

$$\text{kg de á. oxálico por reactor} = \frac{\text{kg de glucosa} \cdot \% \text{ á. oxálico}}{\% \text{ glucosa en el reactor}} \quad (27)$$

$$\text{kg de ácido oxálico por reactor} = \frac{25.46 \cdot 0.02}{6.36} = \mathbf{0.08 \text{ kg}}$$

Ahora que ya se saben los kilogramos por reactor, se calculará la cantidad por ciclo multiplicando por 2:

$$\text{kg de ácido oxálico por ciclo} = 0.08 \cdot 2 = \mathbf{0.16 \text{ kg}}$$

Lo mismo ahora para el total de producción si se multiplica por 183 que es el número total de ciclos:

$$\text{kg de ácido oxálico totales} = 0.16 \cdot 183 = \mathbf{29.28 \text{ kg}}$$

A continuación, se muestra una tabla resumen de las cantidades necesarias de ácido oxálico para cumplir las especificaciones del proceso:

	kg de ácido oxálico
1 Reactor	0.08
1 Ciclo	0.16
Producción total	29.28

Tabla 16. kg de ácido oxálico necesarios

4.4 Cálculo del tamaño de los tanques donde se realizará la hidrólisis ácida y de las cantidades de ácido y agua necesarias

La hidrólisis ácida es el proceso mediante el cual la celulosa presente en las pieles de naranja se transformará en glucosa, la fuente de carbono del proceso. Los cálculos relacionados con el proceso de hidrólisis se van a realizar para que cada vez que se complete un proceso de hidrólisis se tenga glucosa como para completar un ciclo de 2 reactores. La glucosa, celulosa y pieles de naranja necesarias para un ciclo se muestran a continuación:

	Kg de fuente de carbono necesarios para cumplir 1 ciclo del proceso
Glucosa	51
Celulosa	232
Pieles de naranja	682.76

Tabla 17. kg de fuente de carbono necesarios para cumplir 1 ciclo

4.4.1 Volumen de ácido necesario

Para la hidrólisis ácida se va a utilizar ácido sulfúrico en una concentración $2.5M$, es decir, $2.5 \frac{mol}{L}$. Se va a calcular los kilogramos de solución de ácido sabiendo que el ratio sólido-líquido según bibliografía es de 1: 8 siendo el sólido la celulosa y el líquido la solución de ácido. Se utilizan 232 kg de celulosa, por lo que siguiendo el ratio habrá 8 veces más líquido:

$$kg \text{ de solución de ácido} = kg \text{ de celulosa} \cdot 8 = 232 \cdot 8 = \mathbf{1856 kg}$$

En pos de facilitar los cálculos, la densidad de la mezcla se supondrá la del agua, es decir, $0.998 \frac{kg}{L}$. Partiendo de lo que se conoce, la concentración en la que se encuentra el ácido, mediante cambios de unidades se va a llegar a los kilogramos de ácido necesarios. El desarrollo se muestra a continuación:

$$2.5 \left(\frac{mol_{H_2SO_4}}{L_{Disolución}} \right) \cdot Mr_{H_2SO_4} \left(\frac{g_{H_2SO_4}}{mol_{H_2SO_4}} \right) = 2.5 \cdot Mr_{H_2SO_4} \left(\frac{g_{H_2SO_4}}{L_{Disolución}} \right)$$

Siendo $Mr_{H_2SO_4} = 98.08 \frac{g}{mol}$ y dividiendo por la densidad de la disolución:

$$2.5 \cdot Mr_{H_2SO_4} \left(\frac{g_{H_2SO_4}}{L_{Disolución}} \right) \cdot \frac{1}{\rho_{Disolución}} \left(\frac{L_{Disolución}}{kg_{Disolución}} \right) = \frac{2.5 \cdot Mr_{H_2SO_4}}{\rho_{Disolución}} \left(\frac{g_{H_2SO_4}}{kg_{Disolución}} \right)$$

Pasando los gramos de ácido a kilogramos dividiendo entre 1000, se tendrá como unidad de la operación $\frac{kg \text{ de } H_2SO_4}{kg \text{ de disolución}}$, lo cual se multiplicará por los kg de disolución calculados anteriormente y se obtendrán los kilogramos que hay que utilizar de ácido:

$$\frac{2.5 \cdot Mr_{H_2SO_4}}{\rho_{Disolución} \cdot 1000} \left(\frac{kg_{H_2SO_4}}{kg_{Disolución}} \right) \cdot 1856(kg_{Disolución})$$

$$kg_{H_2SO_4} = \frac{2.5 \cdot Mr_{H_2SO_4} \cdot 1856}{\rho_{Disolución} \cdot 1000}$$

$$kg_{H_2SO_4} = \frac{2.5 \cdot 98.08 \cdot 1856}{0.998 \cdot 1000} = \mathbf{455.18 kg}$$

No obstante, el ácido sulfúrico no llega a concentraciones del 100%, sino a un 98%, por lo que se deberá añadir un poco más de ácido en el medio:

$$kg_{H_2SO_4}(98\%) = \frac{455.18}{0.98} = \mathbf{464.47 \text{ kg}}$$

Se han calculado los kilogramos de ácido necesarios para completar la producción de 1 ciclo. Mediante el uso de la densidad del ácido, se calculará el volumen en Litros que ocupará el ácido en el tanque:

$$d_{H_2SO_4} = 1.8361 \frac{kg}{L}$$

$$d_{H_2SO_4} = \frac{m}{V}$$

$$V(98\%) = \frac{464.47}{1.8361} = \mathbf{252.97 \text{ L}}$$

4.4.2 Volumen de agua necesaria

Una vez se conoce la masa total que ocupa la disolución y se ha calculado la masa que ocupa el ácido, se puede calcular con una resta la masa que ocupará el agua.

$$kg \text{ de agua} = kg \text{ de la disolución} - kg \text{ de ácido}$$

$$kg \text{ de agua} = 1856 - 464.47 = \mathbf{1391.53 \text{ kg}}$$

Mediante la fórmula de la densidad, despejando, se calculará el volumen de agua:

$$V = \frac{kg \text{ de agua}}{\rho_{Agua}}$$

$$V = \frac{1391.53}{0.998} = \mathbf{1394.32 \text{ L}}$$

4.4.3 Volumen total de los tanques

Conocidos los volúmenes que ocuparán por separado los dos compuestos, se pueden sumar para calcular el volumen total necesario y ver cuan grandes serán los tanques necesarios:

$$\begin{aligned} \text{Volumen total de la disolución} &= & (28) \\ &= \text{Volumen de agua} + \text{Volumen de ácido} \end{aligned}$$

$$\text{Volumen total de la disolución} = 1394.32 + 252.97 = \mathbf{1647.29 L}$$

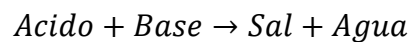
Los tanques serán un poco más grandes por seguridad:

$$V \text{ tanques} = \frac{1647.29}{2} = 824 L$$

Se utilizarán 2 tanques de **850** Litros

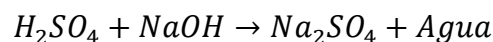
4.5 Cálculo de la cantidad de NaOH a añadir para neutralizar el ácido del proceso de hidrólisis

Al utilizar ácido sulfúrico 2.5M, el *pH* del medio será muy bajo, situación que evitará el correcto funcionamiento del proceso. Es por esto por lo que se debe neutralizar el medio, equilibrar el *pH*. Para ello se va a utilizar *NaOH* en estado sólido, para no variar el volumen en gran medida. Una reacción de neutralización se basa en el siguiente principio:



Los iones H^+ del ácido y los iones OH^- de la base reaccionan para dar agua.

En el caso del trabajo, se utiliza H_2SO_4 y *NaOH* por lo que se expresará como:



La sal se encontrará disuelta en el agua y al ser una sal que no es peligrosa ni afectará al medio no se le hará ningún tipo de tratamiento, se dejará disuelta en el medio. Por otro lado, al tratarse de un ácido y una base fuertes, se disocian por completo. Al ser el ácido sulfúrico un ácido diprótico y el hidróxido de sodio no, hará falta multiplicar por 2 los cálculos del *NaOH* y darán un *pH* de 7 teóricamente, que es el de trabajo. La cantidad de *NaOH(s)* que se tiene que utilizar se calcula a continuación:

Para lograr la neutralización, se debe añadir al medio una concentración de $NaOH$ igual a la de ácido, una concentración de $2.5 M$. Los cálculos para hallar la cantidad de $NaOH$ sólido a añadir para completar la neutralización son los siguientes:

Para 1 reactor:

$$\text{Masa molar del } NaOH = 39.997 \frac{g}{mol}$$

$$2 \cdot 2.5 = \left(\frac{mol}{L} \right);$$

$$2 \cdot 2.5 = \left(\frac{masa}{824 \cdot 39.997} \right);$$

$$\text{Masa de } NaOH \text{ para 1 reactor} = 164787.64 g = \mathbf{164.79 kg}$$

El $NaOH$ comercial sin embargo no llega a la pureza del 100%, opta como mucho al 99%, por lo que la cantidad a añadir será un poco mayor:

$$\text{Masa de } NaOH (98\%) \text{ para 1 reactor} = \frac{164.79}{0.99} = \mathbf{166.45 kg}$$

Para 1 ciclo:

$$\text{Masa de } NaOH (98\%) \text{ para 1 ciclo} = 166.45 \cdot 2 = \mathbf{332.9 kg}$$

Para el total de producción:

$$\text{Masa de } NaOH (98\%) \text{ para el total de producción} = 332.9 \cdot 183 = \mathbf{60920.7 kg}$$

A continuación, se muestra una tabla resumen de las cantidades necesarias de hidróxido de sodio para cumplir las especificaciones del proceso:

	kg de hidróxido de sodio
1 Reactor	166.45
1 Ciclo	332.9
Producción total	60920.7

Tabla 18. kg de $NaOH$ necesarios

4.6 Cálculo de la cantidad de agua a evaporar tras la hidrólisis ácida

Una vez realizado el proceso de hidrólisis ácida y neutralizado el medio, el medio con la glucosa se debe introducir al fermentador principal, no obstante, la cantidad de solución es bastante mayor a la que se debe introducir en el fermentador, es por esto que se debe evaporar una porción de agua para que las cantidades sean las adecuadas. Para esto se va a comprar un evaporador y a continuación se va a calcular la cantidad de agua que deberá evaporar para así poder introducir la solución en el fermentador. Se sabe que el volumen total de solución donde se realiza la hidrólisis ácida es de dos tanques de 824 L, aunque luego los tanques sean algo mayores, ese volumen es el volumen operativo de cada uno de ellos. Bien, si en cada fermentador donde se llevará a cabo la reacción hay un volumen operativo de 400 L, se va a calcular la cantidad de agua que se necesita evaporar para poder introducir esta solución en los fermentadores:

$$\begin{aligned} \text{Cantidad de agua a evaporar} &= & (29) \\ &= V. \text{ de agua tras la H. Ácida} - V. \text{ en el fermentador} \end{aligned}$$

$$\text{Cantidad de agua a evaporar} = 824 - 400 = 424 \text{ L}$$

Se debe adquirir 2 evaporadores capaces de evaporar 424 L de agua.

4.7 Cálculo del medio de crecimiento del microorganismo

El medio donde se va a hacer crecer el microorganismo será el conocido como *Todd Hewitt Broth*. Es un medio muy específico el cual se adquirirá ya preparado, solo hay que seguir las instrucciones de que por cada 37 g de medio, se deben añadir 1000 ml de agua. En el artículo modelo, introducen el microorganismo en 80 ml de medio THB, lo dejan crecer durante unas 24 horas y seguidamente lo introducen en el reactor de volumen operativo de 45 L ya cargado. Para este trabajo se va a escalar con una simple regla de 3 al volumen operativo calculado del reactor, en este caso 400 L:

$$\begin{aligned} \text{ml de cultivo de crecimiento} &= & (30) \\ &= \frac{\text{ml de cultivo de crecimiento planta piloto} \cdot V_{\text{Reactor}}}{V_{\text{Reactor planta piloto}}} \end{aligned}$$

$$ml \text{ de cultivo de crecimiento} = \frac{80 \cdot 400}{45} = \mathbf{711.12 \text{ ml}}$$

Ahora ya se sabe cuanto medio hace falta para cada reactor. Con este dato y sabiendo que por cada 37 g de medio, se deben añadir 1000 ml de agua, se calculará la cantidad de medio THB que se necesitará por reactor con una sencilla regla de 3:

$$g \text{ de medio THB} = \frac{g \text{ por cada } 1000 \text{ ml} \cdot V \text{ a añadir a 1 reactor}}{V \text{ de } 1000 \text{ ml}} \quad (31)$$

$$g \text{ de medio THB} = \frac{37 \cdot 711.12}{1000} = \mathbf{26.31 \text{ g}}$$

Para un ciclo completo será el doble:

$$g \text{ de medio THB para un ciclo} = 26.31 \cdot 2 = \mathbf{52.62 \text{ g}}$$

Los ml que añadir en un ciclo se calcularán al inverso de cómo se han calculado los g de medio:

$$V \text{ a añadir a 1 ciclo} = \frac{g \text{ de medio THB para un ciclo} \cdot V \text{ de } 1000 \text{ ml}}{g \text{ por cada } 1000 \text{ ml}} \quad (32)$$

$$V \text{ a añadir a 1 ciclo} = \frac{52.62 \cdot 1000}{37} = \mathbf{1422.24 \text{ ml}}$$

Para la producción completa será el mismo procedimiento, pero 183 veces, el número de ciclos:

$$g \text{ de medio THB total} = 52.62 \cdot 183 = \mathbf{9563.58 \text{ g}}$$

$$V \text{ a añadir total} = 1422.25 \cdot 183 = 260271.75 \text{ ml} = \mathbf{260.272 \text{ L}}$$

A continuación, se muestra una tabla resumen de la cantidad de medio THB necesario, así como el volumen de agua que es necesario añadir:

	g de medio THB	L de agua a añadir
1 Reactor	26.31	0.711
1 Ciclo	52.62	1.422
Producción total	9563.58	260.272

Tabla 19. g de medio THB necesarios así como su volumen de agua

Sabiendo esto, con utilizar un tanque de unos 2 litros por cada ciclo será más que suficiente.

4.8 Cálculo de los parámetros de la operación de purificación del ácido hialurónico al final del proceso

Una vez finalizado el proceso, se debe purificar y extraer el ácido hialurónico del medio para poder venderlo, esto se va a realizar mediante la adición de etanol al medio para provocar que precipite y poder sacarlo con una pureza de entorno a un 80%. El sobrenadante tras quitar las células debe ser lavado con la misma cantidad de etanol al 95%.

El reactor tiene 400 L operativos, habrá que lavarlo con 400 L de etanol al 95% que es el que venden industrialmente. Luego se necesitan:

$$\text{Por reactor} = 400 \text{ Litros de etanol } 95\%$$

$$\text{Por ciclo} = 800 \text{ Litros de etanol } 95\%$$

$$\text{Para el total de producción} = 800 \cdot 183 = \mathbf{146400} \text{ Litros de etanol } 95\%$$

Pasándolo a kilogramos mediante su densidad ya que se ha visto que se vende en kilogramos:

$$\rho_{\text{Etanol}} = 0.789 \frac{\text{kg}}{\text{L}}$$

$$0.789 = \frac{\text{kg etanol}}{146400}$$

$$\text{kg etanol totales} = \mathbf{115509.6} \text{ kg}$$

No obstante, se recircula al evaporador recuperando cantidades de etanol de hasta un 80%. Por lo que solo se deberá renovar un 20%. Ese 20% más lo que se tenga que comprar luego para el lavado, serán los kilogramos totales de etanol a comprar:

$$\text{kg etanol totales despues de recuperar } 80\% = 115509.6 \cdot 0.2 = \mathbf{23101.92} \text{ kg}$$

Una vez se ha precipitado el ácido hialurónico con el etanol, se debe aislar y lavar cinco veces con etanol al 80%. Como es un lavado del ácido hialurónico precipitado obtenido al final del proceso, no hará falta una gran cantidad de etanol en esta parte, se va a utilizar una proporción de etanol-ácido hialurónico de 1: 1, $L: kg$, por lo que, por cada kg de producto precipitado, se lavará con la misma cantidad de ácido:

$$\begin{aligned} kg \text{ de ácido hialurónico al final de 1 ciclo} &= \\ &= \frac{\text{Rendimiento} \left(\frac{g}{L} \right) \cdot L \text{ totales en 1 ciclo}}{1000} \end{aligned} \quad (33)$$

$$kg \text{ de ácido hialurónico al final de 1 ciclo} = \frac{6.94 \cdot 800}{1000} = 5.552 \text{ kg}$$

Luego si se tienen 5.552 kg de ácido hialurónico puro, habrá que utilizar la misma cantidad de etanol al 80%, en 5 veces para el proceso de lavado. Los cálculos para ver la cantidad de etanol al 95% que es necesario comprar para este lavado son los siguientes:

$$L \text{ de etanol (80\%) necesarios} = 5.552 \text{ L}$$

Como el etanol que se adquiere al comprador es al 95%, utilizando la fórmula de concentraciones se calcularán los litros de etanol al 95% necesarios:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \quad (34)$$

$$80 \cdot 5.552 = 95 \cdot V_2$$

El volumen de etanol al 95% a añadir será de:

$$V \text{ etanol (95\%)} = \frac{80 \cdot 5.552}{95} = 4.675 \text{ L}$$

El resto será agua:

$$V \text{ agua en etanol (80\%)} = 5.552 - 4.675 = 0.877 \text{ L}$$

Todo lo que se ha calculado, corresponde a 1 lavado de 1 ciclo de producción, por lo que para los 5 lavados de 1 ciclo:

$$\text{Etanol (80\%)} \text{ para 5 lavados} = 5.552 \cdot 5 = 27.76 \text{ L}$$

$$\text{Etanol (95\%)} \text{ para 5 lavados} = 4.675 \cdot 5 = 23.375 \text{ L}$$

$$V \text{ agua en etanol (80\%)} \text{ para 5 lavados} = 0.877 \cdot 5 = 4.385 \text{ L}$$

Finalmente, para el total de 183 ciclos:

$$\text{Etanol (80\%)} \text{ para el total de producción} = 27.76 \cdot 183 = 5080.08 \text{ L}$$

$$\text{Etanol (95\%)} \text{ para el total de producción} = 23.375 \cdot 183 = 4277.625 \text{ L}$$

$$V \text{ agua en etanol (80\%)} \text{ para el total de producción} = 4.385 \cdot 183 = 802.455 \text{ L}$$

A continuación, se muestra una tabla resumen de las cantidades totales necesarias:

	L etanol 80%	L etanol 95%	L agua a añadir a etanol al 95%
1 lavado de 1 ciclo	5.552	4.675	0.877
5 lavados de 1 ciclo	27.76	23.375	4.385
Producción total	5080.08	4277.625	802.455

Tabla 20. Litros de etanol necesarios para los lavados finales del producto

Se van a pasar los litros de etanol 95% a kg ya que es como se va a adquirir a los compradores:

$$\rho_{\text{Etanol}} = 0.789 \frac{\text{kg}}{\text{L}}$$

$$0.789 = \frac{\text{kg etanol}}{4277.625}$$

$$\text{kg etanol (95\%)} = 3375.05 \text{ kg}$$

4.9 Cálculo del área total del intercambiador de calor

Un sistema para refrigerar el fermentador principal será necesario, ya que un proceso de fermentación es exotérmico y se generará un calor que aumentará la temperatura en mayor o menor

medida, lo cual afectará a la temperatura buscada para la reacción. Por otro lado, la disolución de glucosa que sale del evaporador saldrá a una temperatura notablemente más alta que la que se busca para la reacción, por lo que habrá que enfriarla. Si se diseña un intercambiador de calor para esta segunda situación que es la más desfavorable, se asegura un cumplimiento de la primera situación también. Se ha optado por un serpentín interno puesto que es una de las opciones más viables y utilizadas en la industria. Se utilizará agua de red como refrigerante debido a su bajo coste y a su reducido impacto ambiental. El procedimiento seguido para realizar los cálculos es el siguiente:

El balance de energía en el fermentador es el siguiente:

$$\text{Calor cedido por la disolución} = \text{Calor absorbido por serpentín} \quad (35)$$

Se supone una reacción adiabática por lo que el calor absorbido por los alrededores del reactor será nulo.

El calor que cederá la disolución de glucosa se calculará como:

$$q_{disol} = M_{disol} \cdot Cp_{disol, 55^{\circ}C} \cdot (Tf_{disol} - Ti_{disol}) \quad (36)$$

Donde:

- q_{disol} es el calor que cederá la disolución (kJ)
- M_{disol} es la masa de disolución en el reactor (475 kg). Se pone más peso por seguridad y para que en la situación real enfríe más rápido.
- $Cp_{disol, 55^{\circ}C}$ es el calor específico de la disolución a 55 °C, la temperatura a la que salen del evaporador. Se supone el del agua. (4.183 kJ/kg · K)
- Tf_{disol} es la temperatura final de la disolución (36°C)
- Ti_{disol} es la temperatura inicial de la disolución a (55°C)

Si se sustituyen los valores se puede calcular el valor del calor cedido por la disolución:

$$q_{disol} = 475 \cdot 4.183 \cdot [(36 + 273.15) - (55 + 273.15)]$$

$$q_{disol} = -37752 \text{ kJ} = -37.752 \text{ MJ}$$

El valor del calor cedido por la disolución expresado en kilojulios es de -37752 kJ . Toma un valor negativo debido a que está cediendo calor y se está enfriando.

El calor que absorberá el serpentín se representará con la siguiente fórmula:

$$f \cdot Q_s = U_s \cdot A_T \cdot \Delta T_{ml} \quad (37)$$

Donde:

- f representa un factor de seguridad, para el cual se le va a aplicar un valor de 1.5
- Q_s representa el caudal de calor que absorberá el serpentín. Se puede representar como:

$$Q_s = \frac{q_{disol}}{t_{enfriamiento}} \quad (38)$$

- U_s representa el coeficiente global de transmisión de calor. Éste se obtiene como la suma de todas las resistencias en paralelo del coeficiente de convección que tendrá el agua del serpentín, el coeficiente de conducción que tendrá el material del que esté hecho el serpentín, supongamos acero en este caso, y, por último, el coeficiente de convección de la disolución de agua y glucosa. Si se utiliza acero o cobre, ambos son muy buenos conductores térmicos, y además si se tiene en cuenta que la disolución está en agitación constante, lo cual aumentará la resistencia por convección de la disolución de agua y glucosa ambos desaparecerán de la ecuación. Concluyendo, el coeficiente global de transmisión de calor, U_s , se puede aproximar sin un error demasiado grande al coeficiente de convección del agua del serpentín, h .
- A_T representa el área total de transferencia de calor del serpentín
- ΔT_{ml} representa la temperatura media logarítmica. Para el valor de la temperatura de salida de agua del serpentín, se ha usado la media aritmética entre la temperatura a la entrada del

serpentín y la temperatura inicial de la disolución del fermentador. La temperatura de entrada del agua al serpentín proviene de la red y se toma un valor de 20°C.

Se procede al cálculo de la temperatura media logarítmica. La fórmula que se va a utilizar es:

$$\Delta T_{ml} = \frac{(T_{i_d} - T_{aE}) - (T_{as} - T_{f_d})}{\ln \frac{(T_{i_d} - T_{aE})}{(T_{as} - T_{f_d})}} \quad (39)$$

La temperatura de salida de agua del serpentín será de:

$$T_{as} = \frac{T_{i_d} + T_{ae}}{2} \quad (40)$$

$$T_{as} = \frac{55 + 20}{2} = 37.5 \text{ °C}$$

Sustituyendo en la fórmula de la temperatura media logarítmica se obtiene:

$$\Delta T_{ml} = \frac{(55 - 20) - (37.5 - 36)}{\ln \frac{(55 - 20)}{(37.5 - 36)}} = \mathbf{10.64 \text{ °C}}$$

Este valor nos servirá más adelante para calcular el área de intercambio de calor. El siguiente paso es calcular el coeficiente de convección del agua del serpentín, es por esto que se van a calcular los números adimensionales de Nusselt, Reynolds y Prandtl. Las fórmulas son las siguientes:

Reynolds:

$$Re = \frac{\rho \cdot V \cdot D}{\mu} \quad (41)$$

Donde:

- ρ será la densidad del agua a la temperatura media del agua en el serpentín, 996.02 kg/m³.
- V será la velocidad del agua por el serpentín, se calculará más adelante.

- D será el diámetro del serpentín, 20 mm .
- μ será la viscosidad dinámica del agua a la temperatura media del agua del serpentín, en este caso tomará un valor de $0.000815 \text{ kg/m} \cdot \text{s}$.

Nusselt:

$$Nu = \frac{h \cdot D}{k} = 0.023 \cdot Re^{0.8} \cdot Pr^{0.4} \quad (42)$$

Donde:

- h es el coeficiente de convección del agua del serpentín ($\frac{J}{m^2 \cdot ^\circ C}$).
- k es la conductividad del agua del serpentín a la temperatura media del agua del serpentín, en este caso tomará un valor de $0.615 \frac{W}{m \cdot ^\circ C}$.

Prandtl:

$$Pr = \frac{Cp \cdot \mu}{k} \quad (43)$$

Donde:

- Cp es la capacidad calorífica del agua del serpentín a la temperatura media del agua del serpentín, en este caso tomará un valor de $4.17 \frac{kJ}{kg \cdot ^\circ C}$.

Una vez explicadas todas las fórmulas que se van a usar, el primer paso es el cálculo de la velocidad del agua por el serpentín. El agua procederá de la red, mediante una tubería con un diámetro de 20 mm , y por la que pasará un caudal de $10 \frac{L}{min}$. Convirtiendo el caudal a $\frac{m^3}{s}$, se obtiene un caudal de $0.000167 \frac{m^3}{s}$. Si se multiplica el caudal por la densidad, se obtiene el valor del caudal másico:

$$w = 996.02 \cdot 0.000167 = 0.166 \frac{kg}{s}$$

Una vez se tiene el caudal másico, dividiéndolo entre el producto de la densidad por la superficie se obtiene la velocidad del agua por la tubería:

$$V = \frac{w}{\rho \cdot S} \quad (44)$$

$$V = \frac{0.17}{966.02 \cdot \pi \cdot 0.01^2} = 0.53 \frac{m}{s}$$

Con el valor de la velocidad, ya se puede calcular el número de Reynolds y a partir de él, el resto de números adimensionales necesarios para despejar el valor de h :

$$Re = \frac{996.02 \cdot 0.53 \cdot 0.02}{0.000815} = 12966.99$$

Sabiendo el número de Reynolds se calculará el de Prandtl:

$$Pr = \frac{4.17 \cdot 0.000815 \cdot 1000}{0.615} = 5.538$$

Sabiendo el número de Prandtl y el de Reynolds, en la fórmula del número de Nusselt, despejando, se calcula el coeficiente h :

$$h = 0.023 \cdot \frac{k}{D} \cdot Re^{0.8} \cdot Pr^{0.4} \quad (45)$$

$$h = 0.023 \cdot \frac{0.615}{0.02} \cdot 12966.99^{0.8} \cdot 5.538^{0.4} = 2736.44 \frac{J}{m^2 s^{\circ}C}$$

Finalmente, conociendo h y sustituyendo en la ecuación del área, se obtiene la siguiente ecuación:

$$A_T = \frac{f \cdot q_m}{t_{enfriamiento} \cdot h \cdot \Delta T m l} \quad (46)$$

Sustituyendo y suponiendo un tiempo de 2 horas para el enfriamiento:

$$A_T = \frac{1.5 \cdot (-1) \cdot (-37752) \cdot 1000}{(2 \cdot 3600) \cdot 2736.44 \cdot 10.64} = \mathbf{0.27 m^2}$$

Se ha calculado finalmente, que el serpentín deberá tener un área de intercambio de calor de 0.27 m^2 . Como hay 2 fermentadores principales, se necesitarán 2.

En los catálogos los intercambiadores de calor de serpentín son a medida a partir de unos diámetros. Se va a calcular cual será la longitud que deberá tener el intercambiador para tener el área de intercambio anterior. El área de un cilindro es:

$$A = 2 \cdot \pi \cdot r \cdot L \quad (47)$$

Despejando la longitud se tiene que debe medir:

$$L = \frac{0.27}{2 \cdot \pi \cdot \frac{0.02}{2}} = 4.3 \text{ metros}$$

5 Análisis económico

Como se ha explicado anteriormente, se procederá a realizar un análisis económico del proceso y ver si es viable o no llevarlo a cabo. Se va a realizar un análisis de rentabilidad calculando el VAN, el TIR y el Pay-Back. Primero se deben calcular los presupuestos de inversión y de explotación:

5.1 Presupuesto de inversión

Se detallan a continuación el presupuesto correspondiente a la maquinaria necesaria, considerando el precio en base a catálogos online y estimando el precio para cada equipo dentro de un rango que ofrecía el catálogo:

Equipos y maquinaria			
Equipos	Unidades	Precio/Unidad	Precio €
Fermentador proceso (700 L)	2	21000	42000
Crecimiento microorganismo (2 L)	3	20.88	62.64
Agitador con calefacción microorganismo	1	258.145	258.145
Tanque hidrólisis ácida (850 L)	2	3558.95	7117.9
Tanques para lavado con etanol (900 L)	2	4505	9010
Tanque lavado ácido hialurónico (50 L)	2	200	400
Evaporadores	2	7000	14000
Instalación de tuberías de unión tanques (Aproximado)	1	5000	5000
Autoclave	1	547.81	547.81
Instrumentos varios (Pipetas, matraces, básculas)	1	1000	1000
Bomba serpentín (10 L/min)	2	80.49	160.98
Intercambiador de serpentín	2	18.05	36.1
Bomba hidráulica (100 L/min)	8	194	1552
Total presupuesto de inversión (€)		81145.575	

Tabla 21. Presupuesto de inversión (€)

De esta forma, el presupuesto de inversión total es el siguiente:

$$\text{Presupuesto de inversión} = \mathbf{81145.58 \text{ €}}$$

Este presupuesto es el que habrá que desembolsar para iniciar las actividades. Se van a detallar mas o menos algunos de los precios más característicos de este presupuesto:

En primer lugar, el fermentador donde tiene lugar el proceso, se ha debido de buscar un fermentador el cual tuviera sistema de aireado y agitación, pues estos dos parámetros son claves para llevar a cabo el proceso en las condiciones óptimas. Además, era necesario que el fermentador tuviera un monitoreo de la temperatura y un control de *pH*, espumas... El propio fermentador, contiene varios controladores *PID* para el control de diversos factores como el *pH*. También tiene uno para el control de la temperatura, el cual variará el caudal del intercambiador en función de la necesidad de enfriar más o menos el medio. En el precio se incluye también un turbidistato aplicado al fermentador, el cual se encargará de ir monitorizando si el proceso está produciendo el producto como debería o si hay algún problema. Las dimensiones de este fermentador están sujetas a petición, por lo que se pedirá con las especificaciones calculadas anteriormente.

Para el crecimiento del microorganismo, como es un volumen muy reducido, se ha optado por matraces Erlenmeyer de 2 litros siendo calentados y agitados por un agitador calefactado.

Los tanques para la hidrólisis ácida deberán ser tanques cónicos calefactados. Cónicos para al precipitar las pieles de naranja después del proceso que sea fácil eliminarlas del medio y calefactado para mantener la temperatura en 120 grados, la óptima para el proceso de hidrólisis.

El tanque de lavado del ácido hialurónico será un tanque con una superficie de contacto lo más alta posible. Se busca esto ya que, a una mayor superficie de contacto, mas facilidad para evaporarse el etanol y más rapidez durante el proceso. Se ha escogido un tanque de 50 litros ya que no se ha encontrado nada más que se adecuara a lo que se buscaba de menos tamaño.

Los evaporadores servirán para 2 cosas en este proceso. La primera será evaporar una porción de agua para poder introducir la disolución sacada de la hidrólisis ácida en el fermentador principal. Y la segunda será recuperar parte del etanol para no gastar tanto en esta materia prima. Se consigue recuperar un 80% de etanol por ciclo, por lo que habrá que renovar solo el 20% restante cada vez.

El autoclave se utilizará para esterilizar el medio de cultivo.

5.2 Presupuesto de explotación

El presupuesto de explotación son los costes de lo que costará llevar a cabo el proceso. Tiene en cuenta factores como las materias primas, los empleados o incluso las amortizaciones. Se va a mantener el constante para el total de los 10 años a estudiar.

Los costes de las materias primas se detallan a continuación:

Materias primas			
Materia prima	kg/año	€/kg	Precio €/año
Piel de naranja	124847	0.05	6242.35
Extracto de levadura	1966	4.04	7942.64
Caseína de peptona	2182	22.425	48931.35
K ₂ HPO ₄	374	2.74	1024.76
MgCl ₂	74	0.10764	7.96536
NaCl	740	0.1	74
Glutamina	61	22.43	1368.23
Glutamato	89	0.41	36.49
Ácido oxálico	30	0.4933	14.799
H ₂ SO ₄	85000	0.17938	15247.3
NaOH	61000	0.08969	5471.09
Etanol	26476.97	0.28701	7599.15516
Streptococcus equi subsp. zooepidemicus	183	381	69723
THB	9.57	364	3483.48
Recipiente plastico envase (1 kg/ud)	1000	0.3244	324.4
Total presupuesto materias primas (€/año)			167491.0095

Tabla 22. Precio de las materias primas (€/año)

Como puede observarse las materias primas para 1 año de producción tendrán un coste de:

$$\text{Coste materias primas} \left(\frac{\text{€}}{\text{año}} \right) = 167491.01 \text{ €/año}$$

El coste del etanol es tan bajo a pesar de la cantidad utilizada debido a que solo se necesita renovar un 20% del utilizado para la purificación del ácido hialurónico, a parte del evaporado durante los lavados.

El microorganismo cada vez que se vaya a realizar un ciclo se compra una cepa de este. Las específicas condiciones de conservación hacen que conservarlo pueda suponer mayor coste que el propio coste de comprarlo cada vez, sin embargo sería interesante el estudio de este factor.

Los recipientes de plástico son los envases en los cual se va a vender el producto finalizado.

Todos los precios han sido sacados de catálogos en internet, algunos tendrán más precisión que otros debido a que algunos productos ofrecen intervalos de precios.

A continuación, se detallan los costes derivados de los sueldos de la plantilla de los trabajadores. Se contará con un total de 7 trabajadores, entre ingenieros y jefes de planta. Los sueldos se han obtenido de diversos estudios sobre sueldos medios en España:

Plantilla			
Personal	Número	Salario (€/año)	Total (€/año)
Jefe de planta	1	40000	40000
Ingenieros químicos	6	29500	177000
Total sueldos (€/año)	217000		

Tabla 23. Costes de los sueldos (€/año)

El total de sueldos al año será:

$$\text{Total de sueldos} \left(\frac{\text{€}}{\text{año}} \right) = 217000 \text{ €}$$

Se han supuesto 6 ingenieros, 2 por cada turno de 8 horas y 1 jefe de planta que supervise.

Seguidamente se desglosan los gastos energía y agua. Al ser grande, estos gastos supondrán un alto coste, sobre todo los gastos energéticos. Los datos de costes de energía y agua se han sacado de respectivas tarifas activas:

Energía									
Equipos	Unidades	kW/unidad	kW	h/ciclo	ciclos/año	h/año	kWh/año	Coste (€/kWh)	Coste (€/año)
Fermentador proceso (700 L)	2	65	130	24	183	4392	570960	0.1141	65146.536
Calefactor Tanque crecimiento microorganismo (2 L)	1	0.75	0.75	24	183	4392	3294	0.1141	375.8454
Tanque hidrólisis ácida (850 L)	2	70	140	2	183	366	51240	0.1141	5846.484
Evaporador	2	5	10	5	183	915	9150	0.1141	1044.015
Autoclave	1	2	2	0.5	183	91.5	183	0.1141	20.8803
Bomba serpentín (10 L/min)	2	0.042	0.084	24	183	4392	368.928	0.1141	42.0946848
Bomba hidráulica (100 L/min)	8	1.3	10.4	0.41	183	75.03	780.312	0.1141	89.0335992
Coste total energía (€/año)	72564.88898								

Tabla 24. Coste de la energía (€/año)

El coste total de la electricidad con una tarifa de 0.1141 €/kWh es de:

$$\text{Coste total electricidad} \left(\frac{\text{€}}{\text{año}} \right) = 72564.89 \text{ €/año}$$

La tarifa contratada corresponde a una tarifa de la empresa *Naturgy* la cual esta hecha para empresas que utilicen hasta 450 kW.

Los gastos de agua son los siguientes:

Agua							
Equipos	Unidades	L/unidad	L/Ciclo	ciclos/año	L/año	Coste (€/L)	Coste (€/Año)
Tanque hidrólisis ácida (850 L)	2	697.16	1394.32	183	255160.56	0.00166	423.5665296
Tanque crecimiento microorganismo (2 L)	1	1.42	1.42	183	259.86	0.00166	0.4313676
Intercambiador de calor de serpentín	2	17400	34800	183	6368400	0.00166	10571.544
Dilución etanol	1	4.385	4.385	183	802.455	0.00166	1.3320753
Coste total agua (€/año)	10996.87397						

Tabla 25. Coste de los litros de agua consumida (€/año)

El coste total del agua utilizada con una tarifa de 1.66 €/m³ obtenida del coste medio del suministro de agua en España es de:

$$\text{Coste total agua} \left(\frac{\text{€}}{\text{año}} \right) = 10966.87 \text{ €/año}$$

Una parte importante de la industria es el mantenimiento de la maquinaria y las infraestructuras, por seguridad y por evitar males mayores que sean irreparables y cuesten más dinero. Se explican los costes a continuación, suponiéndose como coste de mantenimiento de la maquinaria un 10% del total del coste de la maquinaria poniéndonos en uno de los casos más desfavorables. Los cálculos se muestran a continuación:

	% Presupuesto inversión	Total (€/año)
Coste mantenimiento maquinaria (€/año)	10	8114.5575

Tabla 26. Coste del mantenimiento de la maquinaria (€/año)

El coste total del mantenimiento de la maquinaria es de:

$$\text{Coste mantenimiento maquinaria} \left(\frac{\text{€}}{\text{año}} \right) = \mathbf{8114.56 \text{ €/año}}$$

Por último, se calculan las amortizaciones, es decir, cuanto se reserva cada año para recuperar la inversión inicial. La amortización por año se considera igual a la depreciación sufrida ese mismo año. Para mantener flujos de caja iguales todos los años se va a suponer el método de la depreciación lineal:

$$D = \frac{V_a}{n} \quad (48)$$

Donde V_a es la inversión inicial, n es el número de años de vida útil y D es la depreciación.

Las amortizaciones quedan:

Amortizaciones		
Equipos	Años	Depreciación (€/año)
Fermentador proceso (700 L)	10	4200
crecimiento microorganismo (2 L)	10	6.264
Agitador con calefacción microorganismo	10	25.8145
Tanque hidrólisis ácida (850 L)	10	711.79
Tanques para lavado con etanol (900 L)	10	901
Tanque lavado ácido hialurónico (15 L)	10	40
Evaporador	10	1400
Instalación de tuberías de union tanques (Aproximado)	10	500
Autoclave	10	54.781
Instrumentos varios (Pipetas, matraces, básculas)	10	100
Bomba serpentín (10L/min)	10	16.098
Intercambiador de serpentín	10	3.61
Bomba hidráulica (100 L/min)	10	155.2
Coste total amortizaciones (€/año)		8114.5575

Tabla 27. Coste total de las amortizaciones (€/año)

El total de coste de las amortizaciones es de:

$$\text{Coste total amortizaciones} \left(\frac{\text{€}}{\text{año}} \right) = \mathbf{8114.56 \text{ €/año}}$$

Finalmente, conociendo todos estos gastos, el presupuesto de explotación de la planta será la suma de todos los gastos:

$$\begin{aligned} \text{Presupuesto de explotación} \left(\frac{\text{€}}{\text{año}} \right) \\ &= 167491.01 + 217000 + 72564.89 + 10966.87 + 8114.56 + 8114.56 \\ &= \mathbf{484281.89 \text{ €/año}} \end{aligned}$$

Con esto, se resumen los presupuestos de inversión y de explotación que harán falta en los cálculos siguientes:

	Total (€/año)
Presupuesto de explotación	484281.89
Presupuesto de instalación	81145.58

Tabla 28. Presupuesto de explotación y de instalación

A continuación, se va a calcular el dinero que se va a ganar con las ventas del producto. En un principio se ha diseñado el proceso para generar 1 tonelada de ácido hialurónico al año, no obstante, como el proceso de purificación no es el más específico, solo se consigue una pureza del 80%, por lo que al final del proceso se tendrá:

$$\text{kg Ácido hialurónico (80\%)} = \frac{\text{Producción si fuese puro (kg)} \cdot 100}{\text{Pureza real}} \quad (49)$$

$$\text{kg Ácido hialurónico (80\%)} = \frac{1000 \cdot 100}{80} = 1250 \text{ kg de ácido hialurónico al 80\%}$$

Un ácido hialurónico al 100% de pureza o muy cercano, puede llegar a precios de entre 1000 y 2000 €/kg. No obstante, el proceso de purificación de ese 80% al 99.9% o incluso 100%, es lo que aumenta el precio exponencialmente. Es por esto que el precio al que se va a vender será de un poco menos de la mitad. Se han encontrado precios de mil euros el kilogramo de ácido hialurónico puro con mezcla de alto peso molecular y bajo peso molecular. Como el producido es de un alto peso molecular (Im, Song, Kang, & Kang, 2009), mantiene un poco el valor y se va a tomar que por cada kilogramo de ácido al 80% de pureza, se va a obtener 400€ lo que supone una pérdida del 60% de su valor. Se considera aceptable debido a que por una parte se le debe hacer un proceso de purificación más exhaustivo para conseguir llegar a porcentajes mas altos, pero por otro no pierde tanto valor debido a que un ácido hialurónico de alto peso molecular está bastante más codiciado por sus mejores propiedades cosméticas y médicas. El dinero obtenido con la venta del producto se muestra a continuación:

Producto		
kg Ácido hialurónico/año	€/kg	Total (€/año)
1250	400	500000

Tabla 29. Beneficios de la venta de ácido hialurónico (€/año)

Por lo que por la venta del ácido hialurónico se obtendrán 500000 €/año.

El flujo de caja entonces será la resta entre el dinero obtenido por la venta del ácido hialurónico y los costes de explotación:

$$\text{Flujo de caja} \left(\frac{\text{€}}{\text{año}} \right) = \text{Beneficios} - \text{Costes de explotación} \quad (50)$$

$$\text{Flujo de caja} \left(\frac{\text{€}}{\text{año}} \right) = 500000 - 484281.89 = \mathbf{15718.12 \text{ €/año}}$$

Se va a considerar constante para todos los años que dure la instalación, en este caso 10.

5.3 VAN

Se va a calcular el VAN de los años en los que dure el proceso. Para ello los datos que se van a sustituir son:

- D_0 el desembolso inicial, corresponde al presupuesto de instalación
- F corresponde al flujo de caja
- t corresponde al periodo de tiempo que toque, en este caso cada vez será un año
- k es el tipo de interés que se le va a exigir a la inversión. Antes se ha dicho que el TIR óptimo se encuentra entre un 5% y un 10%. Por lo que se va a buscar el caso más desfavorable de estos dos, un 5%.
- n corresponde al número de periodos, 10 en este caso

Sustituyendo:

$$VAN = -81145.58 + \frac{15718.12}{(1 + 0.05)^1} + \frac{15718.12}{(1 + 0.05)^2} + \frac{15718.12}{(1 + 0.05)^3} + \dots + \frac{15718.12}{(1 + 0.05)^{10}}$$

$$VAN = \mathbf{39379.89 \text{ €}}$$

Como el $VAN > 0$, se puede decir que la inversión generará beneficios.

5.4 TIR

Como se ha explicado antes, es la tasa de descuento que hará que los cobros y los pagos sean iguales, por lo que genera un *VAN* igual a 0. Para calcular el *TIR* se sustituirá en su fórmula:

- D_0 el desembolso inicial, corresponde al presupuesto de instalación
- F corresponde al flujo de caja
- t corresponde al periodo de tiempo que toque, en este caso cada vez será un año
- n corresponde al número de periodos, 10 en este caso

Sustituyendo:

$$0 = -81145.58 + \frac{15718.12}{(1 + TIR)^1} + \frac{15718.12}{(1 + TIR)^2} + \frac{15718.12}{(1 + TIR)^3} + \dots + \frac{15718.12}{(1 + TIR)^{10}}$$

Despejando:

$$TIR = 14.09 \%$$

El valor del *TIR* calculado expresa que la tasa de rendimiento que se ha obtenido, es mayor que la tasa de rentabilidad mínima que se le ha aplicado al *VAN* anteriormente, con lo que se puede deducir que el proyecto de inversión puede ser aceptado.

5.5 Pay-Back

Anteriormente se ha explicado que son los años que se tardará en recuperar la inversión inicial. Sustituyendo los valores del desembolso inicial y del flujo de caja se obtiene el valor del *payback*:

$$T = \frac{81145.58}{15718.12} = 5.16 \text{ años}$$

Redondeando el valor del *Pay – Back* se puede afirmar que el desembolso inicial se recuperará en unos 5 años de los 10 que se espera que dure la instalación.

6 Diseño de la planta

A continuación, se va a mostrar un diseño de la planta realizado en el simulador de procesos *ProMax*.

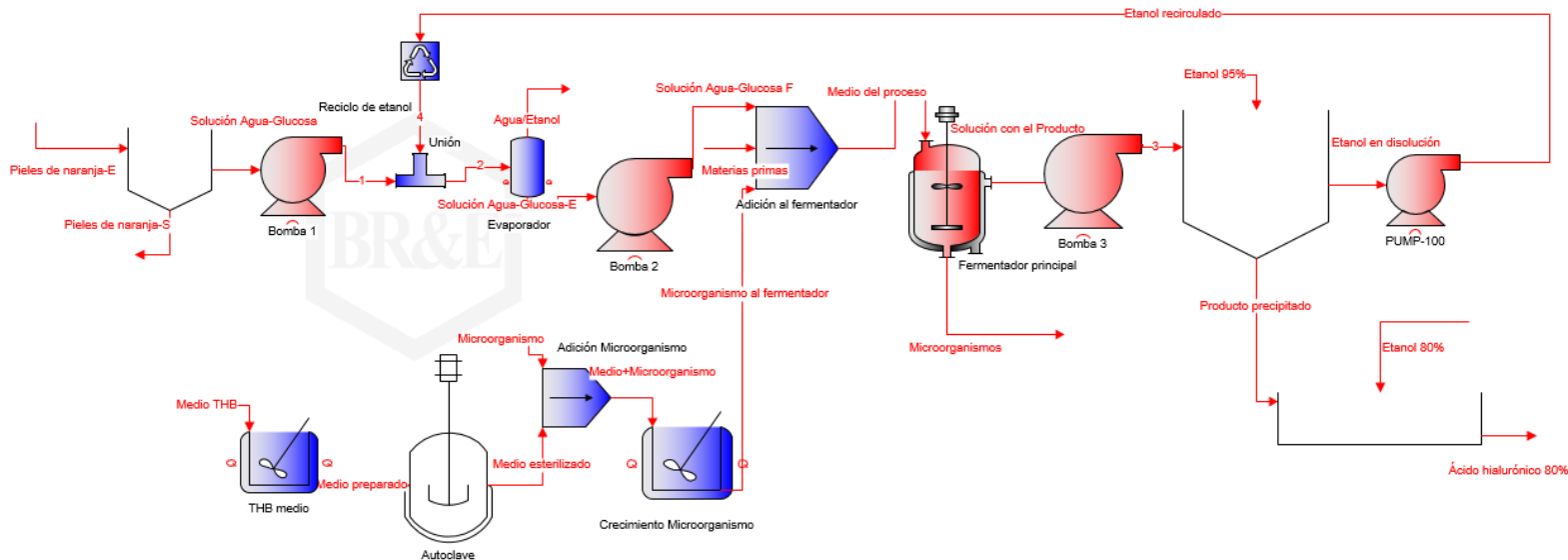


Ilustración 11. Diseño de la planta

En este diseño de la planta, se puede apreciar en la parte de abajo la preparación del medio de crecimiento del microorganismo, así como su adición a éste. Mientras tanto, tras unas horas de incubación del microorganismo en el medio de crecimiento, en paralelo se empezará el proceso de hidrólisis ácida de las pieles de naranja para obtener la solución de glucosa. La solución pasará por el evaporador para reducir el volumen de agua de la disolución y se introducirá junto el resto de las materias primas al fermentador. Cuando la temperatura de la disolución en el fermentador llegue a los 36 grados indicados para el microorganismo, se introducirá y se llevará a cabo el proceso. Finalizado el proceso, los microorganismos se extraerán por la parte de abajo y la disolución se introducirá al tanque cónico donde se le añadirá el etanol, provocando así la precipitación del ácido hialurónico. Esta línea superior que muestra todo el proceso en realidad serán 2, pero para que se vea mejor en la foto solo se ha puesto 1. Una vez precipitado el producto de ambos tanques, se decanta y se introduce en un tanque con un alto área de contacto para realizar un lavado con etanol y obtener el producto al final. El etanol utilizado en el paso anterior se recirculará al evaporador para su recuperación parcial y así ahorrar en materias primas.

7 Legislación y normativa

7.1 Legislación y Normas aplicables a la planta Industrial

RD 316/6001 de 17 de marzo: Fija las exigencias básicas de calidad de los edificios y sus instalaciones.

RD 2267/2004 de 3 de diciembre: Establece y define los requisitos que deben satisfacer y las condiciones que deben cumplir las instalaciones de uso industrial para seguridad en caso de incendio, prevenir su aparición y dar una respuesta adecuada en caso de aparición.

RD-427: Regula la **ventilación en naves industriales**. En él se explica que es necesaria una renovación de 30 m³/h por trabajador si no hay humos de tabaco. En caso de que existan problemas por humo, ya sea de tabaco o de la propia producción industrial, la renovación de aire sube a los 50 m³/h por trabajador. Bastante antiguo debido a que ya no está permitido fumar dentro de edificios.

RD 1826/2009 de 27 de noviembre: Reglamento de instalaciones térmicas en los edificios, en este caso oficinas, baños, etc.

RD 842/2002 de 2 de agosto: Regulación de las instalaciones de Baja Tensión, mediante la aprobación del *Reglamento electrotécnico para baja tensión y sus instrucciones técnicas complementarias (ITC)*.

- **ITC-BT-05:** Verificaciones e inspecciones.
- **ITC-BT-08:** Sistemas de conexión del neutro y de las masas en redes de distribución de energía eléctrica.
- **ITC-BT-10:** Previsión de cargas para suministros en baja tensión.
- **ITC-BT-11:** Redes de distribución de energía eléctrica.
- **ITC-BT-12:** Instalaciones de enlace. Esquemas.
- **ITC-BT-13:** Instalaciones de enlace. Cajas generales de protección.
- **ITC-BT-14:** Instalaciones de enlace. Línea general de alimentación.
- **ITC-BT-15:** Instalaciones de enlace. Derivaciones individuales.
- **ITC-BT-16:** Instalaciones de enlace. Contadores: ubicación y sistemas de instalación.

- **ITC-BT-17:** Instalaciones de enlace. Dispositivos generales e individuales de mando y protección. Interruptor de control de potencia.
- **ITC-BT-18:** Instalaciones de puesta a tierra.
- **ITC-BT-19:** Instalaciones interiores o receptoras. Prescripciones generales.
- **ITC-BT-20:** Instalaciones interiores o receptoras. Sistemas de instalación.
- **ITC-BT-21:** Instalaciones interiores o receptoras. Tubos y canales protectoras.
- **ITC-BT-22:** Instalaciones interiores o receptoras. Protección contra sobreintensidades.
- **ITC-BT-23:** Instalaciones interiores o receptoras. Protección contra sobretensiones.
- **ITC-BT-24:** Instalaciones interiores o receptoras. Protección contra contactos directos e indirectos.
- **ITC-BT-29:** Prescripciones particulares para las instalaciones eléctricas de los locales con riesgo de incendio o explosión.
- **ITC-BT-30:** Instalaciones en locales de características especiales.
- **ITC-BT-33:** Instalaciones con fines especiales. Máquinas de elevación y transporte.
- **ITC-BT-47:** Instalación de receptores. Motores.
- **ITC-BT-51:** Instalaciones de sistemas de automatización, gestión técnica de la energía y seguridad para viviendas y edificios.

Ley 31/1995 desarrollada mediante el **RD 171/2004 de 30 de enero:** Hace referencia a la prevención de Riesgos Laborales, en materia de coordinación de actividades empresariales.

RD 1618/1980 de 4 de julio: Reglamento de calefacción, climatización y agua caliente sanitaria.

UNE-EN-ISO 14001: Especifica los requisitos que debe seguir el sistema de gestión ambiental.

ISO 9001: Norma de sistemas de gestión de calidad.

ISO 14006: Hace referencia a la aplicación del ecodiseño. Sus objetivos son disminuir el impacto ambiental generado por las empresas durante el proceso productivo.

NFPA86: Regula los recintos a presión atmosférica para calentamiento de materiales o hornos.

Clase A: Calentamiento de materiales no combustible.

Real Decreto 1495/1986, de 26 de mayo: Reglamento de seguridad de las máquinas. Dirigido a prevenir los riesgos derivados de la utilización de maquinarias en los Centros de trabajo.

ISO TR 14062: Informe técnico que cubre las estrategias, organización, planificación, herramientas, diseño y desarrollo para la integración de aspectos ambientales en el diseño de productos y procesos.

ISO 50001: Busca mantener y mejorar un sistema de gestión cuyo propósito es el de permitirle una mejora continua de la eficiencia energética, la seguridad energética, la utilización de energía y el consumo energético con un enfoque sistemático.

7.2 Ficha da datos de seguridad (FDS) según los grados de NFPA

La *NFPA 704* es una norma que tiene su origen en los estados unidos que pretende establecer un grado de peligro a los materiales. Fue creado por la Asociación Nacional de Protección contra el Fuego, de ahí su nombre *NFPA*. Esta norma divide un rombo en 4 casillas, cada una de estas casillas tiene un color y un número o símbolo según su peligrosidad. Se muestra un ejemplo de esto en la Ilustración 12. Grados NFPA



Ilustración 12. Grados NFPA

A continuación, se detalla el significado de cada uno de los colores:

7.2.1 Azul/Salud

El color azul indica el nivel de peligro para la salud del compuesto. Según el número en su interior significará un nivel de peligro u otro. Los números pueden ir del 0 al 4:

- 0 significará que no supone ningún peligro en caso de que se inhalen o se ingieran en grandes cantidades.
- 1 significará que pueden causar algún tipo de daño, pero de nivel muy leve como pequeñas irritaciones.
- 2 significará que el contacto durante largos periodos de tiempo podría causar daños irreversibles sin un tratamiento especializado adecuado.
- 3 significará que el contacto, aunque sea durante cortos periodos de tiempo podría causar daños irreversibles a pesar recibir tratamiento especializado.
- 4 significará que una corta exposición puede causar daños mortales.

7.2.2 Rojo/Inflamabilidad

El color rojo indica el nivel de facilidad para inflamarse. Según el número en su interior significará un nivel de peligro u otro. Los números pueden ir del 0 al 4:

- 0 significará que no quemarán al sufrir una exposición a una temperatura de 94 °C.
- 1 significará que para que prenda debe precalentarse antes, con un punto de inflamabilidad mayor de 94 °C.
- 2 significará que debe calentarse o estar en presencia de una temperatura alta para que prenda. Tienen un punto de ignición de entre 38 y 94 °C
- 3 significará que, a condiciones estándar de temperatura, prenderán casi siempre. Tienen un punto de ignición de entre 23 y 38 °C

- 4 significará que, a condiciones estándar de temperatura se vaporizará a una alta velocidad. También puede indicar que se quema con relativa facilidad en presencia de aire.

7.2.3 Amarillo/Reactividad

El color amarillo indica el nivel de facilidad para reaccionar. Según el número en su interior significará un nivel de peligro u otro. Los números pueden ir del 0 al 4:

- 0 significará que tendrá una alta estabilidad aún bajo presencia de fuego. Además, no reaccionará con agua.
- 1 significará que de normal tiene una alta estabilidad menos en presencia de calor.
- 2 significará que puede a una alta temperatura y presión, reaccionará violentamente. Violenta reacción con agua.
- 3 significará que explotará en presencia de una llama o electricidad.
- 4 significará que explotará fácilmente en condiciones estándar.

7.2.4 Blanco / Peligros especiales

El color blanco indicará si el compuesto supone algún riesgo adicional según el símbolo que contenga esa casilla. Los símbolos són:

- ‘~~W~~’ significará una reacción violenta con el agua.
- ‘OX’ o ‘OXY’ significará que es un oxidante.
- ‘SA’ significará que es un gas que causará asfixia.
- ‘Bio’ significará que puede suponer un riesgo biológico.
- ‘CRYO’ o ‘CYL’ significará que es criogénico.
- ‘RAD’ significará que es radioactivo.

- ‘POI’ significará que es venenoso.
- ‘COR’ o ‘COOR’ significará que es corrosivo.

7.2.5 FDS según los grados de NFPA aplicados a los materiales del bioproceso y a la planta

En la *Tabla 30*. FDS según grados de NFPA de los compuestos del bioproceso, se muestran la ficha de seguridad de todos los materiales del proceso.

Materia prima	Peligro a la salud	Inflamabilidad	Reactividad	Peligros especiales
Piel de naranja	0	0	0	No
Extracto de levadura	0	0	0	No
Caseína de peptona	1	1	0	No
K ₂ HPO ₄	1	0	0	No
MgCl ₂	1	0	0	No
NaCl	1	0	0	No
Glutamina	0	0	0	No
Glutamato	1	0	0	No
Ácido oxálico	3	1	0	No
H ₂ SO ₄	3	0	2	W
NaOH	3	0	1	W
Etanol	2	3	0	No
THB	0	0	0	No
Agua	0	0	0	No
Ácido hialurónico	1	0	0	No

Tabla 30. FDS según grados de NFPA de los compuestos del bioproceso

A continuación, se muestra la tabla correspondiente a la planta en general. Cada valor es la media de todos los materiales. Si un valor no era exacto, se redondea al valor siguiente:

	Peligro a la salud	Inflamabilidad	Reactividad
Media del proceso	2	1	1

Tabla 31. FDS del proceso general

7.3 Peligrosidad del microorganismo según su nivel de bioseguridad

El nivel de bioseguridad consiste en un set de precauciones a la hora de almacenar agentes biológicos. Los niveles de bioseguridad van de 1 a 4, siendo 1 un valor que significa que se puede trabajar con seguridad con estos agentes ya que no causan ningún tipo de mal en los humanos sanos, y 4 un valor que se utiliza con agentes los cuales se pueden transmitir por el aire y podrían causar enfermedades muy graves para las que no hay cura, tratamientos o vacunas en humanos. El nivel de bioseguridad del microorganismo de trabajo es el siguiente:

	Nivel de bioseguridad
Streptococcus equi subsp. zooepidemicus	2

Tabla 32. Nivel de bioseguridad del microorganismo

El microorganismo tiene un nivel de bioseguridad 2. Esto significa que este microorganismo puede suponer una amenaza moderadamente peligrosa para la salud. Un laboratorio o empresa que trabaje con un microorganismo de nivel 2, deberá contar con equipamiento especializado para la protección de los trabajadores, como guantes y batas. Métodos de descontaminación como autoclaves, así como lavaojos.

8 Conclusiones

Para finalizar el trabajo, se podría concluir que, durante la realización de éste, se han trabajado las competencias:

- A partir de datos encontrados en artículos, libros, tablas y demás, se ha sido capaz de comparar, seleccionar y estudiar las condiciones, materias primas y equipos del proceso que se ha llevado a cabo.
- Se ha trabajado la aplicación de un escalado a un proceso de laboratorio, utilizando reglas de similitud geométrica, así como la regla de mantención del ratio de potencia entre volumen con el fin de poder extrapolar el proceso a una escala industrial.
- Se ha estudiado la posibilidad de utilizar como materia prima residuos agrícolas en sustitución de la glucosa directamente. Facilitando de esta forma un ahorro considerable de los costes de materias primas a lo largo del año de estudio.
- Se ha llevado a cabo el dimensionado de un intercambiador de calor para el fermentador principal con el de mantener constante la temperatura óptima del proceso.
- Se ha aplicado un método de purificación del ácido hialurónico al proceso, escalándolo a la escala del trabajo.
- Se ha llevado a cabo un análisis de los datos económicos del proceso, estimando su viabilidad mediante técnicas como el *VAN* y el *TIR*

En definitiva, en este trabajo final de grado se ha intentado llevar a cabo una integración de los conocimientos adquiridos durante todos los cursos del grado como son el estudio de bioproceso, diseño de intercambiadores o análisis de viabilidad económica de un proceso.

Con lo estudiado en este trabajo, se podría afirmar que resultaría rentable aplicar este proceso a una escala industrial, basándose en su rentabilidad. No obstante, los precios utilizados sobre todo en el equipamiento se deberán afinar más si se pretende aplicar con vistas a producir el producto industrialmente.

9 Bibliografía

- A. Selyanin, M., Ya. Boykov, P., & N. Khabarov, V. (2015). *Hyaluronic Acid. Preparation, properties, application in biology and medicine.*
- A. Vazquez, J., I. Montemayor, M., Fraguas, J., & A. Murado, M. (2010). Hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* in marine by-products media from mussel processing wastewaters and tuna peptone viscera. *Microbial cell factories.*
- Britania. (s.f.). *britannialab.com.*
- Brown, M., & Jones, S. (2005). Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. *European Academy of Dermatology and Venereology.*
- Chemik. (2012). *Significance of hyaluronic acid in cosmetic industry and aesthetic medicine.*
- Chen, S.-J., Chen, J.-L., Huang, W.-C., & Chen, H.-L. (2008). *Fermentation process development for hyaluronic acid production by Streptococcus zooepidemicus ATCC 39920.*
- Grand View Research. (2019). *Hyaluronic Acid Market Size Worth \$15.25 Billion By 2026 | CAGR 7.8%.* Grand View Research.
- Heinzle, E., Biwer, A., & Cooney, C. (2006). *Development of sustainable Bioprocesses. Modeling and assessment.*
- <https://www.tucursogratis.net/cuanto-gana-un-ingeniero-quimico-en-espana/>. (2019).
- Hui Sze, J., C. Brownlie, J., & A. Love, C. (2016). *Biotechnological production of hyaluronic acid: a mini review.*
- Im, J.-H., Song, J.-M., Kang, J.-H., & Kang, D.-J. (2009). Optimization of medium components for high-molecular-weight hyaluronic acid production by *Streptococcus* sp. ID9102 via a statistical approach. *J Ind Microbiol Biotechnol.*
- Lai, Z.-W., Abdul Rahim, R., Ariff, A., & Mohamad, R. (2011). Medium formulation and impeller design on the biosynthesis of high molecular weight hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. *African Journal of Microbiology Research.*
- Lawrence, R. W. (1998). Biotechnology in the Mining Industry. En *Biotechnology in the Mining Industry.*

- Morales de la Rosa, S. (2015). *HIDRÓLISIS ÁCIDA DE CELULOSA Y BIOMASA LIGNOCELULÓSICA ASISTIDA CON LÍQUIDOS IÓNICOS*.
- N. Collins, M. (2014). *Hyaluronic Acid for Biomedical and Pharmaceutical Applications* Editor:.
- Palaniraj, A., & Jayaraman, V. (2011). Production, recovery and applications of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*. *Journal of Food Engineering*, 12.
- Rivas, R., Mills, P., & D. Jones, K. (2013). A citrus waste-based biorefinery as a source of renewable energy: Technical advances and analysis of engineering challenges. *Research Gate*, 8.
- V. Goeddel, D., G. Kleid, D., Bolivar, F., L. Heyneker, H., G. Yansura, D., Crea, R., . . . D. Riggs, A. (1978). Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 5.
- Veeriah Jegatheesan, R. B. (2004). Advances in biological wastewater treatment. *Research Gate*, 12.