



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES

Grado en Ingeniería Química

Diseño de una planta para la producción de un biomaterial para aplicaciones médicas

Autor:

De la Fuente López, Erika

Tutores:

**Alonso Rodrigo, Matilde
González de la Torre, Israel
Departamento Química Analítica**

Valladolid, junio 2019.

*A mis padres, por hacerme
más fácil el camino para que
pudiera conseguir este
objetivo.*



RESUMEN

El presente trabajo de fin de grado consiste en el diseño de una planta industrial para la producción de biopolímeros precursores de un biomaterial para aplicaciones médicas mediante terapia celular.

El proceso consta de dos etapas fundamentales y consecutivas.

La primera etapa es una bioproducción con bacterias *Escherichia Coli* modificadas genéticamente por técnicas de ADN recombinante con su posterior purificación. El proceso se basa en biopolímeros ELR, polímeros basados en elastina, que tienen la particularidad de tener un comportamiento inteligente con la temperatura.

La segunda fase es la modificación de los biopolímeros haciéndoles reaccionar con grupos azida y ciclootino para que, posteriormente, ambos reaccionen por entrecruzamiento mediante “química click” en el momento de su aplicación médica.

La capacidad de la planta es de 750 gramos de biopolímero HRGD6 y 750 gramos biopolímero VKVx24 al año.

Es un proceso discontinuo alternándose la producción de cada polímero, por ello, se ha elaborado un diagrama Gant de las diferentes etapas del proceso de producción de cada polímero.

Se han calculado los parámetros de diseño de todos los equipos que intervienen, contando todos ellos con controladores de manera que la planta quedará automatizada.

El coste total de la planta asciende a una inversión inicial de 982.553,35 €. Se ha estudiado la rentabilidad y se ha fijado un precio de venta de 617,02€ gramo de polímero, teniendo una rentabilidad así del 28%. Se trata de un producto de alto valor añadido debido a sus aplicaciones biomédicas.

Contiene también un estudio de seguridad y salud, una evaluación del impacto ambiental y el correspondiente pliego de condiciones del proyecto a ejecutar.

Palabras clave: biopolímero, *Escherichia Coli*, planta industrial, ELRs, bioproducción.



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

ABSTRACT

This final project consists on the design of an industrial plant for the production of biopolymer precursors of a biomaterial for medical applications using cell therapy.

The process consists of two fundamental and consecutive phases.

The first stage is a bio-production with genetically modified through DNA recombinant techniques *Escherichia Coli* bacteria, with their later purification. The process is based on ELR biopolymers, polymers based on elastin, which have the peculiarity of having an intelligent behavior regarding temperature variations with temperature.

The second phase is the modification of biopolymers making them react with azide and cyclooctino groups so both subsequently react by cross-linking through "click chemistry" at the time of its medical application.

The plant capacity is of 750 grams/year of biopolymer HRGD6 and of 750 grams/year of biopolymer VKVx24.

This is a discontinuous process that alternates the production of each polymer, therefore, a Gant diagram of the different stages of the production process of each polymer has been drawn up.

The design parameters of all the equipment involved have been calculated, all of them counting with controllers so that the plant will be automated.

The total cost of the plant amounts to an initial investment of 982.553,35€. Profitability has been studied and a sale price of 617,02 € gram of polymer has been set, giving a 28% return . It is a product of high added value due to its biomedical applications.

This final project also contains a Safety System Analysis, an Environmental Impact study and the corresponding project´s technical specifications.

Keywords: biopolymer, *Escherichia Coli*, industrial plant, ELRs, bio-production.



ÍNDICE GENERAL

1	MEMORIA.....	9
2	ESTUDIO DE SEGURIDAD Y SALUD	87
3	IMPACTO AMBIENTAL	105
4	BALANCE ECONÓMICO	117
5	PLIEGO DE CONDICIONES	125
6	PLANOS.....	151

ANEXOS

ANEXO I: GANT DE PROCESO

ANEXO II: TABLA DE CORRIENTES

ANEXO III: CÁLCULOS DEL DISEÑO DE EQUIPOS

ANEXO IV: CÁLCULO DE DISEÑO ENERGÉTICO

ANEXO V: TUBERÍAS Y BOMBAS

ANEXO VI: GASTO ENERGÉTICO DE EQUIPOS

ANEXO VII: HOJAS DE SEGURIDAD

ANEXO VIII: PRESUPUESTO

ANEXO IX: CATÁLOGOS DE EQUIPOS

BIBLIOGRAFÍA



ÍNDICE COMPLETO

1	MEMORIA	9
1.1	OBJETIVO	11
1.2	INTRODUCCIÓN	13
1.2.1	Polímeros	13
1.2.2	Biopolímero	14
1.2.3	Tecnología recombinante y polímero tipo elastina	15
1.2.4	Química click para la formación de compuestos por entrecruzamiento	19
1.2.5	Biopolímero “VKVx24” y “HRGD6 ”	20
1.2.6	Aplicaciones de los ELRs.....	22
1.2.7	Bioproducción	26
1.3	BASES DE DISEÑO	28
1.3.1	Localización	28
1.3.2	Límites de batería.....	31
1.3.3	Especificaciones	32
1.4	PRODUCCIÓN A ESCALA DE LABORATORIO	33
1.4.1	FASE I: Proceso de fermentación	33
1.4.2	FASE II: Modificación del polímero	43
1.5	DESCRIPCIÓN DEL PROCESO A ESCALA INDUSTRIAL	45
1.5.1	Diagrama de bloques	45
1.5.2	Plan de proyecto	45
1.5.3	Descripción del proceso.....	48
1.5.4	Balance de materia y energía	55
1.6	EQUIPOS	63
1.6.1	Lista de equipos	63
1.6.2	Diseño de equipos.....	67
1.6.3	Distribución en planta	78
1.7	INSTRUMENTACIÓN Y CONTROL.....	79
1.7.1	Tanques.....	79
1.7.2	Fermentador	79
1.7.3	Intercambiador de calor.....	80



1.7.4	Centrifugadoras y tanque pulmón	80
1.7.5	Agitadores.....	80
1.7.6	Reactor.....	82
1.7.7	Torre de destilación	83
1.7.8	Lavado	83
2	ESTUDIO DE SEGURIDAD Y SALUD	87
2.1	INTRODUCCIÓN.....	89
2.2	LEGISLACIÓN	90
2.3	IDENTIFICACIÓN DE RIESGOS.....	92
2.3.1	Riesgo eléctrico	92
2.3.2	Riesgo por golpe de objetos proyectados	92
2.3.3	Riesgo relacionado con planta biotecnológica	92
2.4	SISTEMAS DE SEGURIDAD.....	93
2.4.1	Medidas de seguridad contra las fugas	93
2.4.2	Medidas contra incendios	93
2.4.3	Plan de emergencias	93
2.4.4	Equipos de protección personal.....	93
2.4.5	Medidas específicas de una planta biotecnológica	94
2.4.6	Mantenimiento y revisiones	96
2.5	HOJAS DE DATOS DE SEGURIDAD.....	98
2.6	HAZOP	98
3	IMPACTO AMBIENTAL	105
3.1	INTRODUCCIÓN.....	107
3.2	LEGISLACIÓN	108
3.3	EVALUACIÓN SIMPLIFICADA DEL IMPACTO AMBIENTAL.....	110
3.3.1	Consumo de energía y agua.....	111
3.3.2	Efluentes gaseosos.....	112
3.3.3	Efluentes líquidos.....	112
3.3.4	Contaminación acústica	113
3.3.5	Impacto visual	113
3.4	MEDIDAS CORRECTORAS	114
4	BALANCE ECONÓMICO	117



4.1	PRESUPUESTO	119
4.1.1	Costes total invertido	119
4.1.2	Costes variables anuales	119
4.1.3	Costes fijos anuales	120
4.1.4	Costes totales	120
4.2	ESTUDIO DE LA RENTABILIDAD.....	121
5	PLIEGO DE CONDICIONES.....	125
5.1	OBJETIVO	127
5.2	PLIEGO DE CONDICIONES GENERALES.....	128
5.2.1	Definiciones	128
5.2.2	Obras que se proyectan-disposiciones	129
5.2.3	Interpretación de las distintas partes del proyecto.....	129
5.2.4	Trabajos preparatorios	129
5.2.5	Obligaciones y responsabilidad del contratista.....	131
5.2.6	Personal y medios auxiliares	131
5.2.7	Recepción del material	131
5.2.8	Ejecución de las obras	132
5.2.9	Plazo de ejecución.....	132
5.2.10	Recepción provisional.....	132
5.2.11	Plazo de garantía	133
5.2.12	Recepción definitiva	133
5.2.13	Calidad de los materiales.....	133
5.2.14	Personal técnico.....	134
5.2.15	Libro de órdenes	134
5.3	PLIEGO DE PRESCRIPCIONES TÉCNICAS PARTICULARES.....	135
5.3.1	Normas de diseño utilizadas	135
5.3.2	Definiciones	135
5.3.3	Instalación mecánica	136
5.4	PLIEGO DE CONDICIONES LEGALES.....	146
5.4.1	Jurisdicción	146
5.4.2	Accidentes de trabajo.....	146
5.4.3	Pago de arbitrios.....	147



5.4.4	Causas de rescisión del contrato.....	147
5.5	PLIEGO DE CONDICIONES ECONÓMICAS.....	148
5.5.1	Garantías	148
5.5.2	Fianzas.....	148
5.5.3	Ejecución de los trabajos con carga a la fianza.....	148
5.5.4	Devolución de la fianza.....	148
5.5.5	Precios contradictorios	149
5.5.6	Reclamaciones de aumento de precios	149
5.5.7	Penalizaciones.....	150
6	PLANOS.....	151

ANEXOS

ANEXO I: GANT DE PROCESO

ANEXO II: TABLA DE CORRIENTES

ANEXO III: CÁLCULOS DEL DISEÑO DE EQUIPOS

ANEXO IV: CÁLCULO DE DISEÑO ENERGÉTICO

ANEXO V: TUBERÍAS Y BOMBAS

ANEXO VI: GASTO ENERGÉTICO DE EQUIPOS

ANEXO VII: HOJAS DE SEGURIDAD

ANEXO VIII: PRESUPUESTO

ANEXO IX: CATÁLOGOS DE EQUIPOS

BIBLIOGRAFÍA

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Plan de proyecto. Fuente: elaboración propia	46
Tabla 1.2. Cantidades de cultivo	55
Tabla 1.3. Cantidades medio TB	55
Tabla 1.4. Cantidades tampón de lavado.....	56
Tabla 1.5. Cantidades después del lavado	56
Tabla 1.6. Cantidades tampón de sonicación	56
Tabla 1.7 Cantidad de PMSF	56
Tabla 1.8. Cantidades final de purificación	57
Tabla 1.9.Necesidades de agua refrigerada U-100.....	58
Tabla 1.10. Reactivos de la fase de modificación	58
Tabla 1.11. Cantidad de masa que se obtiene de polímero modificado	59
Tabla 1.12. Balance de materia de purificación de la segunda fase	59
Tabla 1.13. Necesidades de agua refrigerada en U-200	60
Tabla 1.14. Cantidades en el lavado U-100.....	61
Tabla 1.15. Cantidades en el lavado U-200.....	62
Tabla 1.16. Nomenclatura de equipos	63
Tabla 1.17. Características principales del fermentador F-101	67
Tabla 1.18. Características principales del reactor R-101.....	68
Tabla 1.19. Características principales de todos los tanques del proceso	69
Tabla 1.20. Características referidas a los tanques de los agitadores.	71
Tabla 1.21. Características del sistema de agitación.....	72
Tabla 1.22. Peso molecular de los biopolímeros	74
Tabla 1.23. Características HE-101	75
Tabla 1.24. Abreviaturas presentes en nomenclatura de tuberías	77
Tabla 2.1. HAZOP fermentador F-101.....	99
Tabla 2.2. HAZOP torre de destilación T-101	101
Tabla 2.3. HAZOP intercambiador de calor HE-101.....	103
Tabla 3.1. Límites de emisión en industria. Fuente: Decreto 833/1975, de 6 de febrero, por el que se desarrolla la Ley 38/1972, de 22 de protección del ambiente atmosférico.	110
Tabla 3.2. Parámetros límite de vertidos en Boecillo. Fuente BoCyL.....	110
Tabla 3.3. Huella de carbono de los equipos de la planta. Fuente: elaboración propia.	111
Tabla 3.4. Consumo de agua de la planta.....	111
Tabla 3.5. Efluentes líquidos. Fuente: elaboración propia	112
Tabla 4.1. Costes fijos de la planta	119
Tabla 4.2. Costes indirectos de la planta	119
Tabla 4.3. Costes variables.....	120
Tabla 4.4. Coste anual en personal	120
Tabla 4.5. Inversión inicial	120
Tabla 4.6. Costes anuales	120

Tabla 4.7. Datos del balance económico en MM€.....	122
Tabla 4.8. Leyenda Tabla 26. Datos del balance económico en MM€.....	122
Tabla 4.9. VAN y TIR.....	123

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1-1. (a) Estructura lineal (b) estructura ramificada (c) estructura entrecruzada (d) estructura reticulada	14
Imagen 1-2. Esquema del diseño de la secuencia y producción de ELR [4] ..	17
Imagen 1-3. [7]	19
Imagen 1-4. Ejemplo de estructura layer by layer [10].....	23
Imagen 1-5. Esquema de islote trasplantado recubierto por los polímeros A y B. Fuente: elaboración propia	24
Imagen 1-6. Plano de parcelas del Parque Tecnológico de Boecillo. Fuente: ICE.....	28
Imagen 1-7. Vista satélite del territorio del parque Tecnológico de Boecillo ..	29
Imagen 1-8. Vista satélite de la localización del parque Tecnológico de Boecillo en la provincia de Valladolid.....	29
Imagen 1-9. Vista satélite de la situación del parque Tecnológico de Boecillo en el territorio nacional	29

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Climograma Boecillo. Fuente: Climate-Data.ORG	30
Gráfica 2. Diagrama de temperatura Boecillo. Fuente: Climate-Data.ORG.....	30
Gráfica 3. Variación con el tiempo del crecimiento bacteriano.	34

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1.1	36
Ecuación 1.2	37
Ecuación 1.3	59
Ecuación 4.1	121
Ecuación 4.2	121

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fuente: Elaboración propia.....	31
Figura 2. Protocolo de purificación HRGD6. Fuente: Laboratorio BIOFORGE	39
Figura 4. Protocolo purificación VKVx2. Fuente: Laboratorio BIOFORGE	40

1 MEMORIA



1. MEMORIA

1.1 OBJETIVO

El objetivo principal del presente proyecto es el diseño a escala industrial del proceso de producción de dos precursores de un biomaterial con aplicaciones médicas y más concretamente para su utilización en terapias celulares. Dicha producción se compone de dos etapas fundamentales y consecutivas.

En la primera se obtienen dos biopolímeros mediante un proceso biotecnológico, que actualmente se está realizando a escala de laboratorio por el grupo BIOFORGE de la Universidad de Valladolid. Dichos biopolímeros son biopolímeros recombinantes tipo elastina que se identifican como HRGD6 y VKVx24. En la segunda etapa, dichos polímeros, serán modificados químicamente para que en el momento de su aplicación clínica puedan dar lugar al hidrogel, por entrecruzamiento químico mediante una reacción tipo “química click”.

La planta tendrá una capacidad de producción de 1,5 kg/año de los biomateriales mencionados. Para ello se producen 750 g del polímero HRGD6 y 750 g del polímero VKVx24.

Simultáneamente a ambas fases, hay un proceso de lavado.

La planta por tanto constará de las siguientes unidades:

U-100: Planta de bioproducción.

U-200: Planta de modificación del biopolímero.

U-300: Planta de lavado de equipos.

Los objetivos derivados del principal son los siguientes:

- Elaboración de un plan de proyecto especificando el inicio y duración de las etapas para que se cumplan las especificaciones requeridas.
- Diseño y especificación de los equipos de proceso.
- Diseño y especificación del sistema de control.
- Realización de un análisis económico para evaluar la rentabilidad del proceso.
- Estudio de seguridad y salud.
- Evaluación del impacto ambiental.
- Pliego de condiciones



Universidad de Valladolid

1. MEMORIA



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



1. MEMORIA

1.2 INTRODUCCIÓN

1.2.1 Polímeros

Los polímeros son sustancias compuestas por moléculas que tienen una larga secuencia de una o más especies de átomos o grupos de átomos unidos entre sí por enlaces primarios, generalmente covalentes.

Las macromoléculas se forman mediante la repetición de monómeros a través de un proceso biotecnológico. [1]

Los polímeros pueden ser homopolímeros, si se forman a partir de un único tipo de monómero, o copolímeros, formados a partir de monómeros distintos.

Los polímeros se clasifican en:

A. Según su origen:

- Polímeros naturales: de origen animal o vegetal (algodón, seda, lana, caucho)
- Polímeros sintéticos: desarrollados por la investigación científica y la industria para competir con algunos polímeros naturales (siliconas, nylon, teflón, bakelita, melaminas, PVC, policarbonatos, etc.)

B. Según su estructura molecular:

- Polímeros lineales: Formados por largas cadenas de macromoléculas no ramificadas (polietileno, seda,..)
- Polímeros ramificados: la cadena principal está conectada lateralmente con otras cadenas.
- Polímeros entrecruzados: cadenas lineales adyacentes se unen transversalmente en varias posiciones mediante enlaces covalentes.
- Polímeros reticulados: tienen estructuras tridimensionales, formados por macromoléculas con cadenas y ramificaciones entrelazadas. (Baquelita, epoxy,..)
- Polímeros cíclicos: tienen forma de anillo, no presentan extremos de cadena.

1. MEMORIA

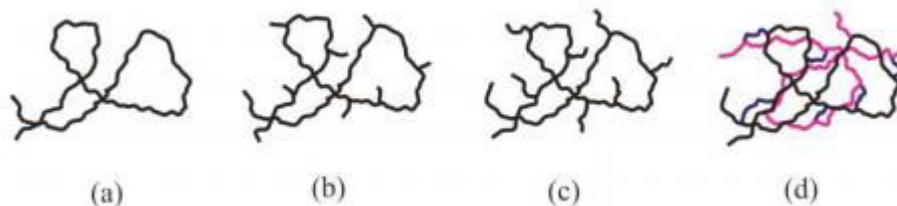


Imagen 1-1. (a) Estructura lineal (b) estructura ramificada (c) estructura entrecruzada (d) estructura reticulada

C. Según su respuesta térmica:

- Termoplásticos: son aquellos polímeros que a altas temperaturas se vuelve deformable o flexible y cuando se enfrían se vuelven a endurecer. Son polímeros lineales o ramificados.
- Elastómeros: tienen comportamiento elástico.
- Termoestables: son infusibles e insolubles debido a su estructura de cadenas entrecruzadas.

D. Según su mecanismo de formación:

- Adición: se forma por la unión sucesiva de monómeros que tienen uno o más enlaces dobles o triples.
- Condensación: se forma a partir de monómeros con grupos reactivos distintos que reaccionan liberando en cada unión una molécula de agua.

1.2.2 Biopolímero

Los biopolímeros son macromoléculas naturales presentes en los seres vivos o sintetizados simulando los anteriores. Característica reseñable de estos materiales es su alta biocompatibilidad con el ser vivo.

Los biopolímeros peptídicos sintéticos se pueden obtener a través de un proceso controlado y utilizando técnicas de ingeniería genética, por lo que suelen ser muy similares entre ellos, contienen secuencias idénticas y el mismo número de monómeros, lo que lleva a que tengan el mismo peso molecular. A este fenómeno se le conoce como distribución monodispersa. Los polímeros que tienen un comportamiento más aleatorio se le conoce como distribución polidispersa.

Los biopolímeros en aplicaciones biomédicas y farmacéuticas constituyen un campo de gran interés en el desarrollo de macromoléculas debido a su utilización en oftalmología, cardiología, ortopedia, como sustitutos de la piel y como sistemas de liberación de fármacos. [2]



1. MEMORIA

Los biomateriales poliméricos se pueden clasificar según el tiempo que deben mantener su funcionalidad cuando se aplican como implantes quirúrgicos:

- **Carácter permanente:** son biopolímeros cuya intención principal es funcionar como reemplazo total o parcial de órganos o tejidos destruidos como consecuencia de una enfermedad o trauma.
- **Carácter temporal:** son biopolímeros degradables que están diseñados para tener una duración específica, porque su funcionalidad así lo requiere, se utilizan en casos en los que el cuerpo humano desarrolla mecanismos de regeneración y curación para reparar el tejido o zona afectados. [2]

Los materiales utilizados en medicina deben ser materiales diseñados para mantener sus propiedades durante largos períodos de tiempo, por lo que se necesita que sean inertes. Debido a que se van a introducir dentro del organismo, también deben ser biocompatibles y atóxicos para disminuir el posible rechazo.

Algunos de los campos de la medicina en los que están más extendidas las aplicaciones de estos biomateriales son:

- **Oftalmología:** lentes intraoculares, lentes de contacto, implantes de retina.
- **Cardiovascular:** injertos vasculares, válvulas de corazón, marcapasos, bolsas de sangre.
- **Reconstrucciones:** prótesis de mama, nariz, barbilla, dientes.
- **Ortopedia:** caderas, rodillas, hombros.

1.2.3 Tecnología recombinante y polímero tipo elastina

El campo de la biomedicina se centra cada vez más en el desarrollo de nuevos enfoques para la creación de materiales y dispositivos que podrían actuar como sustitutos biológicos utilizando tecnología recombinante. Las características comunes necesarias para todos los materiales utilizados en biomedicina son biocompatibilidad, biodegradabilidad, características mecánicas adecuadas y técnicas de fabricación adecuadas. [3]

La particularidad más sorprendente de la **tecnología recombinante** es su potencial para igualar las características complejas de las proteínas naturales con las funcionalidades tecnológicas que no se encuentran en las estructuras naturales al permitir cambios específicos y altamente controlados en la secuencia de aminoácidos, lo que confiere características mecánicas y estructurales adecuadas al producto y la variación del comportamiento celular. Además, se pueden obtener nuevos polímeros basados en proteínas



1. MEMORIA

utilizando aminoácidos no naturales o favoreciendo el ensamblaje de nuevas secuencias peptídicas. [3]

La elastina es una proteína fibrosa e insoluble, clave de la matriz extracelular (ECM) de arterias, pulmones, piel y ligamentos que imparte elasticidad funcional a los tejidos y por ello es un material de gran interés en bioingeniería. [6] La elastina tiene la propiedad de poder recuperarse completamente después de miles de deformaciones elásticas sin perder sus propiedades mecánicas. [3]

Dentro de los polímeros tipo elastina se pueden encontrar dos nomenclaturas diferentes, ELP, polímero tipo elastina y ELR, polímero **recombinante** tipo elastina.

Los **ELPs** se refieren a polímeros obtenidos por estrategias sintéticas que requieren métodos químicos incluyendo el uso de diversos precursores y disolventes. La síntesis química de este tipo de polipéptidos basados en elastina se consigue mediante el uso de procesos químicos estándar. Pero estas técnicas dan problemas cuando se quieren sintetizar estructuras más complejas o polímeros más grandes ya que se obtienen mezclas de polímeros con diferentes pesos moleculares. El uso de tecnologías de ADN recombinante y la aparición de las siglas **ELR**, abrió la puerta a eliminar estos problemas con un mayor control sobre la estructura de los polímeros. Se trata de una perfecta técnica de clonación que se utiliza para diseñar la secuencia de genes que codifican los ELR. Esta técnica se basa en el uso de la restricción tipo IIs endonucleasa Eam1104I que permite la escisión del ADN fuera de la secuencia de reconocimiento y evita la introducción de nucleótidos extraños en la secuencia clonada. Este método fue utilizado por primera vez para la síntesis de los genes ELR, lo que sugiere que podría ser un sistema más rápido y eficiente para la bioproducción de polímeros de proteínas. [4]

Por lo tanto, los ELRs (“Elastin Like Recombinamers”), son polímeros de naturaleza proteica, es decir, polipéptidos artificiales cuya secuencia de aminoácidos está inspirada en aquellos que se encuentran en la elastina natural. La secuencia de aminoácidos de los ELRs comúnmente comprende repeticiones del pentapéptido (VPGXG), donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina.

Al ser producidos por ingeniería genética, se garantiza un control absoluto sobre la composición de los aminoácidos. Además, los grupos funcionales se pueden integrar en la secuencia repetitiva y de esta manera obtener las propiedades bioactivas deseadas. Los ELRs han demostrado mantener aspectos importantes de la elastina natural, como el comportamiento

1. MEMORIA

elástico, la citocompatibilidad, la naturaleza termosensible, su naturaleza hidrófoba y apolar y el comportamiento de transición inversa con cambios de temperatura. [5, 6]

El diseño de la secuencia de aminoácidos seleccionada que proporcionará las propiedades físicas requeridas de los ELRs, se lleva a cabo mediante la inserción en el plásmido de una cadena de ADN recombinante complementario al que se quiere obtener. A continuación, el plásmido se introduce en la bacteria mediante choque térmico. Se seleccionan las bacterias que contienen el plásmido con la ayuda de antibióticos y posteriormente se bioproducen a gran escala utilizando cepas de *Escherichia Coli*.

La síntesis de los genes ELR poliméricos correspondientes utilizando el método iterativo-recursivo asegura que la secuencia de polímero diseñada se obtenga durante la ligadura con un control extremadamente alto gracias a la tecnología unidireccional. [4]

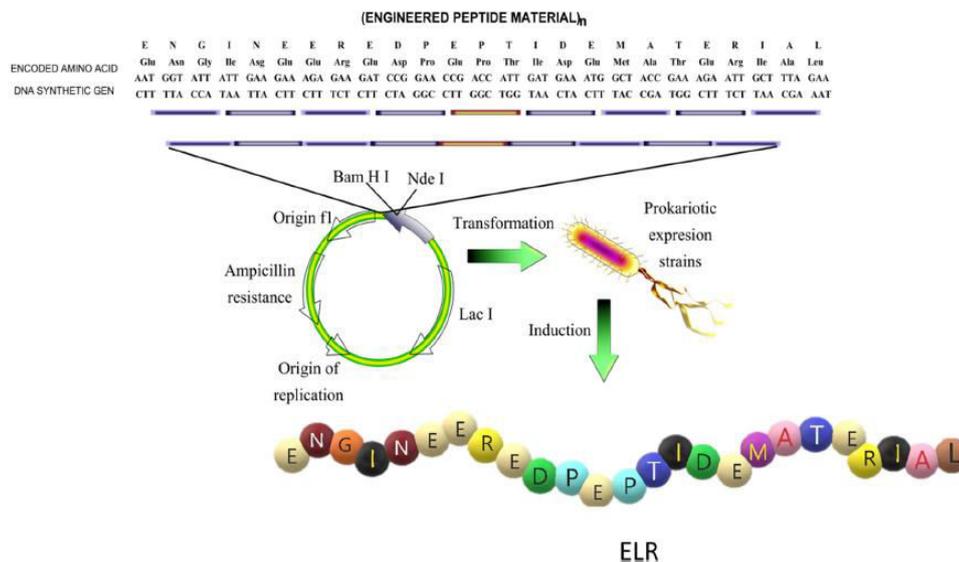


Fig. 6. Schematic representation of the design of the sequence and production of an elastin like recombinamer (ELR).

Imagen 1-2. Esquema del diseño de la secuencia y producción de ELR [4]

El diseño de los ELR tiene una influencia importante en su aplicación final, ya que se pueden incorporar diferentes bioactividades y funcionalidades químicas específicas en ubicaciones precisas a lo largo de la columna vertebral del polímero, permitiendo así que se sintonicen propiedades



1. MEMORIA

específicas, como la biocompatibilidad y las propiedades mecánicas. Por ello, se incorporan funcionalidades a la red troncal de los ELR en función de las aplicaciones finales deseadas. Quizás el motivo bioactivo más frecuente utilizado en este tipo de materiales es el tripéptido arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) que se identificó inicialmente en la fibronectina como una secuencia que media en la unión celular. [4]

La tecnología de ADN recombinante utilizada para la biosíntesis de ELR también permite la inclusión de péptidos o proteínas bioactivas que pueden mejorar la biocompatibilidad de este tipo de biomateriales, tales como dominios de adhesión celular que comprenden el tri-péptido Arg-Gly-Asp (RGD). [13]

El comportamiento de los ELR frente a la temperatura, dando lugar a un proceso reversible denominado transición inversa con la temperatura, es uno de los motivos por los que este tipo de materiales han despertado especial interés en la comunidad científica.

La elastina, al someterse al proceso de "transición inversa con la temperatura" se vuelve más ordenada a medida que aumenta la temperatura. Según investigaciones los aumentos de temperatura conducen a una disminución en el ordenamiento de la capa de solvatación acuosa, cambiando el balance energético para conducir al colapso hidrofóbico y una mayor ordenación del polímero. Esto se produce debido a que hay interacciones entre las proteínas y hace que la estructura se pliegue y expulse el agua.

Por lo tanto, el sistema ELR por debajo de la temperatura de transición permanece desordenado, las cadenas del polímero se encuentran en un estado de desorden conformacional en el que su cadena está relativamente extendida y completamente hidratadas. Por encima de la temperatura de transición (T_t) la cadena polimérica se pliega formando la espiral- β . Se distinguen dos fases, agua y polímero. Las moléculas de agua agrupadas alrededor de los aminoácidos hidrofóbicos son expulsadas al exterior, donde se encuentran la mayor parte de las moléculas de agua. Esto favorece un aumento de la entropía del disolvente.

1. MEMORIA

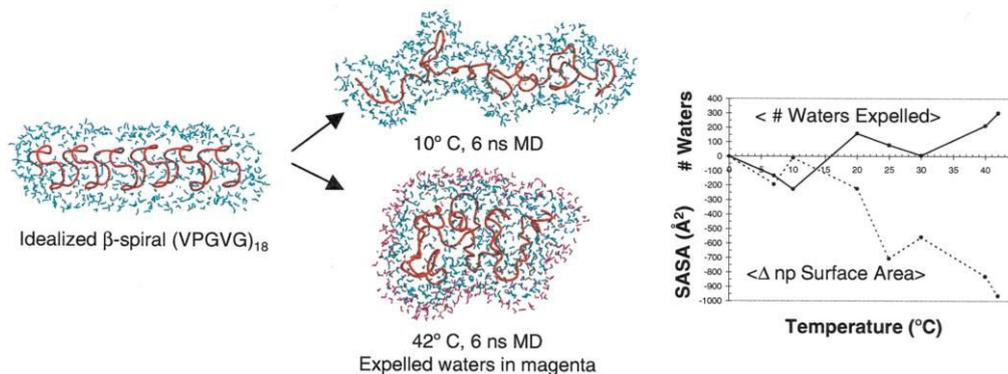


Imagen 1-3. [7]

El colapso hidrófobo y la expulsión de las moléculas de agua son responsables de la transición inversa de la temperatura de la elastina. En la Imagen 1-3. [7], la cadena principal de elastina se muestra en rojo. Las moléculas de agua asociadas a la elastina están en azul y las moléculas de agua expulsadas por el colapso están en magenta. El cambio promedio en el área de superficie accesible al disolvente y el número de moléculas de agua expulsadas en 6 ns se representan en función de la temperatura. Los valores donde empieza la estructura β -espiral se muestra a 0 °C. Las moléculas de agua expulsadas representan el cambio en el número de moléculas de agua en las celdas 1 y 2. [7]

Además, se puede cambiar también la temperatura de transición de un polímero mediante otros cambios físico-químicos, tales como un cambio en el pH, el cambio en el estado de oxidación de cadenas laterales o grupo funcional, la adición de sal, la adición de solutos orgánicos y la presión. [7]

La secuencia de aminoácidos tiene una influencia significativa en la temperatura de transición de los ELRs. Se ha comprobado que la sustitución del aminoácido de la cuarta posición (X) del pentámero modifica la Tt de manera que esta depende de la polaridad de la cadena lateral del aminoácido. Los aminoácidos hidrófobos disminuyen Tt y los aminoácidos hidrófilos la aumentan. De esta manera, la secuencia de ELR basada en (VPGXG)_n puede ser controlada y ajustada a la deseada al variar X. [8]

Esta propiedad permite desarrollar métodos de purificación fáciles que incluyen ciclos con temperaturas por encima y por debajo de Tt.

1.2.4 Química click para la formación de compuestos por entrecruzamiento

El uso de la “química click” consiste en un conjunto de reacciones a partir de reactivos con alto contenido en energía para la síntesis rápida de nuevos compuestos de interés biológico. Este método es fácil de realizar en solución



1. MEMORIA

acuosa bajo condiciones suaves y proporciona un alto rendimiento de la reacción. [9]

Esto ha permitido que esta reacción haya sido empleada también en el descubrimiento de fármacos, la bioconjugación con proteínas y ADN, marcaje de la superficie celular y modificaciones de la superficie con ELRs, entre otras moléculas. Sin embargo, esta reacción requería del uso de un metal de transición, Cu^+ , como catalizador, lo que genera problemas de citotoxicidad. Como mejora de la “química click” convencional se ha introducido el uso de grupos alquinos activados, como los derivados del ciclooctino, lo que ha permitido que estas reacciones se realicen sin la necesidad de un catalizador.

Antes de la reacción “click” se sintetizan los ELR modificados unos con azida y otros con ciclooctino. La reticulación covalente posterior se basa en la reacción entre estos grupos azida y ciclooctino, que tiene lugar en condiciones fisiológicas y sin la necesidad de un catalizador.

Las razones por las que se emplean azidas y terminales alquino para la modificación del biopolímero se deben a su estabilidad en sistemas biológicos y a la limitada formación de productos secundarios. [9]

El proceso de entrecruzamiento de dos biopolímeros, consta de las siguientes fases:

- a) Sustitución, en el biopolímero A, del grupo reactivo del aminoácido X en al menos tres de las repeticiones, de manera consecutiva o alternativa por un grupo seleccionado de entre: grupos alquenoilo, grupos alquino, grupos nitrilo o grupos carbonilo.
- b) Sustitución, en el biopolímero B, del grupo reactivo del aminoácido X en al menos tres de las repeticiones, consecutiva o alternativamente, por grupos azida; y
- c) entrecruzamiento de los biopolímeros obtenidos en las etapas (a) y (b) mediante “química click”. [5]

En el caso de este proyecto los polímeros utilizados son $A=VKVx24$ y $B=HRGD6$

1.2.5 Biopolímero “VKVx24” y “HRGD6”

Los biopolímeros VKVx24 y HRGD6 son los dos biopolímeros para los que se diseña la planta de producción en este TFG ya que van a formar mediante entrecruzamiento químico (reacción “química click”) un andamiaje que se caracteriza por ser biocompatible, biodegradable y capaz de resistir fuerzas de tensión y compresión.



1. MEMORIA

Secuencia de aminoácidos de **VKVx24**:

MESLLP VG VPGVG [VPGKG(VPGVG)₅]₂₃ VPGKG VPGVG VPGVG VPGVG VPGV.

Donde:

M=metionina, E=ácido glutámico, L=leucina, V=valina, P=prolina, G=glucina, K=lisina, A=alanina, T=treonina, S=serina, D=aspartato, I=isoleucina, R=arginina.

- Peso molecular: **60463 Da**
- Temperatura de transición inversa (ITT): 55°C con pH=7

El polímero VKV está compuesto por una secuencia de iniciación, MESLLP, y un bloque de repetición compuesto por dos tipos de secuencias, (VPGVG)₅, donde el residuo huésped es la Valina y se repite un total de 5 veces dentro del dominio de repetición y (VPGKG), en la cual el residuo huésped es la Lisina (K). El dominio de repetición se repite un total de 24 veces. El ELR-VKVx24 tiene una carga neta positiva.

Secuencia de aminoácidos de **HRGD6**:

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMESLLP
[(VPGIG)₂(VPGKG)(VPGIG)₂]₂AVTGRGDSPASS[(VPGIG)₂(VPGKG)(VPGIG)₂]₂.

Donde:

M=metionina, E=ácido glutámico, L=leucina, V=valina, P=prolina, G=glucina, K=lisina, A=alanina, T=treonina, S=serina, D=aspartato, I=isoleucina, R=arginina, H=histidina, R=arginina, T=treonina.

- Peso molecular **60661 Da**
- Temperatura de transición inversa (ITT): 35°C con pH=7

El polímero HRGD6 está compuesto por una secuencia de iniciación MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMESLLP, de interés para posibles purificaciones por cromatografía de afinidad o para posibles detecciones del polímero. Contiene un primer bloque que se repite, (VPGIG), donde la Valina ha sido sustituida por la Isoleucina (I), aminoácido hidrofóbico con el que se consigue la reducción de la temperatura de transición del biopolímero. El segundo bloque presente en el biopolímero es una variación del primero ya que contiene una Lisina (K) sustituyendo la Isoleucina (VPGKG). Con este aminoácido se consigue dotar al biopolímero de un grupo funcional que pueda ser usado en la modificación química post-traducciona del mismo. Por



1. MEMORIA

último, el tercer bloque (AVTGRGDSPASS) integra en su composición un dominio que conferirá la funcionalidad específica de adhesión celular, mediada por integrinas, a la matriz polimérica que genere el biopolímero.

1.2.6 Aplicaciones de los ELRs

1.2.6.1 Hidrogel para aplicación médica

Los hidrogeles son aquellos materiales poliméricos entrecruzados, de origen natural o sintético, en forma de red tridimensional que cuando entran en contacto con el agua se hinchan y forman compuestos elásticos, blandos, flexibles y que además retienen una cantidad significativa de esa misma estructura, pero sin disolverse. El componente acuoso puede variar en cantidad por evaporación o por cambios de temperatura.

La aplicación de estos materiales en el campo biomédico y en sistemas terapéuticos farmacéuticos conlleva la formación de una interfase con el sistema biológico, que requiere alta biocompatibilidad por parte del polímero, además de no ser citotóxico. (Rosero, 2003).

Para tener un control exacto de la estructura del hidrogel para que no tenga defectos que puedan dañar las propiedades mecánicas del material se han desarrollado hidrogeles reactivos basados en polipéptidos, incluidos los copolipéptidos de bloque, o copolipéptidos recombinantes flanqueados por bloques de doble espiral y segmentos recombinantes de elastina, seda y colágeno.[8]

Hay varios mecanismos de formación de hidrogeles ELR reticulados físicamente: [8]

- Reticulación a través de interacciones iónicas
- Autoensamblaje de bloques anfifílicos y copolímeros de injerto
- Interacción intermolecular de estructuras proteicas secundarias
- Formación de hidrogel por entrecruzamiento covalente

Los hidrogeles tienen diversas aplicaciones de las cuales destacan, su uso como soporte inyectable para aplicación en terapia celular y como sustancia liberadora de fármacos. Específicamente se usan hidrogeles generados “in situ”, en condiciones fisiológicas, por entrecruzamiento por ejemplo de dos biopolímeros tipo elastina (ELR) mediante “química click”. También son aplicables a la biocompatibilización y bioactivación de implantes sólidos mediante su recubrimiento. [5]

1. MEMORIA

1.2.6.2 Estructuras poliméricas capa a capa

Uso de ELRs para formar estructuras “layer by layer” (capa a capa) a partir de dos o más polímeros. La técnica consiste en la superposición de capas, alternándose polímeros distintos.

Esta técnica de recubrimiento es de especial utilidad por ejemplo como recubrimiento de implantes, mejorando su biocompatibilidad o para introducir en el dispositivo distintas biofuncionalidades de especial interés en medicina regenerativa o en “drug delivery” (liberación controlada de fármacos).

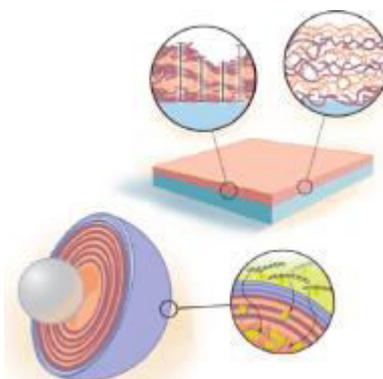


Imagen 1-4. Ejemplo de estructura layer by layer [10]

En los últimos años, se han previsto diferentes estrategias para el desarrollo de biomateriales sensibles a estímulos. Layer by-layer (LbL) es una técnica prometedora y versátil para modificar las superficies de los biomateriales, y ha permitido adaptar las interacciones con las células. Uno de las aplicaciones de esta técnica es la de construir recubrimientos biomiméticos que responden a los estímulos utilizando polímeros tipo elastina (ELR). La naturaleza recombinante de los ELR proporciona la capacidad de introducir secuencias bioactivas específicas y de ajustar sus propiedades fisicoquímicas, haciéndolas atractivas para aplicaciones biomédicas y biológicas. Mediante el uso de ELR complementarios utilizando “química click”, se pueden construir recubrimientos multicapa estabilizados por enlaces covalentes, resultantes de la cicloadición 1,3-dipolar de azidas y alquinos. [11]

Las interacciones intermoleculares se encuentran en la base de la metodología de LbL, y las fuerzas electrostáticas asumen un papel principal. La LbL típica se basa principalmente en la deposición de polielectrolitos con carga opuesta. Sin embargo, también pueden estar implicadas fuerzas no electrostáticas; Van der Waals, puentes de hidrógeno, la coordinación y los enlaces covalentes son algunos de ellos. [11]

1. MEMORIA

Es el caso de los dos biopolímeros que se van a producir en la planta diseñada en este proyecto, serán utilizados de esta manera y su función será la de cubrir el islote pancreático trasplantado en enfermos de diabetes.

El islote pancreático es una agrupación de células, muy vascularizado, aislado de los acinis por una membrana reticular, que es responsable de la secreción endocrina del páncreas. Está constituido por células α (productoras de glucagón), células β (productoras de insulina) y células δ (productoras de somatostatina). A través del recubrimiento debe ser posible el paso de nutrientes y sustancias de desecho y evitar que entren bacterias en el islote.

La diabetes tipo I es una enfermedad autoinmunitaria que se caracteriza por una falta de producción de insulina debido a la destrucción de islotes β -pancreáticos. Una alternativa a la aportación de insulina es el trasplante de dichos islotes. Pero es necesario que estén encapsulados dentro de recubrimientos funcionales hechos de sustancias poliméricas para que así este recubrimiento actúe como una barrera mecánica frente a las células inmunitarias pero permitiendo la difusión de los nutrientes y el agua. [12]



Imagen 1-5. Esquema de islote trasplantado recubierto por los polímeros A y B.
Fuente: elaboración propia

1.2.6.3 Fibras

A partir de polímeros recombinantes tipo elastina se pueden obtener fibras reticulares in situ durante el proceso de electrospinning, sin necesidad de ningún tratamiento adicional para estabilizarlas. Son completamente estables en condiciones in vitro.

Se han realizado estudios de inmunología e histología que demuestran que estas estructuras son citocompatibles por lo que se pueden usar para apósitos de heridas en aplicaciones de ingeniería de tejidos. [13]

Este tipo de materiales son de gran interés para fabricar estructuras a base de elastina para uso en ingeniería de tejidos de la piel.

En los últimos años se han desarrollado nuevos biomateriales y métodos de biofabricación dirigidos al desarrollo de estructuras para diferentes aplicaciones de ingeniería de tejidos. Por ejemplo para la regeneración de diferentes tejidos, como nervios, tendones, músculos, huesos y piel.



1. MEMORIA

La epidermis y la dermis están compuestas principalmente por queratinocitos y fibroblastos, respectivamente y la presencia de elastina es crucial para mantener las propiedades mecánicas y la elasticidad de estos tejidos.

El inicio de un proceso de cicatrización de una herida después de un traumatismo o daño en la piel conduce a un tejido cicatricial que restaura gradualmente la barrera de la piel durante un período de días, semanas o incluso meses, según la gravedad del daño. Pero la estructura de esta nueva piel no es la misma que la original. Por ejemplo, este tejido cicatricial carece de la elasticidad de la piel original, y la producción de colágeno durante el proceso de curación de la herida conduce a un tejido que es más rígido que su contraparte natural.

Estudios demuestran la posibilidad de formación de fibras basadas en ELR que se reticulan in situ utilizando una “reacción click” ortogonal entre grupos azida y ciclooctino presentes en dos moléculas ELR diferentes sin la necesidad de pasos adicionales de reticulación o postratamiento.

1.2.6.4 Dosificación de fármacos

Los ELRs se emplean como portadores de fármacos solubles para el tratamiento de diferentes enfermedades. Estos se encuentran encapsulados y una vez en el interior del cuerpo se liberan. [14]

El empleo de los biopolímeros en el control de la liberación busca la dosificación del fármaco a través de la matriz polimérica en flujos dentro de su ventana terapéutica, esto conlleva a la reducción de efectos adversos por fluctuación en las concentraciones plasmáticas del fármaco y la disminución del número de dosis necesarias del medicamento.

En este caso los biopolímeros son biodegradables y por tanto estarán de manera temporal en el organismo.

1.2.6.5 Purificación de proteínas

Los ELRs se pueden usar para superar muchos de los problemas asociados con la purificación a gran escala de proteínas recombinantes. Por ingeniería genética, la fusión a nivel genético de un ELR con una proteína recombinante imparte un comportamiento sensible al estímulo de la proteína de fusión. El proceso de purificación explota la coacervación asociada a los ELR y, por lo tanto, separa las proteínas de fusión ELR. La capacidad de respuesta al estímulo de las proteínas de fusión ELR proporciona una metodología simple y conveniente para la purificación de proteínas de otros componentes y proteínas celulares contaminantes presentes en el microorganismo productor que tiene muchas ventajas sobre las técnicas de cromatografía actuales utilizadas para aislar proteínas recombinantes.



1. MEMORIA

Las ventajas de este método son el bajo coste de la purificación, su simplicidad tecnológica y el alto rendimiento. [14]

1.2.7 Bioproducción

Para hablar de bioproducción antes hay que introducir los conceptos de biotecnología y bioingeniería.

La **biotecnología** es la tecnología aplicada a la utilización de los seres vivos o partes de éstos con fines prácticos o industriales, para obtener o modificar productos, mejorar plantas o animales, o para desarrollar usos determinados. Esto comprende los nuevos instrumentos biológicos que se han aplicado para la mejora de productos agrícolas, ganaderos o de fermentación.

La **bioingeniería** es una rama interdisciplinaria que integra los conocimientos químicos, biológicos y de ingeniería con el fin de solucionar diversos problemas a nivel de producción, salud y energía.

Se puede definir **bioproducción** como la producción a través de sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación de productos utilizando biotecnología y bioingeniería.

Este tipo de producción se lleva a cabo ampliamente en la industria farmacéutica, de alimentos, en la industria química, en el tratamiento de residuos y en aplicaciones biomédicas.

Este tipo de producción se realiza en biorreactores. Hay dos tipos: fermentadores microbianos y reactores enzimáticos.

En los fermentadores el crecimiento celular se promueve o mantiene para permitir la formación de productos tales como metabolitos, biomasa, sustratos transformados o solventes purificados a partir de microorganismos como levaduras, mohos y algunas clases de bacterias.

En los reactores enzimáticos, la transformación del sustrato se promueve sin el sistema de soporte vital de las células completas. Con frecuencia estos reactores emplean enzimas inmovilizadas donde se utilizan soportes sólidos o semisólidos para atrapar internamente o unir externamente el biocatalizador para que no se pierda como en los sistemas de "enzima libre" y se pueda reutilizar en un proceso. Prácticamente todas las reacciones bioquímicas de importancia tecnológica tienen que ver con un sistema heterogéneo que involucra una o más fases. [15]

El proceso de fermentación se produce a partir de microorganismos sumergidos en un medio de cultivo con condiciones ambientales óptimas que permitan el crecimiento bacteriano.



1. MEMORIA

La respiración de las bacterias es un proceso complejo que se acompaña del desprendimiento de energía que es indispensable para la síntesis de diferentes compuestos orgánicos. Según el tipo de respiración los microorganismos se dividen en: aerobios estrictos, microaerófilos, anaerobios facultativos y anaerobios estrictos.

En el proceso que se define en este proyecto se realiza una fermentación con bacterias *Escherichia Coli* modificadas genéticamente.

Estas bacterias son un representante típico de los anaerobios facultativos, la cual en los medios que contienen fuentes de carbono, se desarrolla como bacteria anaerobia al comienzo del proceso; desintegra los hidratos de carbono mediante la fermentación, para después comenzar a asimilar el oxígeno; crece como aerobia y oxida los productos de la fermentación hasta formar CO_2 y H_2O . Este tipo de microorganismo posee importantes ventajas, puesto que puede vivir tanto en ausencia como en presencia de oxígeno. [16]

El producto deseado puede ser intracelular o extracelular. En el primer caso habrá que romper las células para poder sacar el producto. Esto es lo que pasa en el proceso de fermentación que se desarrolla en este proyecto, el biopolímero se forma dentro de las células dando lugar a cuerpos de inclusión.



1.3 BASES DE DISEÑO

1.3.1 Localización

1.3.1.1 Características

La planta para la producción de biopolímeros precursores de un biomaterial para aplicación médica va a estar situada en el Parque Tecnológico de Boecillo.

Se considera un sitio idóneo para ello debido a que se trata de una zona de ambiente industrial y de investigación. Actualmente hay terrenos disponibles.

Además, el parque está dotado de una bioincubadora en la que se van poder realizar las operaciones propias de laboratorio que exige el proceso.

El Parque Tecnológico de Boecillo se localiza a 15 Km. de Valladolid, en el término municipal de Boecillo, comunicado por autovía, en la NVI (Madrid-Valladolid) p.k. 177.

Enclavado en el centro de un denso pinar de 350 hectáreas que se respeta en su totalidad, consiguiéndose un entorno medioambiental privilegiado.

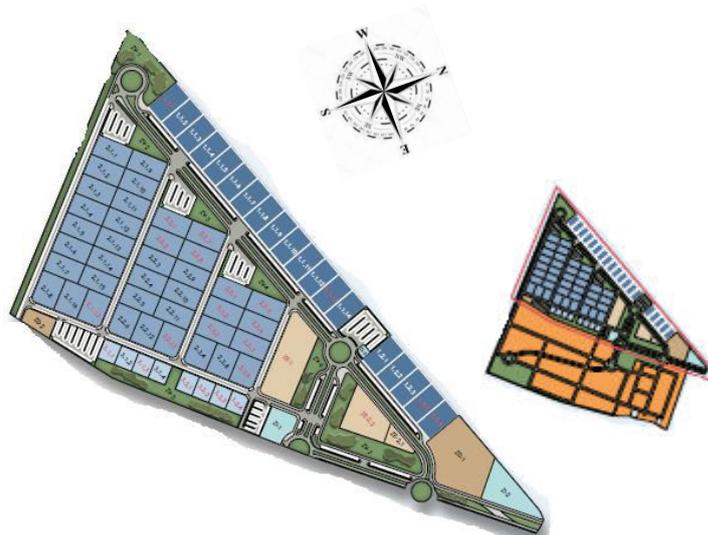


Imagen 1-6. Plano de parcelas del Parque Tecnológico de Boecillo.
Fuente: ICE

La parcela indicada consta de 2125,84m². Son muchos más de los necesarios para este proyecto por lo tanto, dicha parcela se podrá utilizar posteriormente para futuras ampliaciones u otros proyectos.

1. MEMORIA

1.3.1.2 Geografía



Imagen 1-9. Vista satélite de la situación del parque Tecnológico de Boecillo en el territorio nacional



Imagen 1-8. Vista satélite de la localización del parque Tecnológico de Boecillo en la provincia de Valladolid

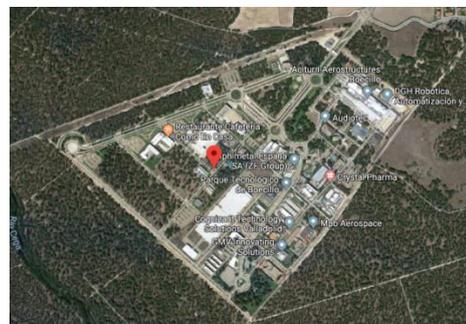


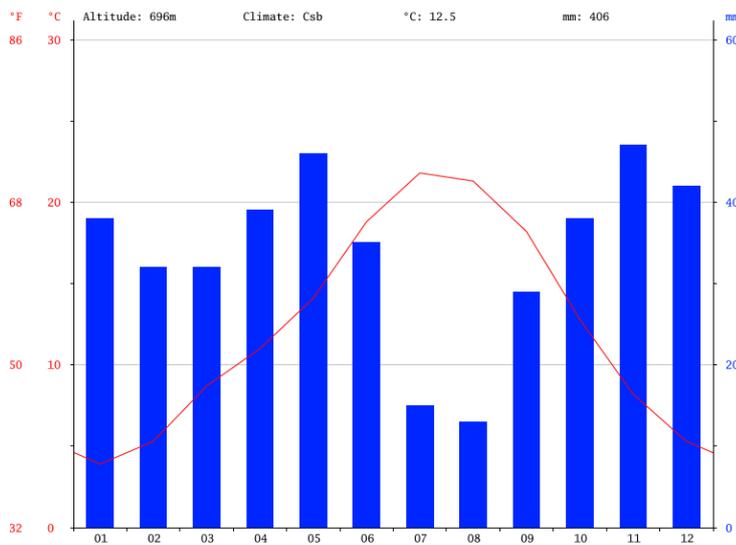
Imagen 1-7. Vista satélite del territorio del parque Tecnológico de Boecillo

1.3.1.3 Clima

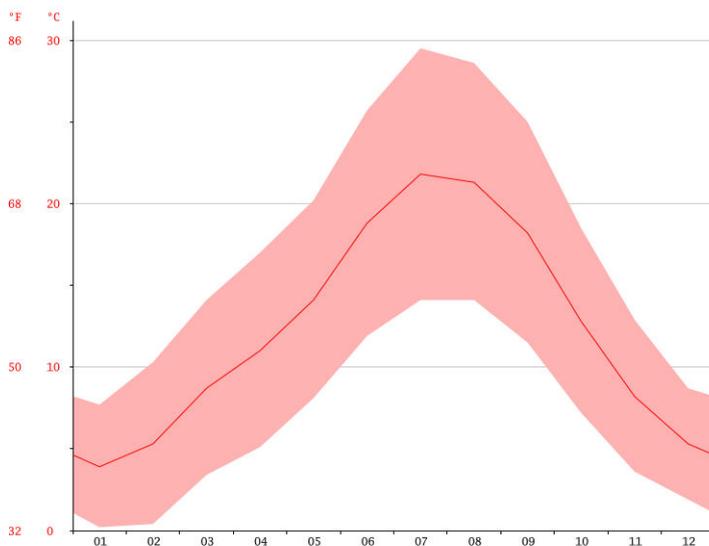
El clima en Boecillo es suave y templado, temperatura media anual 12,5°C. La lluvia cae sobre todo en invierno con relativamente poca lluvia en verano, la precipitación media anual es de 406mm.



1. MEMORIA



Gráfica 1. Climograma Boecillo. Fuente: Climate-Data.ORG



Gráfica 2. Diagrama de temperatura Boecillo. Fuente: Climate-Data.ORG

1. MEMORIA

1.3.2 Límites de batería

Los límites de batería se muestran en la Figura 1.

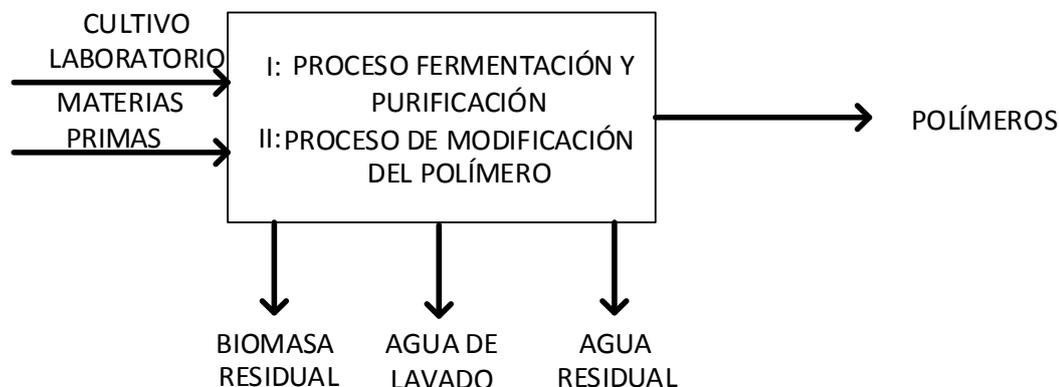


Figura 1. Fuente: Elaboración propia.

Lo que se va a diseñar en el presente proyecto consta de dos fases consecutivas. La primera es el proceso de fermentación y posterior purificación. Para la fermentación es necesario un cultivo de bacterias *Escherichia Coli* modificadas genéticamente que llegará ya preparado del laboratorio. La segunda fase es la modificación química del biopolímero, mediante una reacción con posterior purificación y así dejarlo preparado para que en su aplicación clínica, por entrecruzamiento, den lugar al biomaterial buscado.

En este proyecto se define hasta la producción del biopolímero modificado, las fases posteriores están fuera del alcance del proyecto. Las materias primas empleadas llegan preparadas a planta para ser transformadas.

El tratamiento de biomasa y agua residual generada durante todo el proceso está fuera del límite de batería de este proyecto, solamente se va a gestionar su salida de la planta.

El proyecto va a contar con:

- equipos necesarios para llevar a cabo el proceso
- unidades de almacenamiento de materias primas
- estaciones de carga y descarga
- unidades de almacenamiento del producto acabado
- sistema de control



1. MEMORIA

1.3.3 Especificaciones

Se requiere una producción de 1,5 kg/año total de los dos biomateriales mencionados, HRGD6 y VKVx24, por lo que serán 750 g/año de cada biopolímero.

Se parte de que el proceso será discontinuo, la fermentación se va a producir con un fermentador de 100L y ambos polímeros se van a producir en la misma línea, es decir, se va a contar con un solo fermentador. De esta manera la producción de cada uno de los polímeros se tiene que ir alternando.

El rendimiento de la primera fase del proceso es de 300mg de polímero por cada litro de cultivo.

La segunda fase hay que llevarla a cabo cuando se disponga de 80g de biopolímero.

El rendimiento en esta fase es del 95%.

Como máximo, el total de efectivos trabajando para el proceso al completo tiene que ser de 5 al año.

Para el diseño de los equipos y representación en los planos se utilizan los siguientes códigos de diseño:

- API 650: Welded Steel Tanks
- ANSI: American National Standard Institute.
- ASME B36.19M-2004: Stainless Steel Pipe
- ASME B36.10M-2004: Welded and Seamless Wrought Steel Pipe
- Norma UNE EN-ISO 10628
- ISA S5.1



1. MEMORIA

1.4 PRODUCCIÓN A ESCALA DE LABORATORIO

1.4.1 FASE I: Proceso de fermentación

1.4.1.1 Siembra de la placa

Se utiliza una cepa de *Escherichia Coli* modificada genéticamente en el laboratorio por el grupo BIOFORGE. A la bacteria se le ha insertado un plásmido que contiene el gen que codifica el biopolímero.

Depende del polímero que se vaya a sintetizar, HRGD6 o VKV, dicha modificación será diferente.

La siembra bacteriana se realiza sobre una placa Petri usando un asa de platino. Sobre la placa se prepara una solución de LB con 1% de glucosa y 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de antibiótico. Se deja que gelifique y seguidamente se calienta.

La ampicilina es un antibiótico cuya función es inhibir el crecimiento de todos los organismos excepto de la bacteria que tiene que crecer. La glucosa va a aportar los nutrientes suficientes para el crecimiento de dicha bacteria.

1.4.1.2 Cultivo del inóculo

Para el cultivo del inóculo hay que hacer un “screening”, esto permite seleccionar aquellas colonias cuya producción es máxima. Para ello, se hace un muestreo de ocho colonias al azar, las que están aisladas y las que son más grandes.

En 5ml de LB con ampicilina en una concentración de 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y 1% de glucosa se añade, pinchando con un palillo estéril, una colonia de las elegidas. Se repite esa acción para el resto de muestras escogidas colocándolas en distintos recipientes y se dejan en el agitador orbital 5h a 37°C y 250rpm.

Se analizan por electroforesis, la colonia que más haya crecido es la que se pone a producir.

Cuando la producción se hace en fermentador se prepara un subcultivo con los 5ml de suspensión celular en 100ml de LB, 1% de glucosa y 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de ampicilina y se deja creciendo en agitador orbital. El medio de cultivo consiste en medio TB.

Cuando se realiza en flask, por cada ml de medio de cultivo se inocula 1,75 μl de suspensión celular.



1. MEMORIA

A continuación, se detallan las características de los medios de cultivo nombrados anteriormente:

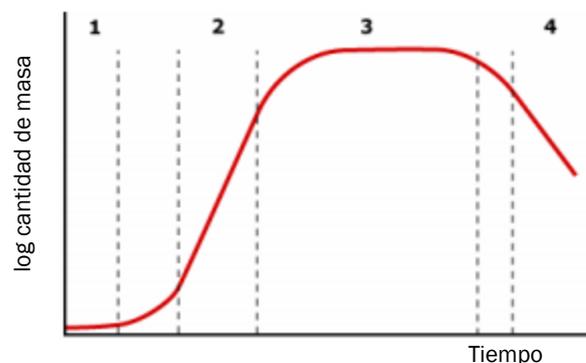
- Medio LB: es un medio utilizado para el crecimiento de las bacterias cuyas propiedades no fomentan la sobreexpresión de la proteína o polímero codificado en la bacteria. Se prepara disolviendo 25g de medio por litro de agua destilada, suplementado con glucosa al 1% y con un antibiótico adecuado, en este caso, Ampicilina en concentraciones de 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$.
- Medio TB: Este medio tiene la propiedad de fomentar la sobreexpresión de la proteína de interés, gracias a la presencia de lactosa. Se preparan 55.55 gramos de medio por litro de agua destilada en la que se disuelven: 8mL/L de glicerol y 100 $\mu\text{L}/\text{L}$ de antiespumante Antifoam 204 y 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (screening) o 0,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (producción) ampicilina.

Durante el proceso se trabaja con todo el material esterilizado. Para ello, una vez preparadas las disoluciones, se introduce el material y dichas disoluciones en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

1.4.1.3 Crecimiento bacteriano

Para analizar el crecimiento bacteriano se hace una espectroscopia de UV-Vis, midiendo de forma periódica la densidad óptica de la suspensión celular. Para ello se toma una muestra de 1mL de la suspensión celular bacteriana y se mide su absorbancia a 600nm en un espectrofotómetro. La turbidez de la suspensión va a ser proporcional a la cantidad de células presentes.

Para obtener el máximo crecimiento es necesario conocer las etapas que tienen lugar en el crecimiento. Dichas etapas se nombran a continuación:



Gráfica 3. Variación con el tiempo del crecimiento bacteriano.



1. MEMORIA

- A. **Fase de latencia:** se produce después de la inoculación. En ella no hay iniciación de replicación de ADN ni separación de nuevas células. Se produce la adaptación de los microorganismos al nuevo ambiente en que se encuentran las células inoculadas.
- B. **Fase de crecimiento exponencial o logarítmico:** las células se reproducen a la velocidad máxima que le permiten las condiciones existentes consumiendo los nutrientes del medio. Cada célula bacteriana se divide dando lugar a la formación de dos células hijas.
- C. **Fase estacionaria:** se alcanza cuando se agota un nutriente, o bien porque los productos de desecho que se han liberado durante la fase de crecimiento exponencial hacen que el medio sea inhóspito para el crecimiento microbiano o por la presencia de competidores u otras células que limiten su crecimiento. En este momento se detiene el crecimiento y la absorbancia es máxima. Esta va a ser diferente para cada cepa y colonia seleccionada, además de variar debido a diferentes factores como temperatura, pH, concentración de oxígeno disuelto, tasa de crecimiento de la bacteria entre otras.
- D. **Fase muerte o declinación:** Se produce muerte y lisis masiva (exponencial) del cultivo. Se debe al agotamiento de reservas de energía.

1.4.1.4 Producción del biopolímero

La producción se puede hacer de dos formas:

- A. Mediante **flask**, bajo condiciones no controladas a excepción de:
 - Temperatura=37°C
 - Agitación orbital=250rpm
- B. Mediante **fermentador**, bajo condiciones controladas
 - pH=7
 - Temperatura=37°C
 - Agitación=500rpm
 - Flujo de aire=3l/min
 - Concentración de oxígeno disuelto

Se va a explicar la producción en fermentador puesto que es la forma que se va a utilizar en este proyecto.

Se introducen en el fermentador 14L de medio TB esterilizado a los que se añade un 0,01% de antiespumante, 0,8% de glicerol y 0,05 mg/ml de antibiótico.



1. MEMORIA

A continuación, se auto esteriliza el fermentador mediante vapor por camisa a 121°C. Se ajusta la temperatura y el pH a los valores adecuados, se introduce una corriente de aire de 3 l/min de oxígeno y por último se introduce el inóculo, es decir, el litro de la solución de bacterias preparada anteriormente.

Se deja actuar durante 24h para que se produzca el crecimiento de las bacterias.

Pasado este tiempo, para conocer si ya ha llegado al punto máximo de producción, es necesario controlar el crecimiento celular del cultivo, el cual se lleva a cabo como ya se ha citado anteriormente mediante medidas regulares de la absorbancia del cultivo a $\lambda = 600\text{nm}$. Para la medida de la absorbancia hay que diluir la muestra para que se cumpla la Ley de Lamber-Beer:

$$A = \log \frac{I_0}{I} \cdot \epsilon \cdot c \cdot x$$

Ecuación 1.1

Siendo:

A = absorbancia

$\frac{I_0}{I}$ = transmitancia

ϵ = absortividad molar

c = concentración

x = espesor de la cubeta

Se toman tres muestras en un intervalo de tiempo de unos 15 minutos entre ellas. Si la absorbancia es la misma la fermentación se da por finalizada, en ese momento habrán dejado de crecer las bacterias y se estará ante la máxima producción. Si no son iguales y dicha absorbancia está aumentando se deja actuar más tiempo hasta que esta sea constante.

En este proceso con este tipo de cepa el polímero se produce dentro de las células. Pero no todas las bacterias producen polímero, puede tener la solución un valor de absorbancia elevado y que la producción final de polímero sea menor que en otra ocasión en la que la absorbancia tenía un valor menor.



1. MEMORIA

Como medida de control se pone un flask para producir en paralelo bajo condiciones no controladas para así comprobar problemas si no crecen las células.

1.4.1.5 Lavado de células

Una vez finalizada la etapa de producción se procede a vaciar el fermentador y al lavado de células. Para ello, lo primero que se hace es centrifugar a 6000rpm durante 15 minutos a 4°C y se decanta. La fase que sirve es la sólida, el polímero está dentro de las bacterias.

Se resuspende en tampón de lavado y se centrifuga a 3500rpm durante 15 minutos a 4°C. Importante que sea en frío para que no se rompan las células. Se suelen realizar 3 ciclos de lavado o hasta que el sobrenadante obtenido sea transparente.

Seguidamente se resuspende en tampón de sonicación. El volumen de tampón a utilizar viene determinado por la siguiente fórmula:

$$V_{ts} = 5 \cdot V_{lc} \cdot Abs$$

Ecuación 1.2

Siendo:

V_{ts} =volumen de tampón de sonicación

V_{lc} =volumen en litros de cultivo en el fermentador

Abs =absorbancia obtenida en la fase de producción

Se añade, además, con una concentración de 1µl/ml de tampón de sonicación, inhibidor de proteasas para evitar que se rompan las bacterias y con ello se elimine el polímero.

A continuación, se detalla la composición de los dos tampones nombrados en este apartado:

- Tampón de lavado de bacterias: 2,42g de Tris y 8,181g de NaCl por cada litro de agua bidestilada.
- Tampón de sonicación: 2,42g de Tris y 0,372g de EDTA por cada litro de agua bidestilada.



1. MEMORIA

1.4.1.6 Purificación

La disolución preparada se introduce en el disruptor y se somete así a una ruptura celular. Con este equipo, que trabaja a una presión de 1500 bares, se libera el contenido de las células, es decir, el polímero a partir de aquí se encuentra fuera de las bacterias, está liberado. Es importante que este proceso se realice en frío.

A continuación, se muestra un esquema de los protocolos de purificación de ambos polímeros aprovechando las propiedades físicas y la naturaleza inteligente del polímero mediante cambios en la temperatura y en el pH.



1. MEMORIA

HRGD6

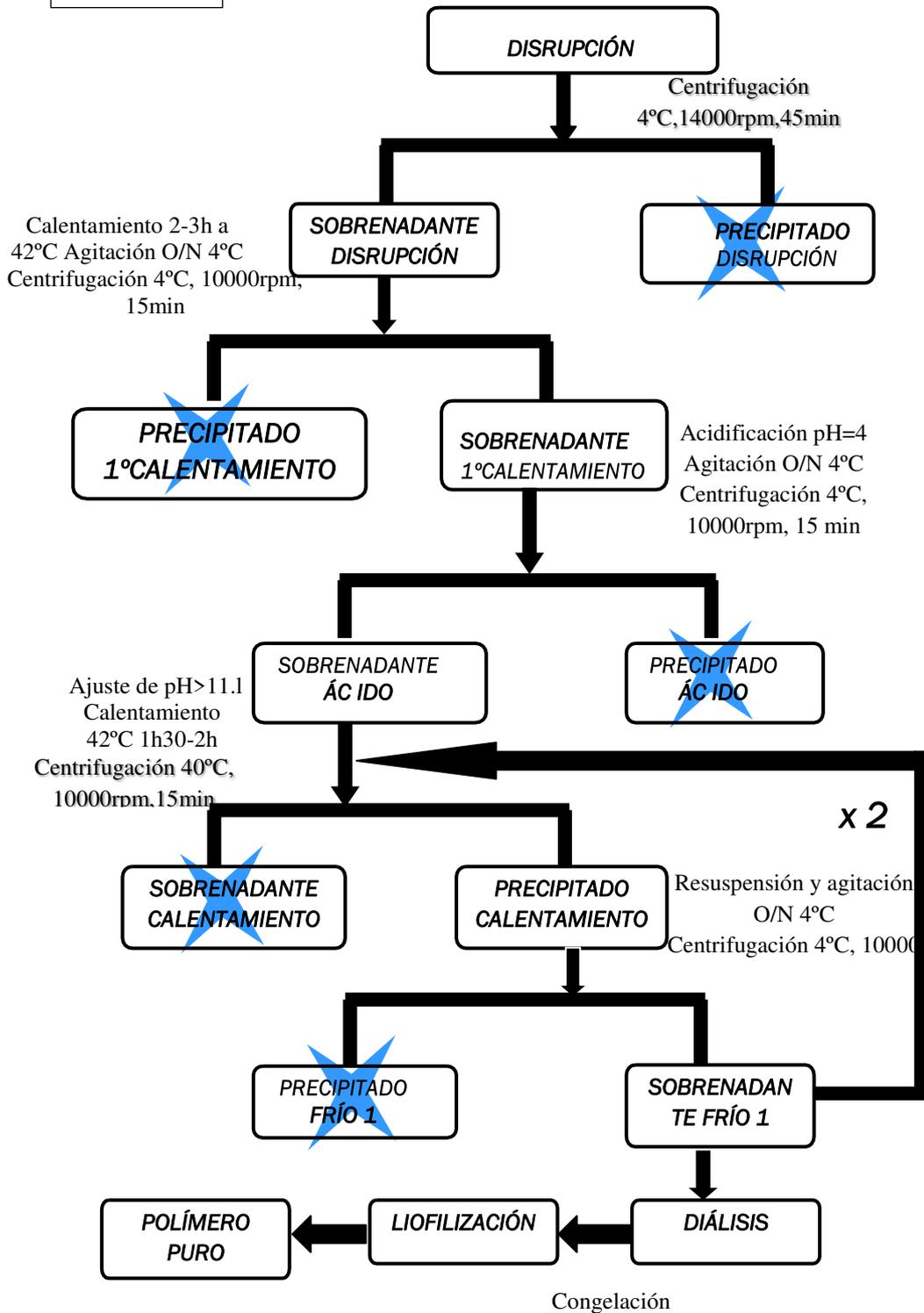


Figura 2. Protocolo de purificación HRGD6. Fuente: Laboratorio BIOFORGE

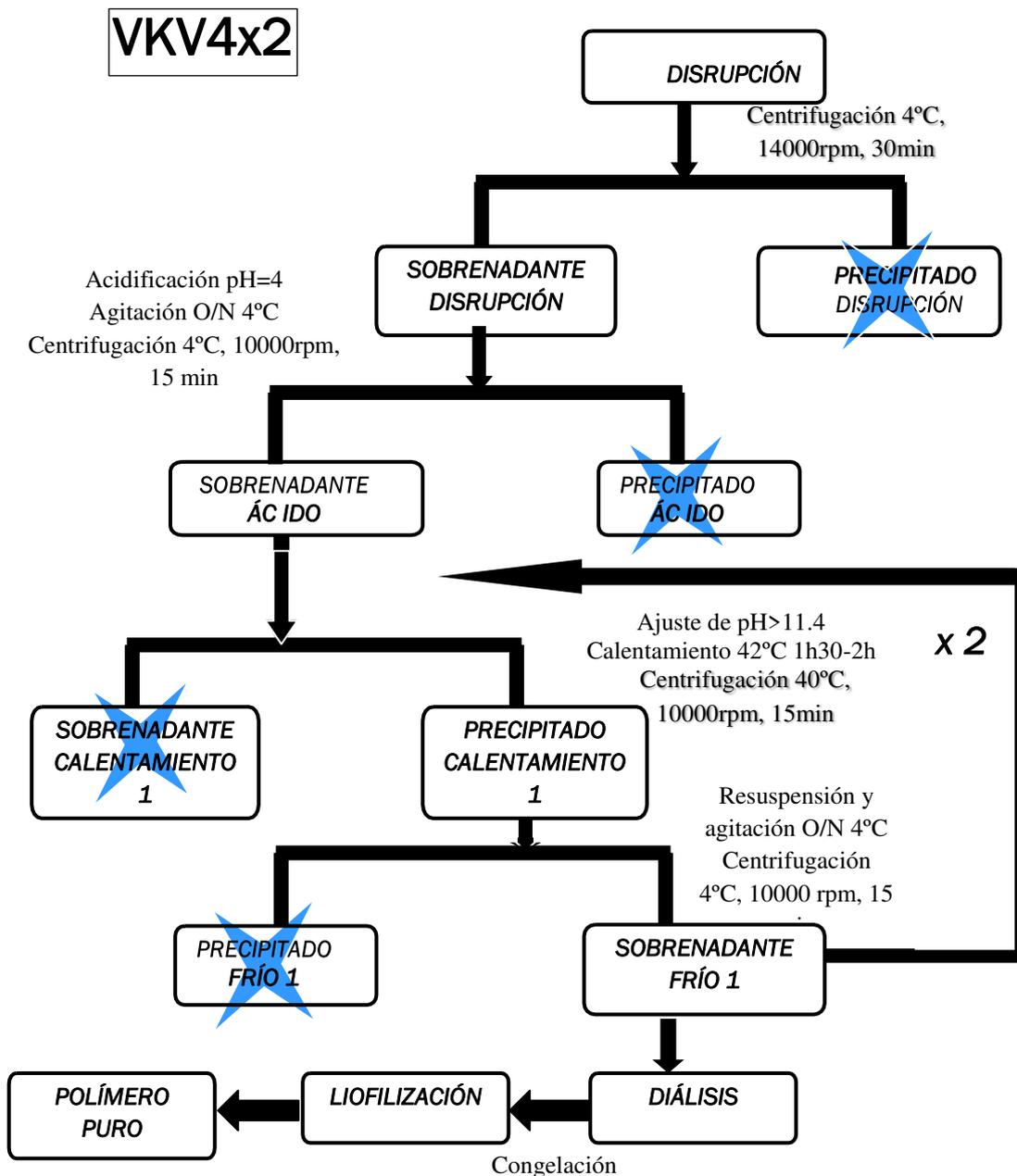


Figura 3. Protocolo purificación VKVx2. Fuente: Laboratorio BIOFORGE

- HRGD6

Tras la disrupción de las células la solución se somete a una centrifugación a 14000rpm, a 4°C durante 30 minutos. En este caso, como el polímero ya está liberado y debido a las propiedades de ELR ya comentadas anteriormente, el polímero se encuentra en la parte sobrenadante. De esta forma se consigue eliminar las proteínas desnaturalizadas que no presentan el comportamiento



1. MEMORIA

inteligente basado en su temperatura de transición inversa. A continuación, se procede a realizar un calentamiento a 42°C, con posterior agitación a 4°C durante toda la noche y luego centrifugación durante 15 minutos a 4°C a 10000rpm. Se desecha el precipitado y se añade al sobrenadante HCl para bajar el pH a 4. Se agita durante toda la noche a 4°C con posterior centrifugación también a 4°C, 10000rpm durante 15 minutos, tras esto, se retira el precipitado que estará compuesto en su mayoría por proteínas desnaturalizadas debido a la modificación del pH. A continuación, se aumenta el pH del sobrenadante resuspendiendo NaCl y se calienta a 42°C agitando durante 1h y 30 minutos con posterior centrifugación. En este caso hay que quedarse con el precipitado, el polímero se encuentra en la fase sólida. Se resuspende en agua bidestilada y se centrifuga otra vez a 4°C durante 15 minutos. Desde este punto se repite el proceso desde la fase en la que el sobrenadante es basificado.

Finalmente, el sobrenadante es sometido a una diálisis para eliminar las sales que queden junto al polímero. El polímero disuelto se introduce en una tripa de diálisis (el máximo tamaño molecular que permite pasar 10kDa) dentro de un bidón de 25 L lleno de agua bidestilada y con agitación. Mediante un proceso de ósmosis la disolución del polímero va perdiendo las sales. Se realizan 3 cambios del agua del bidón cada 24h.

Tras la diálisis, el polímero se congela y se somete a liofilización, proceso que consiste en introducir el polímero congelado en una cámara de vacío y de esta manera conseguir la separación del agua mediante sublimación hasta la obtención del polímero puro en estado sólido.

- VKVx24

El proceso de purificación de VKVx24 es similar a HRGD6, tiene una etapa menos.

Después de la disrupción de las células la solución se somete a una centrifugación a 14000rpm, a 4°C durante 30 minutos. Se desecha el precipitado y se añade al sobrenadante HCl para bajar el pH a 4 y se produzca así la precipitación de proteínas que no son de interés y conseguir separarlas del polímero que queda disuelto. Se agita durante toda la noche a 4°C con posterior centrifugación también a 4°C, 10000rpm durante 15 minutos. A continuación, se aumenta el pH del sobrenadante resuspendiendo NaCl y se calienta a 42°C agitando durante 1h y 30 minutos con posterior centrifugación. En este caso hay que quedarse con el precipitado, el polímero se encuentra en la fase sólida, debido a su comportamiento inteligente frente



1. MEMORIA

a la temperatura. Se resuspende en agua bidestilada y se centrifuga otra vez a 4°C durante 15 minutos. Desde este punto se repite el proceso desde la fase en la que el sobrenadante es basificado.

Finalmente, como en el caso anterior, el sobrenadante es sometido a una diálisis para eliminar las sales que queden junto al polímero.

Tras la diálisis, el polímero se congela y se somete a liofilización para obtener el polímero puro sólido.

En cada etapa del proceso de purificación se van tomando muestras para analizar electroforéticamente, tanto del sobrenadante como del precipitado, para poder comprobar cómo se va obteniendo un polímero más puro y verificar que la parte que desechamos en cada etapa no contiene polímero.

1.4.1.7 Esterilización de medios, soluciones y material

La esterilización de medios, soluciones y de todo el material de vidrio utilizado durante el proceso se esteriliza en un autoclave a 121°C y 1bar de presión.

El proceso dura una hora y media en la que hay tres fases:

- Calentamiento
- Esterilización
- Enfriamiento

El resto del material que se usa en el laboratorio se obtiene ya estéril.

1.4.1.8 Lavado del fermentador

El fermentador, tras ser usado, se sigue un procedimiento para lavarlo y dejarlo preparado para volver a usarse.

Para el fermentador de 15L el método de lavado es el siguiente:

- Se llena dos veces de agua de red
- Se llena con 160g de NaOH disueltos en agua y se deja actuar durante 30 minutos
- Se llena de agua para aclarar
- Se introducen 125ml de HNO₃+agua y se deja actuar durante 30 minutos
- Finalmente se aclara con agua destilada



1. MEMORIA

1.4.2 FASE II: Modificación del polímero

El polímero sólido puro obtenido en la FASE I tiene que ser sometido a una segunda fase para así obtener el polímero modificado. Esto se hace modificando los grupos amino mediante la introducción de grupos azido en el caso del polímero HRGD6 e introduciendo grupos ciclooctino en el caso del polímero VKVx24. De esta manera, se podrán utilizar ambos biopolímeros para obtener el hidrogel mediante “química click” según lo explicado en el apartado introducción.

1.4.2.1 Reacción

Se introduce el polímero en un reactor discontinuo y se deja 48h reaccionando a temperatura ambiente.

Para HRGD6:

- 41g de azida por cada 600g de polímero
- 1L de DMF en 20g de polímero

Para VKVx24:

- 52g de ciclooctino por 600g de polímero
- 2,5L de DMF en 20g de polímero

1.4.2.2 Lavado con disolvente

La solución obtenida se centrifuga durante 15 minutos y se obtiene HRGD6 modificado en el precipitado, el sobrenadante se desecha.

El polímero se lava con éter en un agitador durante 15 minutos y posteriormente se centrifuga, llevando el sobrenadante a una torre de destilación para recuperar el éter y el precipitado se somete a un segundo lavado, esta vez con acetona. Se centrifuga durante 15 minutos, el polímero que se encuentra en el precipitado se somete a vacío. El sobrenadante se lleva a la torre de destilación para recuperar la acetona.

1.4.2.3 Purificación

Tras 5 horas secándose a vacío se resuspende el polímero en agua bidestilada para llevarlo a un proceso de diálisis y así eliminar todas las sales que queden junto al polímero modificado.



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**

1. MEMORIA

Por último, se congela y se liofiliza para obtener el biopolímero modificado sólido puro.



1. MEMORIA

1.5 DESCRIPCIÓN DEL PROCESO A ESCALA INDUSTRIAL

1.5.1 Diagrama de bloques

En la primera fase el núcleo del proceso de producción es una **fermentación** a partir de un cultivo preparado en el laboratorio a partir de una cepa de *Escherichia Coli*. Posteriormente se **lava** con tampón de lavado y se rompen las células mediante **disrupción** para que el polímero se libere y salga del interior de las células. Una vez que el polímero ya está liberado se lleva a cabo en varias etapas la **purificación** utilizando como base la temperatura de transición inversa del polímero, quedando este unas veces en el sobrenadante y otras en la parte del precipitado. Finalmente se realiza una **diálisis** para eliminar mediante un mecanismo de transferencia de materia las posibles impurezas que queden en la disolución de polímero, se **congela** y se somete a **liofilización**.

La segunda fase consta de una **reacción** a temperatura ambiente para que el polímero que se ha obtenido en la primera fase quede modificado químicamente mediante la reacción con DMF y Azida en el caso de que sea VKVx24 y DMF y cicloctino en el caso de HRGD6. Se **lava** primero con éter y posteriormente después de centrifugarlo, se lava con acetona. Estos elementos se separan de los residuos del lavado mediante **destilación**. El polímero modificado se somete a **diálisis** para eliminar las impurezas que le queden, se **congela** y finalmente se **liofiliza**.

El diagrama de bloques se encuentra en el apartado PLANOS

1.5.2 Plan de proyecto

Para cumplir con las especificaciones de producción requeridas se ha diseñado un plan de proyecto resumido en la Tabla 1.1 realizado a partir de un diagrama de Gant que se puede consultar en el ANEXO I.

La tabla es un calendario de las semanas de un mes. Los recuadros en blanco indican el comienzo de producción del biopolímero VKVx24, los recuadros en verde son los días que hay que comenzar a producir el biopolímero HRGD6 y en naranja se indica el comienzo de la fase de modificación de los biopolímeros, da igual cuál de los dos sea primero. Hay que tener en cuenta que la fase de modificación de cada biopolímero no se comienza hasta que no se tengan 80g de uno de ellos.

El plan se ha construido considerando que el proceso de purificación de HRGD6 es más largo que el del VKVx24 y que el liofilizador solo tiene capacidad para lo que se produce en 3 ciclos de fermentación por lo que será



1. MEMORIA

un cuello de botella ya que, esta última etapa de ambas fases tiene una duración de 15 días y se ha querido optimizar para que solo hicieran falta dos liofilizadores, uno por cada unidad.

Tabla 1.1. Plan de proyecto. Fuente: elaboración propia

Sem.	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado	Domingo
1	1 VKV	2	3	4 HRGD 6	5	6	7
2	8 VKV	9	10	11 HRGD 6	12	13	14
3	15	16	17	18 HRGD 6	19	20	21
4	22 VKV	23	24	25	26 Modifi- cación	27	28
5	29 VKV	30	31	32 HRGD 6	33 Modifi- cación	34	35
6							

Como se puede observar en la Tabla 1.1, cada 4 semanas se hacen 3 fermentaciones de VKVx24 y 3 fermentaciones de HRGD6.

El año tiene 52 semanas de las cuales, 4 semanas son de vacaciones, por lo tanto, semanas de producción se tienen 48.

Las últimas 4 semanas del año se reservan para realizar el último ciclo de modificación del polímero con su correspondiente liofilización y así tener la producción prevista justo para el fin del año.

Por lo tanto, debido a esto, para el proceso de fermentación quedan 44 semanas.

44 semanas entre 4 semanas en el que se divide el proceso en conjunto, dan 11 ciclos en un año. Se hace así porque 4 semanas son las que se necesitan para obtener al menos 80g de cada polímero y así poder comenzar la segunda fase.

11 ciclos/año*3 fermentaciones*30g/fermentación=990g de cada polímero al año.



1. MEMORIA

Teniendo en cuenta que la fase II tiene una conversión del 95%.

$990g \cdot 0,95 = 940,5g$ de cada biopolímero modificado al año.

De esta manera se produce más cantidad del objetivo establecido por lo que se podría suprimir alguna fermentación por posible falta de capacidad en el liofilizador o por alguna otra causa.

Además, con 10 ciclos también se llegaría a la producción requerida. Luego hay un margen de error elevado o si se introduce una semana más de vacaciones o se requiere reservar alguna semana al final para la fase de modificación.

Asimismo, los procesos se han calculado manteniendo 15 días el producto en el liofilizador, que es el mínimo tiempo necesario, por lo que podría ser que se necesite algún día más.

Como ya se ha dicho va a haber dos liofilizadores, uno para la parte de fermentación y otro para la parte de modificación del biopolímero, de capacidad para la cantidad producida en 3 ciclos de fermentación. En las primeras semanas coinciden por un día 4 fermentaciones (ver gant ANEXO I). Esto se puede solucionar alargando la etapa de congelación y meterlo cuando haya espacio o usar el liofilizador reservado para la reacción en el caso de que a este le sobre espacio.

La reacción tiene que comenzar el viernes a última hora porque así se aprovecha el tiempo del fin de semana puesto que tiene que estar reaccionando durante 48 horas.

Para la realización del diagrama de Gant de proceso se ha elegido comenzar por la producción de VKVx24 porque al tener el proceso de purificación una etapa menos, coincide justo para que la etapa de liofilización comience el viernes.

La producción de HRGD6 se comienza el jueves para que, como se puede observar en el diagrama de Gant (ANEXO I), no se superpongan las etapas que se realizan en los mismos equipos de la producción de VKVx24, además coincide el fin de semana con la agitación de la solución a 4°C.



1.5.3 Descripción del proceso

1.5.3.1 FASE I: Proceso de fermentación

Se trata de un proceso discontinuo. En el apartado 1.5.2 se ha explicado cuándo debe iniciarse cada fase y se detalla la manera de trabajar para llegar a la producción requerida.

1.5.3.1.1 Preparación del inóculo

Se prepara el cultivo en el laboratorio de la misma manera que lo explicado en el apartado 1.4.1.1 y 1.4.1.2.

En este caso hay que hacer un segundo subcultivo hasta llegar a tener 4L de masa celular. Los 100 ml de masa celular anterior se disuelven en LB hasta tener 4L y se añade 1% de glucosa y 100 μ L/mL de ampicilina.

1.5.3.1.2 Producción

Lo primero que se hace es autoesterilizar las diferentes entradas al fermentador y el propio fermentador para eliminar los posibles contaminantes.

Se parte de un fermentador de 100L al que llegan 3 corrientes: cultivo K-101, aire y medio TB.

Los 4L de cultivo K-101 llega preparado del laboratorio, se introducen en el fermentador junto 94L de medio TB esterilizado a los que se añade un 0,01% de antiespumante, 0,8% de glicerol y 0,05 mg/ml de antibiótico.

Se justan las condiciones de trabajo óptimas para el crecimiento de la bacteria *Escherichia Coli*:

- pH=7
- Temperatura=37°C
- Agitación=500rpm
- Flujo de aire=3l/min

Se deja actuar durante 24h.

Antes de vaciar el fermentador se toman varias muestras espaciadas 15 minutos entre ellas y se mide la absorbancia de la misma manera que en el punto 1.4.1.3.

1.5.3.1.3 Lavado

Una vez comprobado que la absorbancia es constante se lleva la solución a centrifugar pasando antes por un intercambiador de calor (HE-101) para reducir su temperatura a unos 15°C.



1. MEMORIA

La centrifugación se hace a 4°C, en este caso como el polímero se encuentra dentro de las bacterias hay que quedarse con la parte del precipitado.

En el agitador de lavado (A-101), la masa celular se resuspende en 100L de tampón de lavado con una composición igual que la utilizada a escala de laboratorio. Se resuspende durante 2 horas manteniendo la mezcla en frío para evitar la ruptura de las células. Seguidamente, se lleva de nuevo a la centrifugadora C-101 durante 15 minutos a 4°C. Debajo de la centrifugadora hay un tanque de espera (LT-101) donde se almacena el precipitado hasta que todo es centrifugado. La centrifugadora continua hace descargas de precipitado cada 600 segundos. Se repite este proceso para que se laven bien las células.

El sobrenadante se envía al TK-109, donde se almacena toda la biomasa residual del proceso.

Después de lavar se añade al precipitado, en el mismo agitador del lavado, tampón de sonicación, también con la misma composición que el usado en el apartado 1.4. Se agita mientras se resuspende durante una hora manteniéndolo a 4°C. Pasado ese tiempo se hace pasar 3 veces por el disruptor para asegurarse de que se rompen bien las células. El disruptor trabaja a una presión de 1500 bares con un caudal de 9l/h a baja temperatura.

Antes de pasar a la siguiente fase se realiza una toma de muestra para ver si se han roto bien las células y si es necesario pasar una cuarta vez el caldo fermentado por el disruptor.

1.5.3.1.4 Purificación

Una vez extraído el contenido celular se lleva a cabo un proceso de purificación para separar los restos celulares y proteínas endógenas del polímero. Según que biopolímero sea el que se esté produciendo el proceso de purificación será distinto.

- HRGD6

El primer paso es centrifugar a 4°C en la centrifugadora C-102, en este caso, el polímero como ya está fuera de las células se va a encontrar en el sobrenadante debido a su comportamiento inteligente frente a la temperatura de transición. Se calienta a 42°C en HT-101 durante 1h y 30 minutos y posteriormente se lleva al agitador A-102 bombeado por P-112 a través de las corrientes 35 y 36 donde va a estar 16h a 4°C y finalmente centrifugar en C-102 a 4°C. Se desecha el precipitado (corriente 26) donde se encontrarán las sales que no son capaces de disolverse. El sobrenadante se vuelve a llevar al



1. MEMORIA

agitador A-102, esta vez a través de la corriente 31, allí se disminuye el pH a un valor de 4 añadiendo HCl, de esta manera, se produce la precipitación de proteínas que no son de interés y se consigue separarlas del polímero que queda disuelto. Se agita durante 16h y se centrifuga a 4°C. El sobrenadante es el que contiene el polímero, ahora en HT-101 se añade NaCl para subir el pH a 11, se calienta a 42°C y se envía a través de las corrientes 41 y 42 a la centrifugadora C-103. En este caso hay que quedarse con el precipitado que cae a LT-102, es ahí donde se encuentra el polímero ya que la centrifugación se ha hecho a una temperatura superior a la temperatura de transición inversa del polímero. Se resuspende en A-103 con 3,3 litros de agua bidestilada a baja temperatura y se deja agitando durante 16 horas a 4°C, se recircula a C-103, corriente 37, y se centrifuga a 4°C siendo de interés el sobrenadante. Desde este momento volvemos al punto en el que se añade NaCl para aumentar el pH llevando la solución a HT-101 a través de las corrientes 38, 39 y 40. Se repiten todos los pasos posteriores ya indicados. En los casos en los que la centrifugadora C-103 trabaja a 42°C, el sobrenadante se envía al TK-109 a través de las corrientes 38, 39 y 48. Esta vez la válvula está conmutada hacia la corriente 48.

Tras repetir los pasos indicados, el sobrenadante de la centrifugadora C-103 se somete a diálisis para eliminar las sales que queden junto al polímero. A partir de este momento y hasta el final, el proceso lo realiza el personal de laboratorio. El volumen de sobrenadante se reparte en matraces de diálisis de 250ml de volumen.

El proceso de diálisis dura 15 horas en las cuales el contenido de agua del tanque está agitándose para favorecer la transferencia de materia. Durante las 15 horas hay 3 cambios de agua del tanque de 100L, las dos primeras de agua destilada, corriente 50 y la tercera y última, agua bidestilada, corriente 5a.

Transcurrido este tiempo se extrae el contenido de los matraces y se somete a filtración (FT-101), proceso que dura 1h. Tras esto, se lleva al congelador (FZ-101) durante 8h a una temperatura de -20°C y se somete durante 15 días a liofilización (FD-101) para así eliminar definitivamente el agua que contenga el biopolímero y obtenerlo sólido puro.

- VKVx24

De la misma manera que para el otro biopolímero, después de la disrupción de las células se centrifuga a 4°C durante 15 minutos. En este caso el polímero como ya está fuera de las células se va a encontrar en el sobrenadante debido a su comportamiento inteligente frente a la temperatura



1. MEMORIA

de transición. En este caso el sobrenadante pasa directamente al agitador A-102, sin calentamiento previo, a través de las corrientes 25 y 31, para disminuir el pH a un valor de 4 añadiendo HCl, de esta manera, se produce la precipitación de proteínas que no son de interés y se consigue separarlas del polímero que queda disuelto. Se agita durante 16h y se bombea hacia la centrifugadora C-102 a través de P-113. Se centrifuga a 4°C durante 15 minutos. El sobrenadante es el que contiene el polímero, se lleva a HT-101 y se añade al igual que en el caso del biopolímero HRGD6, NaCl para subir el pH a 11, se calienta a 42°C durante 1h y 30 minutos y se lleva a la centrifugadora C-103 a través de las corrientes 41 y 42 donde se va a llevar a cabo la centrifugación a 42°C durante 15 minutos. En este caso hay que quedarse con el precipitado que cae a LT-102, es ahí donde se encuentra el polímero. Se resuspende en 3,3L de agua bidestilada a baja temperatura y se recircula a la centrifugadora C-103 trabajando a 4°C. Al igual que en el caso anterior, se vuelve al punto en el que se aumenta el pH en el tanque de calentamiento, a través de las corrientes 38, 39 y 40, repitiendo todos los pasos hasta ahora. Cuando C-103 trabaja a 42°C, el sobrenadante es masa residual que se envía a través de las corrientes 38, 39 y 48 al tanque de biomasa residual TK-109.

Tras repetir los pasos indicados, el sobrenadante de la centrifugadora C-103 se somete a diálisis para eliminar las sales que queden junto al polímero. A partir de este momento y hasta el final, el proceso lo realiza el personal de laboratorio. El volumen de sobrenadante se reparte en matraces de diálisis de 250ml de volumen.

Después de 15 horas en agitación, de la misma manera que en el caso anterior, se extrae el contenido de los matraces y se somete a filtración (FT-101), proceso que dura 1h. Tras esto, se lleva al congelador (FZ-101) durante 8h a una temperatura de -20°C y se somete a liofilización (FD-101) durante 15 días para así eliminar definitivamente el agua que contenga el biopolímero y obtenerlo sólido puro.

Durante todo el proceso de ambos biopolímeros todas las corrientes de residuos se conducen al tanque de biomasa TK-109, esas son 18, 26 y 48. La corriente 28 que llega al tanque TK-109, contiene HCl y su función es la de controlar el pH del tanque, al igual que el V-102, que contiene NaOH. En función del pH, se inyecta uno u otro en el tanque.

La corriente 48b solo funciona cuando el tanque está lleno.



1. MEMORIA

1.5.3.1.5 Refrigeración

Las corrientes de agua refrigerada están marcadas en el plano PFD 101 en azul.

El tanque TK-110 contiene agua a 1°C, desde él se distribuye por las diferentes corrientes hacia las camisas de los diferentes agitadores, el tanque de diálisis y el intercambiador de calor.

Esta agua se retorna al tanque, es un circuito cerrado. Cada rama del circuito funciona en instantes de tiempo diferentes, cuando el proceso lo requiere y esté funcionando el equipo que alimente dicha rama.

Los datos de cantidad de masa que circula por cada corriente y de la temperatura de estas en función de las necesidades de calor se especifican en el apartado 1.5.4.

1.5.3.1.6 Lavado de equipos

En verde se indica el circuito de lavado de todo el proceso. Estas corrientes provienen de la unidad U-300, unidad de lavado. Ahí se encuentran los depósitos con las diferentes sustancias para llevar a cabo el lavado.

Esta unidad funciona en paralelo con las otras dos según que necesidades vayan teniendo. Hay que lavar cada equipo después de haber sido utilizado en cuanto acaba la etapa que en él se está realizando para que quede listo para volver a ser utilizado cuanto antes, ya que hay equipos que en un mismo ciclo de fermentación son usados varias veces en diferentes etapas.

El método consiste en hacer pasar por los diferentes equipos de manera continua:

- Agua que proviene del tanque de retorno (TK-305) para hacer un primer aclarado.
- Agua de red con sosa diluida (TK-303)
- Agua de red para aclarar
- Agua de red con HNO₃ diluido (TK-302)
- Agua de red para aclarar
- Agua destilada para conseguir la completa limpieza pura

Todo retorna a U-300, y dependiendo del valor de su conductividad, se envía al tanque de procedencia para volver a ser usado o al tanque de agua residual.

El agua destilada en ningún caso se retorna al tanque de agua destilada TK-301, se lleva directamente al tanque de retorno TK-305, y en el lavado



1. MEMORIA

siguiente será el agua que se use para el enjuague inicial que será de fondo perdido, es decir, no se va a recuperar.

Con este método de lavado se consigue optimizar la cantidad de agua a utilizar.

Todo el proceso de lavado de equipos se lleva a cabo a temperatura ambiente.

Las cantidades a utilizar se especifican en el apartado 1.4.1.8 Lavado de, calculadas en función de las cantidades para un fermentador de 15L detalladas en el apartado 1.5.4.

1.5.3.2 FASE II: Modificación del polímero

La segunda fase del proceso consiste en la modificación del biopolímero obtenido en la fase anterior. De esta manera se prepara al biopolímero para que pueda participar en reacciones de entrecruzamiento por “química click”, procesos ya explicados anteriormente.

En esta fase va a haber muchas etapas que se realizan de manera manual, es decir, va a ser el personal de laboratorio el que se encargue de realizarlas.

1.5.3.2.1 Reacción

La etapa principal es la reacción. A partir de un reactor de 15L al que llegan 3 corrientes, el polímero sin modificar (corriente 1), DMF (corriente 3) y los reactivos (corriente 2). Si el polímero es HRGD6 el reactivo será azida y si es VKVx24 el reactivo será cicloctino.

Reaccionan durante 48 horas en condiciones ambientales, no es necesario el control de la temperatura.

1.5.3.2.2 Lavado

Tras la reacción se lleva a cabo una centrifugación durante 15 minutos a 10°C. La centrifugadora C-201 es centrifugadora de laboratorio discontinua, esta etapa la realizan de forma manual el personal de laboratorio.

Después de centrifugar hay que realizar varios lavados con acetona y éter para purificar así el polímero modificado.

Los disolventes se dirigen de manera automática al agitador A-201, pero la corriente indicada como 4 es manual, el personal de laboratorio extrae la sustancia de la centrifugadora y lo introduce en el agitador.

Se lavan ambos biopolímeros una vez con éter y dos con acetona. Cada lavado dura 20 minutos. Las cantidades de cada uno con los diferentes



1. MEMORIA

biopolímeros vienen indicadas en el apartado 1.5.4 Balance de materia y energía.

Después de cada lavado se introduce en la centrifugadora de manera manual y se centrifuga en C-201, también a 10°C durante 20 minutos. El precipitado es el biopolímero modificado lavado que se vuelve a introducir en el agitador A-102 o después del tercer lavado se lleva al agitador de resuspensión A-202.

El sobrenadante se introduce en la torre de destilación para así recuperar el disolvente, éter o acetona según el caso.

1.5.3.2.3 Purificación

Una vez finalizados todos los lavados se filtra a vacío el biopolímero durante 1 hora y posteriormente se resuspende en 8L de agua bidestilada y se deja agitando durante 14 horas a 4°C.

Al igual que en la primera fase se reparte el contenido del agitador A-202 en matraces de diálisis de 250ml de volumen.

Después de 15 horas en agitación se extrae el contenido de los matraces y se somete a filtración (FT-201), proceso que dura 1h. Tras esto, se lleva al congelador (FZ-201) durante 8h a una temperatura de -20°C y se somete a liofilización (FD-201) durante 15 días para así eliminar definitivamente el agua que contenga el biopolímero y obtenerlo sólido puro.

1.5.3.2.4 Refrigeración

Se trata también de un circuito cerrado que parte del tanque TK-206, marcado en azul en el plano PFD 201.

En este caso solo hay dos equipos que necesitan refrigeración, el agitador A-202 al que le llega el agua por la corriente 23 a 1°C y el tanque de diálisis D-101 alimentado por la corriente 24.

Al igual que en la unidad U-100, las distintas ramas del circuito no funcionan de manera simultánea, sólo cuando el equipo al que alimentan está funcionando, dichas etapas no se solapan.

1.5.3.2.5 Lavado de equipos

Igual que en la unidad anterior llegan las corrientes de lavado de la unidad U-300. Por las corrientes indicadas circulan de manera continua diferentes fases siguiendo unos pasos. El funcionamiento está explicado en el punto 1.5.3.1.6 Lavado de equipos.



1. MEMORIA

1.5.4 Balance de materia y energía

Los datos del balance de materia son referidos a un ciclo, es decir, en la primera fase, a partir de 100L de caldo fermentado.

Las cantidades indicadas de la fase de modificación del polímero son las necesarias para tratar 80g de polímero sin modificar, ya que es una de las condiciones para iniciar dicha fase.

Se han calculado a partir de los datos proporcionados por el laboratorio para un volumen de caldo fermentado de 15L. (Datos comentados en el apartado 1.4)

Los datos se pueden ver sintetizados en la tabla de corrientes ANEXO II. A continuación, se van a explicar detalladamente.

1.5.4.1 U-100

Fermentación:

- 4L de cultivo
- 96L de medio de crecimiento TB

Las composiciones detalladas se muestran a continuación.

Tabla 1.2. Cantidades de cultivo

Laboratorio cultivo	
Agua bidestilada	4 L
NaCl	0,04 kg
bactotripton	0,04 kg
levadura	0,02 kg
Ampicilina	0,002 L
Glucosa	0,2 L

Tabla 1.3. Cantidades medio TB

Medio TB	
bactotripton	1,152 kg
levadura	2,304 kg
glicerol	0,768 L
antiespumante	0,0096 L
Agua bidestilada	96 L
Ampicilina	0,048 L



1. MEMORIA

Lavado:

Tabla 1.4. Cantidades tampón de lavado

Tampón de lavado		
Agua bidestilada	100	L
NaCl	0,818	kg
TRIS	0,22	kg

Después del lavado las cantidades son las siguientes.

Tabla 1.5. Cantidades después del lavado

Células lavadas	2,312	L
Biomasa residual	197,688	L

En las corrientes 12, 13, 14, 15 y 16 se recircula la disolución de biomasa con tampón de lavado 3 o 4 veces según requerimiento de las condiciones del flujo. El valor indicado es el que tiene cuando termina el lavado justo antes de añadir el tampón de sonicación.

La cantidad de tampón de sonicación viene determinada por la Ecuación 1.2.

Para un valor de absorbancia igual a 15 (valor típico):

Tabla 1.6. Cantidades tampón de sonicación

Tampón sonicación		
Agua bidestilada	7,5	L
TRIS	0,018	kg
EDTA	0,003	kg

Al tampón de sonicación se le añade inhibidor de proteasas para evitar que se rompan las bacterias y se pierda el polímero. En este caso se añade PMSF (fluoruro de fenilmetanosulfonilo), 1 μ L por cada ml de tampón de sonicación.

Tabla 1.7 Cantidad de PMSF

PMSF	0,0075	L
------	--------	---

La corriente 19 se compone por la mezcla de las células lavadas y el tampón de sonicación. Igual va a ser la composición de las corrientes siguientes 20, 21, 22 y 23, pero después de la disrupción las células se rompen y el



1. MEMORIA

polímero se habrá liberado. No se dispone de datos de cuál es la cantidad de polímero.

Como ya se ha dicho anteriormente, la cantidad de polímero que se obtiene no depende de la absorbancia de la muestra, ya que habrá bacterias que no tengan polímero en su interior, por eso es difícil saber cuánto polímero hay antes de su purificación.

A partir de la corriente 25 hasta la 49 va a haber polímero, biomasa y biomasa residual. No se dispone de datos de las cantidades de cada componente, no son necesarios para llevar a cabo el proceso, además de que dependerá de cómo haya evolucionado la fermentación.

En la tabla de corrientes (ANEXO II), los componentes presentes en las corrientes de los que no se tienen valor vienen indicados con guion (-).

La cantidad de NaCl de la corriente 34 dependerá de las necesidades para llegar a un pH de 11,4, al igual que en las corrientes 27, 28 y 29 que en este caso contienen HCl, el necesario para llegar a un pH de 4.

Las corrientes 38 y 39 hay ocasiones que llevan polímero y otras que lleva biomasa residual, depende la etapa en la que se esté.

En las fases de la purificación en un mismo ciclo circula fluido por los mismos equipos en etapas diferentes. Hay 3 centrifugadoras y en cambio en un ciclo hay hasta 7 centrifugaciones. Se aprovecha la misma centrifugadora para varias etapas, todo calculado a partir del tiempo de las etapas con un diagrama de gant comprobando que no se solapen etapas en un mismo equipo.

Al final de la purificación se tienen los datos indicados en Tabla 8.

Tabla 1.8. Cantidades final de purificación

Polímero	0,03	kg
Biomasa residual lavado	197,688	L
Biomasa residual purificación	9,782	L
Total biomasa	207,47	L

La biomasa residual total en un ciclo es la biomasa residual de la corriente 18 más la biomasa que contiene la corriente 23 menos la cantidad de polímero que esta contenga.

El agua de refrigeración necesaria para cada caso se ha calculado a partir de un balance de energía. El cálculo detallado se muestra en el ANEXO IV.



1. MEMORIA

A continuación, se expone una tabla resumen de las necesidades caloríficas y del flujo necesario para cumplir las especificaciones.

Tabla 1.9. Necesidades de agua refrigerada U-100

	Q (Kw)	agua refrigeración (kg)
A-101	0,346	199,871
A-101*	0,180	51,577
A-102	0,440	143,332
A-103	0,00003	1,541
D-101	1,859	585,228
HE-101	7,606	242,400

Hay equipos que se emplean varias veces en un mismo ciclo, se utilizará mayor cantidad de agua.

Para A-101 es el agua necesaria para refrigerar cuando se están lavando las células.

En el caso de A-101 con asterisco indica el agua empleado para refrigerar en el momento que está resuspendiendo en tampón de sonicación.

En A-102 se indica la suma del agua empleado en el enfriamiento más el agua necesaria para mantener la temperatura durante 16 horas y se suma también el agua de una segunda agitación posterior.

En la tabla de corrientes viene indicado el total que se utiliza en un ciclo. En las corrientes 60 y 63 el valor indicado es para el caso de producción de HRGD6. Cuando se produce VKVx24 el valor es menor porque el primer calentamiento con posterior enfriamiento no existe.

El cálculo de las necesidades del intercambiador se encuentra detallado en el Anexo de diseño.

El método de lavado se explica en el apartado 1.5.4.3.

1.5.4.2 U-200

Para la modificación del biopolímero HRGD6 se hace reaccionar con azida y DMF y en el caso del biopolímero VKVx24 reacciona con cicloctino y DMF.

Tabla 1.10. Reactivos de la fase de modificación

HRGD6	80 g	VKV	80 g
Azida	5,47 g	Cicloctino	6,93 g
DMF	4 L	DMF	10 L



1. MEMORIA

La producción total de polímero modificado viene determinada por la siguiente expresión con una conversión del 95%.

$$m_f = m_0 \cdot \frac{PM_f}{PM_0} \cdot \text{conversión} \quad \text{Ecuación 1.3}$$

Siendo:

m_f : masa producida de biopolímero modificado

m_0 : masa inicial de biopolímero sin modificar

PM_0 : peso molecular de biopolímero sin modificar

PM_f : peso molecular de biopolímero modificado

Tabla 1.11. Cantidad de masa que se obtiene de polímero modificado

HRGD6			VKV		
PM sin mod	60661	Da	PM sin mod.	60463	Da
PM mod.	63196	Da	PM mod.	62998	Da
Biopolímero mod.	79,176	g	Biopolímero mod.	79,186	g

Lo que no se transforma se va perdiendo en los lavados y diálisis hasta llegar, tras liofilizar, al componente puro.

Por la corriente 8 en un mismo ciclo se hacen 3 lavados y circula fluido en diferentes momentos, dos veces es acetona con polímero y una vez éter con polímero.

Se ha supuesto una recuperación del 95% de disolvente en la etapa de destilación.

Tabla 1.12. Balance de materia de purificación de la segunda fase

HRGD6			VKVx24		
Centrifugación 1			Centrifugación 1		
HRGD6mod	79,176	g	VKVx24mod	79,186	g
Líquido	4	L	Líquido	10	L
Lavado 1			Lavado 1		
HRGD6mod	79,176	g	VKVx24mod	79,186	g
Éter	16	L	Éter	40	L



1. MEMORIA

HRGD6			VKVx24		
Centrifugación 2			Centrifugación 2		
HRGD6mod	79,176	g	VKVx24mod	79,186	g
Líquido	16	L	Líquido	40	L
Destilación			Destilación		
Éter	15,200	L	Éter	38	L
Residuos	0,800	L	Residuos	2	L
Lavado 2			Lavado 2		
HRGD6mod	79,176	g	VKVx24mod	79,186	g
Acetona	12	L	Acetona	12	L
Centrifugación 3			Centrifugación 3		
HRGD6mod	79,176	g	VKVx24mod	79,186	g
Líquido	12	L	Líquido	12	L
Destilación			Destilación		
Acetona	11,400	L	Acetona	11,400	L
Residuos	0,6	L	Residuos	0,6	L
Lavado 3			Lavado 3		
HRGD6mod	79,176	g	VKVx24mod	79,186	g
Acetona	12	L	Acetona	12	L
Centrifugación 4			Centrifugación 4		
HRGD6mod	79,176	g	VKVx24mod	79,186	g
Líquido	12	L	Líquido	12	L
Destilación			Destilación		
Acetona	11,400	L	Acetona	11,400	L
Residuos	0,600	L	Residuos	0,600	L

A partir de la etapa de diálisis, las corrientes se componen de biopolímero hasta que tras la liofilización se obtiene completamente puro.

En la tabla de corrientes viene indicado el valor total de masa que contiene en un ciclo. Las corrientes en las que circula fluido en diferentes fases en el mismo ciclo están indicadas con un asterisco. El doble asterisco indica que en esa corriente, dentro de un ciclo, esa etapa se realiza dos veces, y la cantidad indicada es la total para un ciclo. En cada etapa la mitad del valor indicado.

Las necesidades del agua refrigerada se muestran en la tabla Tabla 13., el cálculo detallado del balance energético está en el anexo IV.

Tabla 1.13. Necesidades de agua refrigerada en U-200

Q (Kw)	agua refrigeración (kg)
--------	-------------------------



1. MEMORIA

A-202	0,5016	56,371
D-201	0,930	616,001

El circuito de agua refrigerada es un circuito cerrado pero el tanque dispone de una corriente de salida en caso de que el nivel suba mucho debido a que se haya necesitado activar la entrada de agua.

El método de lavado se explica en el apartado 1.5.4.3.

1.5.4.3 U-300

En el lavado por una misma corriente pasan diferentes productos consecutivamente. La información que da la tabla de corrientes es el total de cada uno de los componentes en un ciclo de producción, hay equipos que se lavan varias veces porque son usados para diferentes etapas.

La tabla de corrientes indica el total de fluido que circula en un ciclo por cada corriente.

A continuación, se muestra de manera detallada el cálculo de las cantidades para cada conjunto de equipos y el número de veces necesarias que se lava cada equipo en un ciclo. Las cantidades corresponden con las corrientes que entran a los equipos indicados.

Tabla 1.14. Cantidades en el lavado U-100

U-100	nº veces	Volumen	Agua (L)	Agua dest (L)	NaOH (g)	HNO ₃ (L)
F-101	1	100	500	100	1067	0,83
HE-101	1	1	5	1	10,67	0,0083
LT-101	1	100	500	100	1067	0,83
A-101	1	100	500	100	1067	0,83
DT-101	1	1	5	1	10,67	0,0083
C-102	3	1	15	3	32,01	0,0249
HT-101	3	10	150	30	320,1	0,249
A-102	2	10	100	20	213,4	0,166
C-103	4	1	20	4	42,68	0,0332
A-103	3	10	150	30	320,1	0,249
Total			2150	430	4588,1	3,569

El agitador 101 solo se lava una vez aunque se recircule, mientras se realiza el lavado de células no hace falta lavarlo, entre lavado y lavado. Se lava después de añadir tampón de sonicación.



1. MEMORIA

En HT-101 los valores indicados en la tabla de corrientes son para el caso que se esté produciendo HRGD6. En el caso del biopolímero VKVx24 solos pasa 2 veces.

Tabla 1.15. Cantidades en el lavado U-200

U-200	Nº veces	Volumen	Agua (L)	Agua dest (L)	NaOH (g)	HNO3 (L)
R-201	1	15	75	15	160,05	0,124
A-201	3	60	900	180	1920,6	1,494
A-202	1	10	50	10	106,7	0,083
Total			1025	205	2187,35	1,7015



1. MEMORIA

1.6 EQUIPOS

Nomenclatura de equipos:

Tabla 1.16. Nomenclatura de equipos

A	Agitador
C	Centrifugadora
D	Tanque de diálisis
DT	Disruptor
F	Fermentador
FD	Liofilizador
FT	Filtro a vacío
FZ	Congelador
HE	Intercambiador de calor
HT	Tanque de calentamiento
LT	Tanque pulmón
P	Bomba
R	Reactor
T	Torre de destilación
TK	Tanque
V	Silo

Para la selección de las características de diseño de los distintos equipos se basa en diferentes normas según qué equipo sea, se nombrarán a lo largo de este punto.

1.6.1 Lista de equipos



1. MEMORIA



 Universidad de Valladolid						LISTA DE EQUIPOS	
REV.	0					TRABAJO N°	
FECHA	20/04/2019					UNIDAD	U-100
POR	EFL					CLIENTE	
FIRMA						LOCALIZACIÓN	
REV.	ITEM NO.	CANTIDAD	DESCRIPCIÓN	ORIGEN (1)	DRIVER (1)	OBSERVACIONES	
1	TK-101		TANQUE TAMPÓN DE SONICACIÓN	E			
2	TK-102		TANQUE AGUA BIDESTILADA	E			
3	TK-103		TANQUE TB	E			
4	TK-104		TANQUE TAMPÓN DE LAVADO	E			
5	TK-105		TANQUE AGUA DESTILADA	E			
6	F-101		FERMENTADOR	E	M		
7	P-101		BOMBA TAMPÓN DE SONICACIÓN	E			
8	P-102		BOMBA AGUA BIDESTILADA	E			
9	P-103		BOMBA TB	E			
10	P-104		BOMBA TAMPÓN DE LAVADO	E			
11	P-105		BOMBA AGUA DESTILADA	E			
12	HE-101		INTERCAMBIADOR DE CALOR	E			
13	P-106		BOMBA INTERCAMBIADOR DE CALOR	E			
14	C-101		CENTRIFUGADORA 1	E			
15	LT-101		TANQUE PULMÓN DE LAVADO	E			
16	A-101		AGITADOR DE LAVADO	E	M		
17	P-107		BOMBA TANQUE PULMÓN	E			
18	P-108		BOMBA DE LAVADO	E			
19	P-109		BOMBA DE CENTRIFUGADORA	E			
20	DT-101		DISRUPTOR	E			
21	P-110		BOMBA DISRUPTOR	E			
22	C-102		CENTRIFUGADORA 2	E			
23	V-101		SILO NaCl	E			
24	HT-101		TANQUE CALENTAMIENTO	E			
25	A-102		AGITADOR DE PURIFICACIÓN	E	M		
26	P-112		BOMBA TANQUE CALENTAMIENTO	E			
27	P-113		BOMBA TANQUE PURIFICACIÓN	E			
28	P-114		BOMBA TANQUE CALENTAMIENTO 2	E			
29	C-103		CENTRIFUGADORA 3	E			
30	LT-102		TANQUE PULMÓN PURIFICACIÓN	E			
31	A-103		AGITADOR RESUSPENSIÓN	E	M		
32	P-115		BOMBA TANQUE PULMÓN 2	E			
33	P-116		BOMBA AGITADOR RESUSPENSIÓN	E			
34	P-117		BOMBA CENTRIFUGADORA 3	E			
35	V-102		SILO NaOH	E			
36	TK-108		TANQUE HCl	E			
37	P-111		BOMBA TANQUE HCl	E			
38	TK-109		TANQUE DE BIOMASA	E			
39	D-101		DIÁLISIS	E			
40	FT-101		FILTRO	E			
41	FZ-101		CONGELADOR	E			
42	FD-101		LIOFILIZADOR	E			
43	TK-110		TANQUE REFRIGERACIÓN	E			
44	P-118		BOMBA TANQUE REFRIGERACIÓN	E			
45							
46							

LEGEND:
 1- FUNCIONA: M - MOTOR ELÉCTRICO T - TURBINA ORIGEN: E - ESPAÑA O - OTROS



1. MEMORIA

1.6.2 Diseño de equipos

El diseño de los equipos se lleva a cabo siguiendo las especificaciones del libro: Coulson, J., Richardson, J., Backhurst, J. and Harker, J. (2003). Chemical engineering. Oxford: Butterworth-Heinemann.

Los datos necesarios de partida son respectivos a las necesidades para un ciclo del proceso. Después de cada ciclo los equipos se lavan y los tanques de almacenamiento se rellenan.

1.6.2.1 Fermentador

El diseño detallado del fermentador se encuentra en el ANEXO III. A continuación, se muestra una tabla resumen de las características.

Tabla 1.17. Características principales del fermentador F-101

Volumen tanque	0,125	m ³
Volumen líquido	0,1	m ³
Material	AISI 316	
T ^a diseño	47	°C
P diseño	3,5	barg
CUERPO		
D	0,473	m
L	0,71	m
H	0,568	m
sd	155	Mpa
st	140	MPa
td	3,003	mm
tt	0,004	mm
t nominal	5	mm
FONDO		
S	155	MPa
E	0,7	
Rdomo	473,416	mm
t	5	mm
P	1,293	Mpa
TECHO		
R	0,237	m
Ph	205	MPa
E	194000	MPa
CA	3	mm
td	4,085	mm
Pi	4,5	bar



1. MEMORIA

θ	9,5	°
D _{lr}	3	kg
A _{req}	0,894	m ²
A _{min}	0,492	m ²
AGITACIÓN		
W	0,032	m
Z _A	0,158	m
W _B	0,039	m
N	8,333	rps
N _p	4,8	
P	27,562	W

Se escoge un fermentador de 100L de la compañía **Bioprocess Technology** con las siguientes características:

- Capacidad total: 130L
- Volumen útil: 100L
- Material en contacto con el producto: acero inoxidable
- Temperatura máxima: 150°C
- Deflectores: 4 bafles a 90°

1.6.2.2 Reactor

Tabla 1.18. Características principales del reactor R-101

Volumen tanque	0,125	m ³
Volumen líquido	0,1	m ³
Material	VIDRIO	
T ^a diseño	40	°C
P diseño	3,5	barg
CUERPO		
D	0,22	m
L	0,33	m
H	0,264	m
AGITACIÓN		
W	0,015	m
Z _A	0,073	m
W _B	0,018	m



1. MEMORIA

N	8,333 rps
Np	4,8
P	0,563 W

Con los datos obtenidos se selecciona un reactor de la marca **VidraFoc** con las siguientes características:

- Capacidad: 15L
- Material: vidrio
- Tapa de vidrio con 4 entradas para producto
- Soporte metálico

1.6.2.3 Tanques

Para el diseño de todos los tanques del proceso se ha escogido el material AISI 316 ya que se requiere elevada pureza.

A continuación, se muestran las características elementales de todos los tanques calculadas a partir del procedimiento indicado en el ANEXO III. Allí se encuentran todos los pasos del cálculo a partir del cual se han hallado todos los tanques.

Tabla 1.19. Características principales de todos los tanques del proceso

	Volumen tanque (m ³)	Volumen líquido (m ³)	T ^a diseño (°C)	D (m)	L (m)	H (m)	sd (MPa)	st (MPa)
TK-101	0,010	0,008	40	0,204	0,306	0,245	186	140
TK-102	0,125	0,1	40	0,473	0,710	0,568	186	140
TK-103	0,125	0,1	40	0,473	0,710	0,568	186	140
TK-104	0,125	0,1	40	0,473	0,710	0,568	186	140
TK-105	0,125	0,1	40	0,473	0,710	0,568	186	140
TK-108	0,004	0,005	40	0,162	0,243	0,194	186	140



	Volumen tanque (m ³)	Volumen líquido (m ³)	T ^a diseño (°C)	D (m)	L (m)	H (m)	sd (MPa)	st (MPa)
TK-109	1,000	0,8	40	0,947	1,420	0,847	186	140
TK-110	1,000	0,8	21	0,947	1,420	0,847	186	140
TK-201	0,014	0,017	40	0,246	0,369	0,295	186	140
TK-202	0,056	0,07	40	0,39	0,585	0,468	186	140
TK-203	0,200	0,25	40	0,596	0,895	0,716	186	140
TK-204	0,2	0,25	40	0,596	0,895	0,716	186	140
TK-205	0,056	0,07	40	0,390	0,585	0,468	186	140
TK-206	0,5	0,4	21	0,752	1,127	0,902	186	140
TK-301	0,625	0,5	40	0,810	1,214	0,971	186	140
TK-302	0,625	0,5	40	0,810	1,214	0,971	186	140
TK-303	0,625	0,5	40	0,810	1,214	0,971	186	140
TK-304	0,625	0,5	40	0,810	1,214	0,971	186	140
TK-305	0,625	0,5	40	0,810	1,214	0,971	186	140
TK-306	0,625	0,5	40	0,810	1,214	0,971	186	140
LT-101	0,125	0,1	30	0,473	0,710	0,568	186	140
LT-102	0,008	0,01	62	0,204	0,306	0,245	155	140



1. MEMORIA

La presión de diseño es la misma para todos y tiene un valor de 3,5 barg.

El espesor de pared para todos va a ser el espesor mínimo permitido, 5mm, ya que en todos los casos t_d y t_t son inferiores a este valor.

Los tanques TK-109, TK-110, TK-20, TK-206 y TK-306, son tanques horizontales debido a que tienen un volumen de 1m^3 o más. El resto son tanques verticales.

El procedimiento de cálculo para el techo y el fondo de ambos tipos de tanques se encuentran en el anexo III. Para el mismo tipo de tanques estos elementos serán iguales.

También están en dicho anexo las características de los tanques comerciales elegidos.

1.6.2.4 Agitadores

Al igual que en el apartado anterior, el material para todo lo que está en contacto con el producto va a ser AISI 316 debido a la alta pureza que se requiere.

A continuación, se muestran las características elementales de todos los agitadores calculadas a partir del procedimiento indicado en el ANEXO III.

En la Tabla 1.20 se muestran las características referidas a la parte del tanque y en la Tabla 1.21 vienen indicadas las características de la parte del agitador.

Tabla 1.20. Características referidas a los tanques de los agitadores.

	Volumen tanque (m ³)	Volumen líquido (m ³)	T ^a diseño (°C)	D (m)	L (m)	H (m)	sd (MPa)	st (MPa)
A-101	0,125	0,100	30	0,473	0,710	0,568	186	140
A-102	0,009	0,012	30	0,218	0,327	0,262	186	140
A-103	0,009	0,012	30	0,218	0,327	0,262	186	140
HT-101	0,012	0,010	62	0,219	0,329	0,263	155	140
A-201	0,050	0,040	40	0,348	0,523	0,418	186	140
A-	0,010	0,008	30	0,204	0,306	0,245	186	140



Volumen tanque (m ³)	Volumen líquido (m ³)	T ^a diseño (°C)	D (m)	L (m)	H (m)	sd (MPa)	st (MPa)
202							

Tabla 1.21. Características del sistema de agitación.

	Da (m)	W (m)	z (m)	W _B (m)	N (rps)	N _p	P (W)
A-101	0,158	0,032	0,158	0,039	29,17	0,32	79,312
A-102	0,073	0,0145	0,073	0,018	29,17	0,32	1,652
A-103	0,073	0,0145	0,073	0,018	29,17	0,32	1,652
HT-101	0,073	0,0146	0,073	0,018	29,17	0,32	1,699
A-201	0,116	0,0232	0,116	0,029	29,17	0,32	12,279
A-202	0,067	0,0136	0,068	0,017	29,17	0,32	1,178

1.6.2.5 Centrifugadoras

1.6.2.5.1 C-101, C-102, C-103

Las 3 centrifugadoras usadas en la unidad 100 van a ser centrifugadoras continuas del proveedor **GEA Westfalia separator** con las siguientes características:

- Recinto de sólidos: 0,5L
- Volumen total: 1L
- Velocidad para una densidad del producto hasta 1,05 kg/dm³: 10000rpm
- Capacidad: 300 l/h como máximo
- Altura de impulsión: 0,5 bar como máximo
- Potencia del motor:
 - Para 50Hz: 1,1 kW
 - Para 60Hz: 1,3 kW
- Velocidad:
 - Para 50Hz: 3000rpm
 - Para 60Hz: 3600rpm
- Temperatura máxima de centrifugación: 100°C



1. MEMORIA

1.6.2.5.2 C-201

La centrifugadora de la unidad 200 es una centrífuga discontinua, elegida en este caso la centrífuga de bioprocesamiento **Thermo Scientific™ Sorvall™ BIOS 16**.

Características:

- Capacidad: 8x2000mL
- Máxima velocidad: 5400 rpm
- Máxima RCF (fuerza relativa continua): 8509xg
- Tamaño reducido y mejoras ergonómicas con un cómodo botón pulsador que permiten optimizar el uso diario de la centrífuga:
 - Apertura y cierre automáticos de la puerta de la centrífuga de delante a atrás con la función Thermo Scientific™ Auto-Door™
 - Apertura y cierre de la tapa del rotor Thermo Scientific™ Auto-Lid™ con guardado de la tapa
- Thermo Scientific™ Auto-ID permite la detección y programación inmediatas del rotor mediante la identificación instantánea del rotor para ahorrar tiempo y proteger la integridad de las muestras.
- La interfaz Thermo Scientific™ Centri-Touch™ con pantalla brillante, de alta visibilidad y fácil de usar con guantes simplifica la configuración de los ciclos. Se ha mejorado aún más con controles de acceso como el inicio de sesión de usuario con protección con contraseña.

1.6.2.6 Filtros

El proceso de filtración va a tener las siguientes particularidades:

- Discontinuo
- A vacío
- Fluido filtrado: disolución de polímero

El tamaño del poro de la membrana tiene que ser como máximo 0,2 μm para llegar a esterilizar la bacteria.

SELECCIÓN FILTRO COMERCIAL

La mejor opción para procesos biológicos a nivel de laboratorio son los filtros desechables, en este caso de **Thermo Scientific**.

Tienen la ventaja de que no necesita mantenimiento.

Requiere de una bomba adicional a la que conectarle para hacer el vacío.

Especificaciones:



1. MEMORIA

- Volumen: 1L
- Material del filtro: poliestireno
- Membrana: Polietersulfona (PES)
- Tamaño poro membrana: 0,2 μm
- El soporte de membrana sin almohadilla minimiza la formación de espuma con muestras proteicas.
- Apirógenos y no citotóxicos
- Esterilización por radiación gamma y envasado individual con una vida útil estéril de 5 años

Todos los filtros del proceso (FT-101, FT-201 y FT-202) van a ser de este tipo.

1.6.2.7 Membranas de diálisis

Datos de partida:

- Volumen de muestra: 1,5L
- Tamaño de partículas que se dializan.

Tabla 1.22. Peso molecular de los biopolímeros

VKVx24		
Sin modificar	60463	Da
Modificado	62998	Da
HRGD6		
Sin modificar	60661	Da
Modificado	63196	Da

- Temperatura: 4°C

SELECCIÓN DEL PRODUCTO

Los matraces de diálisis seleccionados serán Slide-A-Lyzer de **Thermo Scientific**, 20K MWCO, 250 ml facilitan la eliminación simple y efectiva de sales tampón y pequeños contaminantes de proteínas y otras macromoléculas en volúmenes de muestra de hasta 250 ml.

Especificaciones:

- Composición: Celulosa Regenerada.
- Grosor: 0.9 a 1.2 mil (22.5 a 30 μm); 2K MWCO = 2mil (50 μm)



1. MEMORIA

- Hidratación requerida antes del uso: 30 segundos a 2 minutos
- Contenido de glicerol: Rastro (el contenido de 10K MWCO es 21%)
- Contenido de azufre: 0.04 a 0.17%
- Contenido de metales pesados: traza.
- Tamaño del poro: 20000 Da.

1.6.2.8 Intercambiador de calor

El intercambiador de calor **HE-101** se trata de un intercambiador de placas. El diseño y las características de este tipo de intercambiadores se encuentran detallados en el anexo III.

Tabla 1.23. Características HE-101

Área de intercambio	0,13	m ²
Nº placas	10	
Calor transferido	7,606	kW
Caída de presión	4214	Pa

1.6.2.9 Torre de destilación

En la misma torre (**T-201**) se van a realizar dos operaciones:

- Destilación de éter con residuos de lavado
- Destilación de acetona con residuos de lavado

Datos de partida:

- Volumen máximo de destilado: 40L
- Volumen máximo de colector: 38L
- Temperatura de ebullición éter: 34,6°C
- Temperatura de ebullición acetona: 56°C

Debido a la simplicidad de la separación de este proceso se va a utilizar una columna de destilación simple del proveedor **Figmay SRL**.

CARACTERÍSTICAS DE LA TORRE

- Material de las partes en contacto con la mezcla: borosilicato (material inerte, altamente resistente a la corrosión química, altas temperaturas y choques térmicos)
- Volumen vaso reactor: 50L
- Volumen vaso colector: 40L
- Sistema de calefacción: temperatura auto regulable



1. MEMORIA

- Sistema de agitación: paletas de alta eficiencia
- Relleno de columna: anillos raschig
- Sistema de condensación: refrigerante en vaso colector

1.6.2.10 Disruptor

El disruptor de células es un dispositivo que se usa para lisis celular

El disruptor elegido es disruptor PANDA 1000 de la compañía **GEA Niro Soavi**
Technical Datasheet.

- Caudal: 9l/h
- Máxima presión de operación: 1000 bar
- Peso neto: 105 kg
- Peso bruto: 135 kg
- Dimensiones: 540 x 440 x 810 mm
- Volumen mínimo de muestra: 60 ml

El resto de características pueden consultarse en el anexo IX Catálogo de equipos.

1.6.2.11 Liofilizador

El liofilizador utilizado es **LIOFILIZADOR VIRTIS SP SCIENTIFIC.**

- Modelo: Génesis 25ES
- Controlador: Wizard 2.0
- 60 Hertz
- Capacidad del condensador: 25 L
- Temperatura más baja en el condensador: -85°C
- Temperatura más baja en la bandeja: -70°C
- Número de compresores: 2

El resto de las características se pueden encontrar en el anexo IX Catálogo de equipos.

1.6.2.12 Tuberías

El cálculo detallado de tuberías se encuentra en el anexo III.

Las tuberías se han nombrado atendiendo al siguiente esquema:



1. MEMORIA 3/8"-TS-101-80SS2-CC40

- El primer dato es el diámetro nominal en pulgadas de la tubería.
- Lo siguiente indica el fluido que circula por la tubería.
- El siguiente número es la designación de la tubería. N° Unidad +N° Tubería.
- Le sigue el número de catálogo de la tubería, material y sobreespesor por corrosión.
- Lo último indica el aislamiento si existe y el espesor de este en mm.

Tabla 1.24. Abreviaturas presentes en nomenclatura de tuberías

Fluido	
A	Aire
TS	Tampón sonicación
TB	Solución TB
CF	Caldo fermentado
TL	Tampón de lavado
HC	Ácido clorhídrico
AB	Agua bidestilada
AD	Agua destilada
AR	Agua de refrigeración
DMF	DMF
DE	Dietiléter
AC	Acetona
LV	Agua de lavado
Material	
WS	Acero forjado (Wrought Steel)
SS	Acero inoxidable (Stainless Steel)
Aislante	
HC	Conservación de calor (Hot conservation)
CC	Conservación de frío (Cold conservation)

En el ANEXO V se detallan todas las tuberías del proceso con sus diferentes características.



1.6.2.13 Bombas

Siguiendo el procedimiento de cálculo detallado en el anexo III se han calculado todas las bombas del proceso. En el ANEXO V se muestran sus características de diseño y cálculo.

Debido a las características del flujo y al bajo punto de funcionamiento, todas las bombas, excepto las del circuito de refrigeración, van a ser del tipo bomba lobular rotativa (SLR) de INOXPA, concretamente SLR 0-25. Puede verse el catálogo de la misma en el anexo IX.

El cálculo y las diferentes características de las bombas P-118A, P118B, P-208A y P-208B, bombas del circuito de refrigeración, se encuentra detallado en el ANEXO III.

1.6.3 Distribución en planta

El modelo de distribución empleado en plantas de pequeño tamaño como lo es en este caso, es el *Modelo en Línea de Flujo*. Este modelo consiste en situar los equipos según el orden establecido en el diagrama de flujo.

Cada unidad va a estar situada en salas diferentes.

En la unidad **U-100**, el equipo central es el fermentador. Alrededor de él se van a colocar, en un lado los tanques de materias primas que alimentan a los diferentes equipos y por otro lado va a estar situada la zona de purificación del biopolímero.

En la unidad **U-200**, el equipo central es el reactor y al igual que en el caso anterior van a estar a un lado los tanques de materias primas que alimentan a los diferentes equipos y por el otro en este caso estarán la torre de destilación y los equipos para la purificación y más alejada, con una distancia mínima de seguridad de 5m estará colocada la torre de destilación.

En ambas unidades, filtro, congelador y liofilizador estarán en una sala para aislar el ruido del compresor y bomba a vacío. Tendrá una corriente de aire para reciclar este y evitar el aumento de temperatura de la sala.

La unidad U-300 tendrá todos los tanques colocados a la misma distancia unidos en paralelo a un colector de salida y a un colector de entrada que son los que les une con las unidades **U-100** y **U-200**.



1. MEMORIA

1.7 INSTRUMENTACIÓN Y CONTROL

Todos los instrumentos y enlaces de control del proceso completo se pueden observar en los planos P&ID disponibles en el apartado PLANOS.

En los planos están indicados los controladores individuales de cada etapa para que sea más visual y más fácil de entender el funcionamiento de la estrategia de control, pero en realidad van todos unidos a un autómatas central, habiendo uno por cada unidad, y desde este se programa todo el proceso.

1.7.1 Tanques

El principal control de los tanques de la planta es el control de flujo mediante una válvula que se cierra cuando ha pasado el flujo necesario.

Los tanques disponen de indicadores de alto y bajo nivel que cuando los superan se activa una alarma para indicar que está lleno o que hay que rellenarlo respectivamente.

Disponen también de un indicador de presión.

El tanque de biomasa TK-109 además, posee un controlador de pH que controla la entrada del depósito de NaOH o del tanque HCl, para que según el valor de pH abra una u otra válvula con la finalidad de que en el tanque haya siempre un valor de pH neutro.

1.7.2 Fermentador

El fermentador tiene integrado su propio control.

El proceso de fermentación requiere un control de varias variables por ello dispone de la siguiente instrumentación y control:

- Control de temperatura de proceso
- Control de pH del medio de proceso
- Control de la presión en cúpula del biorreactor
- Control de la cantidad de O₂ del medio
- Control de la velocidad de giro del agitador
- Control del caudal de gas aportado al medio
- Medida de espuma y adición de antiespumante
- Medida de densidad óptica del medio

A todo esto se han añadido a la salida dos válvulas on/off que se abren cuando se ha cumplido el tiempo necesario del proceso.



1. MEMORIA

La válvula XV-01 es la que controla el proceso de fermentación y la válvula XV-02 controla el proceso de lavado.

1.7.3 Intercambiador de calor

En el intercambiador de calor solo hay un control de temperatura que envía una señal para abrir o cerrar más una válvula de globo según la temperatura de salida del caldo fermentado. Esto sólo es por si hay algún fallo ya que, el caudal necesario de agua que hay que enviar se ha calculado previamente y se ha construido el circuito a partir de la bomba P-118 y las pérdidas generadas para que de ese caudal.

1.7.4 Centrifugadoras y tanque pulmón

La centrifugadora tiene un indicador de presión para así poder observar si se encuentra en el rango seguro.

En la zona de descarga del precipitado, la centrifugadora contiene una válvula on/off que se abre pasados 600 segundos y deja caer el precipitado en un tanque pulmón que posee un transmisor de nivel conectado a la válvula de salida de este y así, en el momento en que se supera el nivel establecido, la válvula se abre y se envía el fluido al agitador.

1.7.5 Agitadores

1.7.5.1 Agitador A-101

En este agitador ocurren varios procesos, el lavado del caldo fermentado procedente del fermentador y la resuspensión en tampón de sonicación para mandarlo después hacia el disruptor.

A diferencia del resto de tanques en los que se controla la salida con un transmisor de flujo, la salida del tanque de tampón de lavado se controla con un transmisor de nivel en el agitador A-101 en el punto donde se llega a tener un volumen de 100L de tampón de lavado. Cuando supera ese nivel, la válvula se cierra.

Para la salida del fluido, el agitador posee varias válvulas on/off. La válvula XV-03 que recircula a la centrifugadora C-101, esta válvula está en marcha mientras se esté llevando a cabo el proceso de lavado. En el momento que se resuspende en tampón de sonicación se pone en marcha la válvula XV-04, que se abre pasado el tiempo establecido de resuspensión y envía el fluido al disruptor.

El agitador tiene un transmisor de temperatura que regula el caudal de entrada de agua refrigerada en función de la temperatura del interior del agitador y el flujo de agua refrigerada que esté circulando en ese instante.



1. MEMORIA

Funciona de la misma manera que el control de temperatura del intercambiador, la cantidad de caudal necesaria para llegar a las especificaciones se ha calculado previamente y el circuito está preparado para generarlo.

Por último, contiene un transmisor de presión con una válvula de seguridad en la que se ha indicado una presión de tarado.

1.7.5.2 Tanque de calentamiento HT-101

El tanque de calentamiento es un agitador pero que dispone de una resistencia que calienta el interior hasta 42°C controlado por un transmisor de temperatura.

Contiene un transmisor de presión con una válvula de seguridad en la que se ha indicado una presión de tarado.

En este caso también hay un control de pH conectado a la válvula del depósito de NaCl que controla la cantidad de NaCl hasta que llega a tener un pH de 11.

Tienen dos posibles salidas controladas por válvulas on/off con temporizador. No funcionan simultáneamente, depende de la etapa del proceso en que se encuentre. La válvula XV-04 envía el fluido al agitador A-102 y la válvula XV-07 lo envía hacia la centrifugadora C-103 donde se realizan las últimas etapas de la purificación.

1.7.5.3 Agitador A-102

La temperatura en el agitador se controla con la entrada de agua de refrigeración en función del caudal de esta y de la temperatura en el interior del tanque.

Posee un controlador de pH que regula la entrada de HCl en el tanque, este está conectado a la válvula de salida del tanque de HCl, en el momento que llega a un valor de pH 4 se cierra la válvula.

Como en el resto de agitadores y tanques tienen un control de presión con una válvula de seguridad tarada a una cierta presión.

Tiene una única salida controlada por una válvula on/off con temporizador.

1.7.5.4 Agitador A-103

La estrategia de control de este agitador es muy similar a la del agitador A-102, la temperatura, presión y salida se controlan de la misma manera.



1. MEMORIA

En este caso contiene un transmisor de nivel que controla la entrada de agua de lavado, en el momento que supera el límite de nivel alto la válvula de entrada de agua se cierra.

1.7.5.5 D-101 y D-201

El único control que hay en este tanque es la temperatura que se lleva a cabo de la misma manera que en el resto de agitadores, en función de la temperatura del interior y del flujo de agua refrigerada que esté circulado se abrirá o cerrará más la válvula.

La cantidad de agua necesaria para mantener la temperatura ya está calculada y el circuito está preparado para que circule el caudal necesario, este control es de seguridad para tenerlo vigilado.

1.7.5.6 Agitador A-201

La estrategia de control de la unidad U-200 tiene un factor más a tener en cuenta, las cantidades de los productos cambian según que biopolímero se esté modificando.

En el agitador A-201 se realizan dos etapas distintas, el lavado con acetona y el lavado con éter.

El control principal es la entrada de fluido al agitador regulada por una válvula controlada por nivel en el agitador. Posee dos controladores de nivel conmutados a una válvula de 3 vías. Uno de ellos controla cuando el disolvente se trata de acetona y otro cuando el disolvente es éter.

El controlador de nivel del éter hay que cambiarlo manualmente de posición dependiendo de si se está lavando HRGD6 o VKVx24.

Contiene una válvula de seguridad que controla la presión.

La temperatura en el interior no se controla ya que el lavado se realiza a temperatura ambiente. La salida del agitador es manual.

1.7.5.7 Agitador A-202

Lo único que se controla durante el proceso de resuspensión es la temperatura, mediante un transmisor de temperatura conectado al interior del agitador y un control en el flujo de agua refrigerada que entra al agitador.

Contiene una válvula de seguridad.

1.7.6 Reactor

Hay una válvula de seguridad junto con un indicador para controlar la presión.



1. MEMORIA

La temperatura no se controla porque no es un parámetro importante en esta etapa del proceso.

La cantidad de DMF que va al reactor es diferente si lo que se está modificando es HRGD6 o VKVx24. Se rige por un transmisor de flujo que controla la válvula de salida del tanque de DMF.

La salida del reactor se hace de forma manual.

1.7.7 Torre de destilación

La torre de destilación tiene integrado su propio control para calentar o enfriar en función de la temperatura necesaria. Contiene indicadores de presión y temperatura para que se tenga controlado.

La salida del residuo se realiza de manera manual. La salida del destilado está controlada por una válvula que se abre en función del nivel del colector de la torre.

1.7.8 Lavado

En muchos equipos de las unidades U-100 y U-200 hay válvulas on/off que no se han comentado antes debido a que son todas válvulas que funcionan cuando está en funcionamiento el lavado de los equipos. Todas ellas están conectadas a la válvula de entrada de fluido de lavado. Cuando estas se abren, envían una señal para poner en marcha el temporizador de las válvulas de salida.

Las válvulas de entrada también están conectadas entre ellas para así controlar que una esté cerrada cuando la otra esté abierta.

Las válvulas de lavado de las unidades 100 y 200 se controlan por una unidad central de control que simplemente manda abrir o cerrar según el equipo que toque lavar. La cantidad de flujo que llega se controla en la unidad central de lavado.

Al controlador FC-04 de la unidad U-300 le llega una señal con información sobre el equipo que toca lavar y será el que controle la salida de agua de los distintos tanques mediante la válvula de salida de estos.

La entrada de agua a los tanques de la unidad U-300 está controlada por un transmisor de nivel en los tanques que cuando le sobrepasan manda una señal para cerrar la válvula.

La entrada del agua recirculada se controla mediante un conductivímetro que en caso de sobrepasar un valor establecido se lleva al tanque de agua residual y si no se recircula hacia el tanque correspondiente.



1. MEMORIA

La cantidad de NaOH y HNO₃ que cae de los depósitos hacia el tanque de disolución está preparada para que lo haga por dosis, no necesita controladores.

2 ESTUDIO DE SEGURIDAD Y SALUD



2.1 INTRODUCCIÓN

En el ámbito industrial la seguridad es un punto importante que tiene como objetivo minimizar los posibles riesgos para personas, instalaciones, servicios y medio ambiente.

En la Ley 31/1995, de 8 de noviembre, de prevención de Riesgos Laborales, normativa básica en materia de prevención se establece la aplicación de una acción preventiva a partir de la evaluación inicial de los riesgos sobre la seguridad y la salud de los trabajadores.

Se deben lograr unas condiciones de trabajo controladas para reducir el riesgo de posibles accidentes. Es importante, para ello, que las actividades susceptibles de generar riesgos laborales sean integradas dentro de un plan de seguridad de la planta para evitar daños.



2.2 LEGISLACIÓN

A continuación, se nombran las diferentes normas en materia de seguridad y salud laboral.

- Ley 21/1992, de 16 de julio, de Industria.
- Real Decreto 513/2017, de 22 de mayo, por el que se aprueba el Reglamento de instalaciones de protección contra incendios.
- Real Decreto 842/2002, de 2 de agosto, por el que se aprueba el Reglamento electrotécnico para baja tensión.
- Ley Orgánica 4/1981, de 1 de junio, de los estados de alarma, excepción y sitio.
- Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo.
- Real Decreto 486/1997, de 14 de abril, por el que se establecen las disposiciones mínimas de seguridad y salud en los lugares de trabajo.
- Ley 8/2010, de 31 de marzo, por la que se establece el régimen sancionador previsto en los Reglamentos (CE) relativos al registro, a la evaluación, a la autorización y a la restricción de las sustancias y mezclas químicas (REACH) y sobre la clasificación, el etiquetado y el envasado de sustancias y mezclas (CLP), que lo modifica.
- Ley 9/2003, de 25 de abril, por la que se establece el régimen jurídico de la utilización confinada, liberación voluntaria y comercialización de organismos modificados genéticamente.
- Real Decreto 367/2010, de 26 de marzo, de modificación de diversos reglamentos del área de medio ambiente para su adaptación a la Ley 17/2009, de 23 de noviembre, sobre el libre acceso a las actividades de servicios y su ejercicio, y a la Ley 25/2009, de 22 de diciembre, de modificación de diversas leyes para su adaptación a la Ley de libre acceso a actividades de servicios y su ejercicio.

REGLAMENTO REACH

El Reglamento (CE) nº 1907/2006 (en adelante denominado REACH, acrónimo de Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de sustancias y mezclas químicas) entró en vigor el 1 de junio de 2007 y tiene como objetivo principal mejorar la protección para la salud humana y el medio ambiente frente al riesgo que puede conllevar la fabricación, comercialización y uso de las sustancias y mezclas químicas.

En principio el REACH es de aplicación para todas las sustancias químicas presentes en la vida diaria ya sea como tales, en forma de mezclas o



2. ESTUDIO DE SEGURIDAD Y SALUD

contenidas en artículos, siendo, por tanto, de aplicación en sectores económicos de índole diversa.

Para cumplir con las disposiciones del REACH las empresas deben identificar y gestionar los riesgos asociados a las sustancias que fabrican y comercializan en la Unión Europea. Deben demostrar cómo usar dichas sustancias de manera segura y comunicar toda aquella información relativa a las medidas de gestión de riesgos a las partes implicadas. [18]

Para cumplir con estos objetivos el Reglamento REACH contempla los siguientes procesos:

- Registro (título II): se tendrá que registrar toda aquella sustancia fabricada/importada en cantidades iguales o superiores a 1 tonelada/año.
- Evaluación (título VI): se evaluarán los riesgos para la salud y el medio ambiente de toda aquella sustancia que suponga un riesgo conforme a los criterios establecidos para la asignación de prioridades.
- Autorización (título VII): se deberá solicitar una autorización de uso para toda aquella sustancia considerada altamente preocupante conforme al Reglamento REACH.
- Restricción (título VIII): determinados usos de las sustancias estarán prohibidos o restringidos cuando supongan un riesgo inaceptable para la salud humana y el medio ambiente. [18]



2.3 IDENTIFICACIÓN DE RIESGOS

Al tratarse de una planta de pequeño tamaño los riesgos presentes van a ser bajos.

Como no se trabaja con presiones elevadas ni sustancias químicas peligrosas no se consideran los riesgos asociados a estos aspectos.

2.3.1 Riesgo eléctrico

Siempre que se trabaja con corriente eléctrica existe un riesgo, Las disposiciones mínimas para la protección de la salud y seguridad de los trabajadores frente al riesgo eléctrico están reguladas por el RD 614/2001. La seguridad de los trabajadores depende de la buena conservación de las instalaciones eléctricas y de su adecuada utilización. Es necesario seguir las normas escrupulosamente, sobre todo para evitar contactos directos con los equipos, las personas y también los fluidos de proceso.

En este caso el riesgo está en los diferentes equipos conectados a red (congelador, liofilizador, resistencia eléctrica...) estando entre los riesgos más comunes, quemaduras, propagación de incendios o electrocución.

2.3.2 Riesgo por golpe de objetos proyectados

El riesgo por golpe de objetos proyectados puede ser debido a fugas o rotura de algún elemento de los equipos a causa de un aumento de presión o a la falta de inspección de estos. Puede ocasionar en el personal heridas o quemaduras.

2.3.3 Riesgo relacionado con planta biotecnológica

Con el fin de proteger la salud de los trabajadores de plantas biotecnológicas durante el desarrollo de sus actividades, existe el Real Decreto 664/1997, de 12 de Mayo sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo, dentro del marco normativo de la Ley 31/1995, de 8 de Noviembre de Prevención de Riesgos Laborales.

El mayor factor de riesgo que existe es que los agentes biológicos son capaces de desencadenar enfermedades.

En esta planta se trabaja con agentes del grupo 1 que son aquellos que resulta poco probable que causen una enfermedad en el ser humano.



2.4 SISTEMAS DE SEGURIDAD

2.4.1 Medidas de seguridad contra las fugas

2.4.1.1 **Distancia de seguridad**

Hay que guardar una distancia de seguridad entre los puntos que pudieran suponer un riesgo para otros equipos y para las personas que trabajen en las instalaciones.

2.4.1.2 **Aislamiento de fugas**

El sistema será independiente en los diferentes tramos en que se halla dividido, de modo que en el caso de producirse una fuga en una zona de la instalación, no afecte al resto del proceso.

2.4.1.3 **Juntas por estanqueidad**

Selección adecuada de tipo de juntas necesarias para que funcione de manera correcta la instalación y así minimizar el riesgo de fuga. No obstante, realizar un mantenimiento periódico.

También es necesario evaluar las actuaciones que se deben llevar a cabo en caso de fuga.

2.4.2 Medidas contra incendios

Existen alarmas de incendio que se activan cuando los detectores de humo se activan o al accionar manualmente el pulsador de alarma.

Hay una red de incendios que se activa cuando se identifica fuego. Además se cuenta con los extintores que por ley tiene que haber.

La fuente de abastecimiento podrá ser un depósito de reserva de agua y grupo de presión contra incendios, según norma UNE-23.500.

Existencia de un plan de evacuación de las diferentes zonas con su correspondiente señalización.

2.4.3 Plan de emergencias

Cada unidad tendrá su plan de emergencias, que considerará las emergencias que pueden producirse, la forma de controlarlas por parte del personal y la posible actuación de servicios externos. Se tendrá en cuenta la aplicación del Real Decreto de Accidentes Mayores.

2.4.4 Equipos de protección personal

La empresa está en la obligación de determinar los puestos de trabajo en los que se deba recurrir a la protección individual y precisar las partes del cuerpo



2. ESTUDIO DE SEGURIDAD Y SALUD

a proteger así como el tipo de equipos de protección individual que deberán utilizarse.

Deberá de dotar a todos los trabajadores de manera gratuita de los equipos de protección individual (EPIs) que el puesto de trabajo requiera.

- Cascos de protección.
- Protectores de los ojos y de la cara.
- Protectores del oído.
- Protectores de las vías respiratorias.
- Guantes de protección.
- Zapatos y botas de seguridad.
- Ropa de protección.

Los equipos para la protección colectiva son los elementos que se instalan en la planta que protegen simultáneamente a todos los trabajadores expuestos a un determinado riesgo, bien cubriendo los elementos peligrosos o evitando el acceso a los mismos.

- Barandillas
- Sistemas de protección de incendios
- Barreras de aire que permiten que éste fluya en una sola dirección y a una velocidad constante creando una verdadera "cortina" que se conoce como flujo de aire laminar.
- Colocación de filtros cuya finalidad principal es atrapar las partículas contenidas en el flujo del aire. Habitualmente se emplean los llamados HEPA, que retienen con una eficacia del 99,97% partículas de hasta 0,3 micras de diámetro
- Equipo de auxilio de urgencia que comprende:
 - Un equipo de primeros auxilios.
 - Una ducha de emergencia para el cuerpo y una ducha para los ojos.

Es necesaria una formación previa de uso de estos equipos para una mejor protección del personal.

2.4.5 Medidas específicas de una planta biotecnológica

2.4.5.1 Comportamiento en el área de trabajo y en lo respectivo a la manipulación de OMG

Técnicas de laboratorio [25]:



2. ESTUDIO DE SEGURIDAD Y SALUD

- Llevar siempre gafas protectoras en la zona de trabajo y cuando se manipulen agentes biológicos.
- Acceso limitado al espacio, permitiendo la entrada únicamente al personal autorizado.
- Limpieza y desinfección diaria de todas las superficies de trabajo, así como siempre que se produzca un derrame.
- Mantenimiento del espacio limpio y ordenado evitando utilizar los pasillos como almacén. Siempre debe quedar un espacio libre no inferior a 120 cm para poder evacuar el local en caso de emergencia.
- Evitar el empleo de libros y material de escritorio en el área de trabajo, ya que el papel contaminado es difícil de esterilizar.
- Recoger siempre agentes biológicos con guantes de látex o de silicona.
- Lavarse las manos tras la recogida de muestras.
- Está rigurosamente prohibido pipetear con la boca. El pipeteo se llevará a cabo con dispositivos especialmente diseñados al efecto, debiendo entrenarse adecuadamente al personal para su correcto uso
- Debe limitarse el uso de agujas hipodérmicas y jeringas, debiendo utilizarse únicamente las unidades ya montadas.
- No debe volver a ponerse la capucha a las agujas y éstas no deben ser dobladas ni separadas de la jeringa.
- Las agujas y jeringas usadas, así como los bisturíes, deben desecharse únicamente en contenedores especiales diseñados para este propósito.
- Cuando se centrifugue material biológico potencialmente infeccioso deben utilizarse tubos cerrados. La centrífuga deberá disponer de rotores o cestillos de seguridad que eviten la formación de aerosoles.
- La rotura accidental de un tubo y su vertido en la cubeta representa una incidencia importante que debe ser comunicada inmediatamente al responsable del laboratorio y al Servicio de Prevención de Riesgos Laborales, procediendo inmediatamente a la desinfección segura del equipo
- No deben utilizarse centrífugas que no dispongan de sistema de cierre de seguridad, ni manipular tales equipos de forma que puedan abrirse mientras están en funcionamiento y formar aerosoles
- Si el laboratorio dispone de ultracentrífugas, es fundamental llevar a cabo el equilibrado cuidadoso del rotor
- Los derrames y accidentes, como cortes y pinchazos, deben ser informados inmediatamente al responsable del laboratorio y al Servicio de Prevención de Riesgos Laborales, y hacerse constar por escrito



2. ESTUDIO DE SEGURIDAD Y SALUD

- Cubrir heridas y lesiones con apósitos impermeables antes de comenzar el trabajo. Si las lesiones no pueden cubrirse adecuadamente, no exponerse hasta que curen
- Evitar el contacto de la piel con materiales potencialmente infecciosos. Para ello, cuando se manipulen muestras que contengan posibles agentes patógenos deberá usarse guantes de látex o de silicona, que deberán retirarse siempre antes de salir del área de trabajo
- Jamás se abandonará el laboratorio con los guantes puestos ni se cogerá con ellos el teléfono
- Tras quitarse los guantes, se procederá al lavado de manos utilizando jabones antisépticos
- Se usarán gafas protectoras y mascarillas faciales si existe riesgo de salpicaduras o de formación de aerosoles
- No deberán usarse lentes de contacto
- El personal con el cabello largo debe llevarlo recogido

2.4.5.2 Transporte del material biológico

- El transporte de las muestras dentro o entre plantas se realizará de tal modo que, en caso de caída, no se produzcan salpicaduras
- Se aconseja llevarlo a cabo en cajas herméticas o neveras portátiles. Estas cajas o neveras deberán ser rígidas y resistentes a los golpes, contar con materiales absorbentes en su interior y de fácil desinfección
- Se etiquetarán o identificarán de forma oportuna y no podrán ser utilizadas para otros fines
- Bajo ningún concepto se transportarán muestras a mano
- Cuando sea necesario transportar material biológico que pueda presentar riesgo de infección, se recurrirá a la utilización del sistema básico de embalaje.

2.4.5.3 Almacenamiento de muestras biológicas

- Las muestras biológicas deben almacenarse en zonas de acceso restringido, con el fin de minimizar la posibilidad de contaminación del personal o del ambiente

2.4.6 Mantenimiento y revisiones

Hay que realizar inspecciones con una frecuencia establecida siguiendo los procedimientos de y control establecidos.

Los principales objetivos del mantenimiento son:



2. ESTUDIO DE SEGURIDAD Y SALUD

- Limitar el envejecimiento del material debido a su funcionamiento.
- Mejorar el estado del material, para su eficaz funcionamiento.
- Intervenir antes de que el coste de la reparación sea demasiado elevado.
- Eliminar o limitar los riesgos de averías en el material imprescindible para el proceso.
- Asegurar el buen estado de los servicios generales.
- Permitir la ejecución de las reparaciones en las mejores condiciones.
- Evitar los consumos exagerados.
- Suprimir las causas de accidentes.
- Minimizar los costos, mientras la instalación permanezca en activo.

La actividad de mantenimiento se divide en tres bloques:

- Resolución de averías.
- Mantenimiento preventivo.
- Mantenimiento correctivo o de mejora.



2.5 HOJAS DE DATOS DE SEGURIDAD

Las hojas de datos de seguridad de los diferentes elementos se encuentran en el anexo VII.

2.6 HAZOP

A continuación se muestra el análisis HAZOP de algunos de los equipos del proceso.



FERMENTADOR F-101				
Palabra guía	Desviación	Causas	Consecuencias	Acciones a tomar
MÁS	Temperatura	1.1 Mal funcionamiento del circuito de agua de refrigeración 1.2 Ruptura del termostato	1.1 Explosión 1.2 Fermentación no se lleva a cabo 1.3 Muerte celular	1.1 Control de la temperatura 1.2 Inspección de los sistemas de control para el buen funcionamiento de estos
	Presión	2.1 Aumenta caudal de entrada de O ₂ 2.2 Fallo de la válvula de venteo	2.1 Explosión 2.2 Fallo en el crecimiento de las bacterias 2.3 Muerte celular	2.1 Se instala controlador de presión PC-01 que controla válvula PV-01. 2.2 Válvula de alivio
	Flujo de entrada	3.1 Control de flujo de TB falla 3.2 Fallo en bomba P-103	3.1 Fugas 3.2 La fermentación no se lleva a cabo	3.1 Control de flujo 3.2 Instalación de drenajes
MENOS	Temperatura	1.1 Mal funcionamiento del agua refrigeración 1.2 Ruptura del termostato	1.1 Fermentación no se lleva a cabo 1.2 Muerte celular	1.1 Control de la temperatura 1.2 Inspección de los sistemas de control para el buen funcionamiento de estos
	Presión	2.1 Fallo en el compresor CP-101, entrada de O ₂	2.1 Fallo en el crecimiento de las bacterias	2.1 Se instala controlador de presión PC-01 que controla válvula PV-01. 2.2 Control de



FERMENTADOR F-101				
Palabra guía	Desviación	Causas	Consecuencias	Acciones a tomar
	Flujo de entrada	2.2 Fallo en la bomba P-103 3.1 Control de flujo de TB falla 3.2 Fallo en bomba P-103 3.3 Tubería rota. 3.4 Tubería atascada	2.2 Implosión 3.1 Fugas 3.2 La fermentación no se lleva a cabo	flujo 3.1 Control de flujo 3.2 Instalación de drenajes 3.3 Inspección periódica de instalación
NO	Flujo	1.1 Control de flujo de TB falla 1.2 Fallo en bomba P-103 3.3 Tubería rota. 3.4 Tubería atascada	1.1 La fermentación no se lleva a cabo	1.1 Igual que en MENOS flujo



TORRE DE DESTILACIÓN T-101				
Palabra guía	Desviación	Causas	Consecuencias	Acciones a tomar
MÁS	Temperatura	1.1 Fallo en el condensador 1.2 Fallo en la medida en la resistencia del calentador 1.3 Fallo en el termostato	1.1 Explosión 1.2 No conseguir disolvente puro 1.3 Condiciones extremas para los materiales 1.4 Obstrucción de las tuberías con elementos arrastrados de residuo	1.1 Instalación de controladores de temperatura 1.2 Revisiones periódicas de los elementos de la torre
	Presión	2.1 Incremento de la temperatura 2.2 Obstrucción de la válvula de reflujo 2.3 Fallo en la bomba P-205	2.1 Baja eficiencia de la destilación. 2.2 Explosión.	2.1 Instalar válvula de seguridad
	Recirculación de flujo	3.1 Fallo en FRT-01	3.1 Descenso de la temperatura 3.2 Ineficiencia en la separación	3.1 Cambiar válvula de reflujo FRT-01
MENOS	Temperatura	4.1 Fallo en FRT-01. Abierta	4.1 No se recupera todo el disolvente	4.1 Instalación de controladores de temperatura



TORRE DE DESTILACIÓN T-101				
Palabra guía	Desviación	Causas	Consecuencias	Acciones a tomar
		4.2 Fallo en la regulación de la temperatura del condensador 4.3 Fallo en el calentamiento de la resistencia		en condensador y sistema de calefacción
NO	Recirculación de flujo	5.1 Fallo en válvula de reflujo FRT-01 5.2 Obstrucción del relleno de la torre	5.1 Incremento de la temperatura 5.2 Separación ineficiente 5.3 Inundación y fuga 5.4 Parada del equipo	5.1 Cambio de la válvula de reflujo 5.2 Cambio del relleno de la torre



2. ESTUDIO DE SEGURIDAD Y SALUD

Tabla 2.3. HAZOP intercambiador de calor HE-101

INTERCAMBIADOR DE CALOR HT-101				
Palabra guía	Desviación	Causas	Consecuencias	Acciones a tomar
MAS	Temperatura	1.1 Fallo en el controlador TC-01 1.2 Elevado flujo de fermentado 1.3 Obstrucción de la válvula de flujo 1.4 Fuga en tubería de refrigeración	1.1 No desciende lo suficiente la temperatura del fermentado antes de llegar a la centrifugación 1.2 Ineficiencia en la posterior centrifugación 1.3 Incremento de la presión	1.1 Inspección periódica de los elementos de control
	Presión	2.1 Fallo en la bomba P-106 2.2 Válvula de salida cerrada	2.1 Ineficiencia del intercambio 2.2 Explosión	2.1 Inspección de la bomba
MENOS	Presión	3.1 Fallo en bomba P-106 3.2 Aumento de pérdidas debido a residuos en las tuberías	3.1 No llega el fluido a la centrifugadora C-101	3.1 Inspección de tuberías y de bomba 3.2 Instalación de drenajes
NO	Flujo de refrigeración	5.1 Válvula FV-01 cerrada 5.2 Fallo en bomba P-118A	5.1 Ineficiencia en el proceso de purificación 5.2 Parada del proceso	5.1 Control periódico del estado del circuito de refrigeración 5.2 Inspección



INTERCAMBIADOR DE CALOR HT-101

Palabra guía	Desviación	Causas	Consecuencias	Acciones a tomar
		5.3 Fugas en circuito de refrigeración		de la válvula de control
	Flujo de fermentado	6.1 Válvula de salida del fermentador obturada 6.2 Mal funcionamiento de bomba P-106	6.1 Gasto energético innecesario de agua de refrigeración	6.1 Control de flujo de refrigeración conectado a caudalímetro en la entrada de caldo del intercambiador

3 IMPACTO AMBIENTAL



3. IMPACTO AMBIENTAL

3.1 INTRODUCCIÓN

Cualquier actividad industrial genera problemas tanto para el medio ambiente como para las personas que estén en las inmediaciones de la planta.

El impacto ambiental puede ser positivo o negativo, dependiendo de si afecta al medio ambiente mejorándole o causándole mal; permanente o temporal, dependiendo de su duración; reversible o irreversible.

La legislación ambiental ha desarrollado una serie de normas que persiguen unos objetivos: reducir al máximo la contaminación, proteger el medio ambiente, mantener la calidad de vida de los individuos, ahorrar energía y aprovechar los residuos obtenidos.

Conociendo la legislación que debe cumplir un proyecto industrial en los diferentes niveles de organización: nivel europeo, nacional, regional y municipal; se van a identificar y cuantificar los diferentes puntos que contribuyen a dañar el Medio Ambiente y así poder proponer medidas para mejorarlo.

El sistema de gestión ambiental constituye un conjunto de elementos administrativos y normativos que dentro de la estructura orgánica de la empresa llevan a cabo la planificación, la instrumentación, el control, la evaluación y el seguimiento de las acciones de protección y conservación del Medio Ambiente y del manejo adecuado de los recursos dentro del ámbito de la empresa y alrededores.

La familia ISO 14000 está compuesta por un grupo de normas, cuyo principal fin es mejorar los resultados ambientales de una organización, sea cual sea su tamaño y grado de implantación en el mundo, ya que se trata de una norma internacional. De esta familia la única que establece requisitos para obtener un certificado es la norma ISO 14001. Esta norma engloba los aspectos ambientales a considerar en proyectos de industria.



3.2 LEGISLACIÓN

A continuación, se enumeran las normas generales de protección ambiental.

UNIÓN EUROPEA

- Reglamento (CE) nº 401/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de abril de 2009, relativo a la Agencia Europea del Medio Ambiente y a la Red Europea de Información y de Observación sobre el Medio Ambiente
- Directiva 2010/75/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 24 de noviembre de 2010, sobre las emisiones industriales (prevención y control integrados de la contaminación).
- Directiva 2003/4/CE, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2003, relativa al acceso del público a la información medioambiental y por la que se deroga la Directiva 90/313/CEE del Consejo.
- Directiva 2004/35/CE, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de abril de 2004, sobre responsabilidad medioambiental en relación con la prevención y reparación de daños medioambientales.

ESPAÑA

- Constitución Española de 27 de diciembre de 1978.
- Ley Orgánica 10/1995, de 23 de noviembre, del Código Penal.
- Ley 27/2006, de 18 de julio, por la que se regulan los derechos de acceso a la información, de participación pública y de acceso a la justicia en materia de Medio Ambiente.
- Resolución de 25 de marzo de 2002, del Instituto de Contabilidad y Auditoría de Cuentas, por la que se aprueban normas para el reconocimiento, valoración e información de los aspectos medioambientales en las cuentas anuales.
- Real Decreto Legislativo 1/2016, de 16 de diciembre, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de prevención y control integrados de la contaminación.
- Ley 21/2013, de 9 de diciembre, de evaluación ambiental.
- Real Decreto 102/2011, de 28 de enero, relativo a la mejora de la calidad del aire.
- Decreto 833/1975, de 6 de febrero, por el que se desarrolla la Ley 38/1972, de 22 de protección del ambiente atmosférico.

CASTILLA Y LEÓN



3. IMPACTO AMBIENTAL

- Decreto legislativo 1/2015, de 12 de noviembre, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Prevención Ambiental de Castilla y León

VALLADOLID

- Reglamento regulador del servicio público de saneamiento municipal: Alcantarillado, Vertidos y Depuración, del Ayuntamiento de Boecillo (Valladolid)



3.3 EVALUACIÓN SIMPLIFICADA DEL IMPACTO AMBIENTAL

A continuación se muestran datos sobre los límites de emisión permitidos.

La Tabla 3.1. Límites de emisión en industria. Fuente: Decreto 833/1975, de 6 de febrero, por el que se desarrolla la Ley 38/1972, de 22 de protección del ambiente atmosférico., muestra datos de emisión permitidos a nivel nacional y la Tabla 3.2., muestra los límites de vertidos en el municipio de Boecillo.

Tabla 3.1. Límites de emisión en industria. Fuente: Decreto 833/1975, de 6 de febrero, por el que se desarrolla la Ley 38/1972, de 22 de protección del ambiente atmosférico.

	Unidad de medida	Niveles de emisión
Contaminantes:		
Partículas sólidas	mg/Nm ³	150
SO ₂	mg/Nm ³	4.300
CO	p.p.m.	500
NO _x (medido como NO ₂)	p.p.m.	300
Flúor total:		
Zonas húmedas de pastizales	mg/Nm ³	40
Otras zonas	mg/Nm ³	80
Cl	mg/Nm ³	230
HCl	mg/Nm ³	460
SH ₂	mg/Nm ³	10

Tabla 3.2. Parámetros límite de vertidos en Boecillo. Fuente BoCyl

Materia en Suspensión (MeS) mg/l 500	pH superior 10
DBO5 mg/l 400	Temperatura °C 40
DQO mg/l 1000	Aceites y grasas mg/l 100
pH inferior 6	Conductividad mS/cm 2500
Aluminio mg/l 5	Zinc mg/l 5
Arsénico mg/l 1	Cloruros mg/l 1.500
Boro mg/l 2	Sulfatos 500
Cianuros mg/l 1	Sulfuros 5
Cobalto mg/l 0,2	Detergentes mg/l 6
Cobre mg/l 3	Fenoles mg/l 3
Cromo hexavalente mg/l 1	Fosfatos mg/l 100
Cromo total mg/l 1	Fósforo Total mg/l 10
Estaño mg/l 2	Nitrógeno Total mg/l 50
Cadmio 1	Sulfatos mg/l 1.000
Hierro mg/l 5	Sulfuros mg/l 3
Manganeso mg/l 2	Selenio mg/l 1
Níquel mg/l 5	Pesticidas totales mg/l 0,1
Mercurio total 0.002	Sangre 0
Piomo mg/l 1	



3.3.1 Consumo de energía y agua

Se ha realizado un cálculo energético de los diferentes equipos que intervienen en el proceso. Se puede ver el cálculo detallado en el ANEXO VI.

Conociendo los kWh aproximados que consume la planta en un año se calcula el equivalente en kg de CO₂ de la huella de carbono. [17]

Tabla 3.3. Huella de carbono de los equipos de la planta. Fuente: elaboración propia.

Gasto energético kWh	Kg CO ₂ equivalente	Kg de CO ₂ /g biopolímero
29789,117	11021,970	5,863

Existen proyectos para compensar las emisiones de CO₂ (reforestación y conservación de bosques, construcción de pequeñas centrales hidroeléctricas...) a los que se aporta una suma de dinero en función de las toneladas de CO₂ equivalente emitidas.

Faltaría sumar el gasto de energía que produce la calefacción y el agua caliente sanitaria, pero eso se encuentra fuera del alcance de este proyecto.

El agua es la sustancia que más se consume en este proyecto, de diferentes formas, agua bidestilada, agua destilada, agua de red, agua de refrigeración.

A continuación, se muestran los consumos de agua de la planta.

Tabla 3.4. Consumo de agua de la planta

	L ciclo	L año	L año/g biopolímero
Agua bidestilada	419	23105	12,290
Agua destilada	994	48594	25,848
Agua de red	2970	152970	81,367
Agua refrigeración	1200	-	-

El circuito de agua de refrigeración consiste en un circuito cerrado por lo que no se considera agua consumida, solamente en la puesta en marcha del proyecto.

EL agua de red es fundamentalmente el agua de lavado. Tiene un mecanismo de control de la conductividad que permite recircular si no supera ciertos valores y así optimizar el consumo de esta.



El resto de aguas no se recupera ya que forman parte de las etapas de producción y entran en contacto con el producto. Parte de esa agua pasa a ser biomasa residual.

3.3.2 Efluentes gaseosos

Las únicas emisiones gaseosas del proceso son las emisiones de CO₂ producidas por la fermentación de las bacterias. No se consideran contaminantes, no proceden de una combustión y no contribuyen al aumento del efecto invernadero. Además, el volumen de producción es pequeño.

3.3.3 Efluentes líquidos

Tabla 3.5. Efluentes líquidos. Fuente: elaboración propia

EFLUENTES LÍQUIDOS	concentración de vertido mg/Nm ³	Volumen L/año	volumen L/g polímero producido
Biomasa	-	13755	7,317
Agua residual	-	20500	10,904
Agua de lavado	-	91782	48,820
Solución NaOH	10666666	30594	16,273
Solución HNO ₃	12607500	30594	16,273

La segunda columna de la Tabla 3.5 contiene datos de concentración de los diferentes vertidos. De los efluentes que aparecen indicados con guion no se pueden calcular datos ya que depende de cómo haya evolucionado la fermentación.

La concentración de los efluentes de NaOH y de HNO₃ se ha calculado a partir de los datos de lavado: 160g de NaOH por cada 15L de agua y 125 ml de HNO₃ por cada 15L de agua. Es una concentración muy elevada. Además, el pH de ambas corrientes se sale de los límites establecidos indicados en la Tabla 3.2, que indica pH mínimo 6 y pH máximo 10, teniendo el efluente de disolución de NaOH un pH superior a 10 y la disolución de HNO₃ un pH inferior a 6. Estas dos corrientes se envían al tanque TK-306.

El volumen/año indicado se ha calculado teniendo en cuenta, como se indica en el apartado 1.5.2, que se hacen un total de 66 ciclos de fermentación y 12 ciclos de modificación de cada polímero.



3. IMPACTO AMBIENTAL

El volumen por gramo se obtiene teniendo en cuenta que al año se van a producir 1880 g de polímero.

3.3.4 Contaminación acústica

La ley por la que se rige este aspecto es la Ley 37/2003, de 17 de noviembre, del ruido (BOE 18/11/2003).

El principal causante de la contaminación acústica va a ser en este caso el ruido de los equipos, concretamente el ruido de las bombas y las bombas de vacío.

Este problema se puede solventar mediante la incorporación de silenciadores de escape y de aspiración.

3.3.5 Impacto visual

El impacto visual va a ser mínimo ya que se va a encontrar en el interior de una nave en un espacio reservado para la industria como lo es el Parque Tecnológico de Boecillo.



3.4 MEDIDAS CORRECTORAS

- Residuos

La biomasa residual se almacena en el tanque de biomasa TK-109 hasta que este se llena. Se le añade legía para matar a las bacterias y posteriormente se lo lleva una empresa para tratarlo y gestionarlo.

Los residuos del tanque TK-306 han sido enviados allí debido a que tienen una conductividad elevada como para volver a ser utilizados. Al mezclar ambas corrientes, una de pH básico y otra de pH ácido la mezcla total se neutraliza. Además, se añade legía para matar a las posibles bacterias que tengan obtenidas del proceso de lavado de los equipos. Con estas condiciones de pH neutro y libre de bacterias vivas se puede verter a la red de alcantarillado.

El hecho de tener un conductivímetro que controle si la disolución de retorno puede ser reutilizada o no conlleva una mejora en el consumo de agua y la optimización en la generación de residuos.

La corriente de agua residual, tanto de la unidad 100 como de la unidad 200 es el agua usado en la diálisis, agua de red con alguna sal que se haya transferido proveniente del polímero, en ningún caso superará los límites de conductividad permitida por lo que dicho efluente se verterá a la red de alcantarillado sin producir un impacto negativo.

- Terreno

Los impactos críticos que se encuentran en este medio son las posibles fugas y derrames de las diversas sustancias que se manipulan en la planta, que pueden filtrarse al subsuelo o a la alcantarilla pública. Para evitar estos focos de contaminación, se construyen barreras físicas para contener los posibles derrames o desbordamientos de los tanques.

Importante también realizar un buen mantenimiento de válvulas y uniones de tuberías para evitar la pérdida de producto.

- Consumo de recursos

El consumo de recursos en la industria es alto por necesidad. La única forma de reducir estos consumos es aumentar la eficiencia energética de los equipos, así como la minimización y reutilización del consumo de agua en la planta y en los usos más domésticos.



3. IMPACTO AMBIENTAL

Para aumentar los rendimientos energéticos y el consumo de materia es necesario invertir en nuevas técnicas de producción y equipos más modernos, y hacer un buen mantenimiento de todas las instalaciones y equipos.

- Paisaje

Como es un área industrializada, el impacto en el paisaje es mínimo, ya que esta área ya tiene muchas compañías de características similares. Además, en el exterior de la nave no va a haber ningún equipo.

- Medios socioeconómicos:

La planta proporciona empleo, esto influye positivamente en el nivel socioeconómico y conduce a la aceptación en la sociedad.

El efecto en las carreteras del área es mínimo debido al gran volumen de vehículos que ya circulan ya que existen muchas compañías en el área y es una zona próxima a la gran ciudad.

4 BALANCE ECONÓMICO



4.1 PRESUPUESTO

En el anexo VIII Presupuesto, se encuentran los precios detallados de los equipos, materias primas, instrumentación, costes indirectos y coste en personal que requiere la planta.

A continuación, se va a plasmar el valor total de los diferentes tipos de costes.

4.1.1 Costes total invertido

Dentro de los costes fijos se engloba, el coste total de todos los equipos del proceso, el coste de instrumentación y control, el coste de la parcela y los costes indirectos.

Para el cálculo de los costes directos se ha consultado a diferentes compañías el precio de cada uno de los equipos del proceso y de los elementos de instrumentación. Algunas de ellas ya se han nombrado en el apartado de diseño de equipos.

4.1.1.1 Costes directos

Tabla 4.1. Costes fijos de la planta

Equipos	764.583 €
Instrumentación	44.959 €
Parcela	150.211,85 €
Total	959.753,85 €

4.1.1.2 Costes indirectos

Se han estimado un número de horas necesarias para la colocación de los equipos y la puesta a punto de todos los elementos de instrumentación.

Tabla 4.2. Costes indirectos de la planta

Montaje y puesta a punto	€/unidad	horas	Coste total
Colocación equipos	40	120	4.800,00 €
Automatización	60	150	9.000,00 €
Ingeniero responsable	60	150	9.000,00 €
		Total	22.800 €

4.1.2 Costes variables anuales

Los costes variables son los referidos a los costes de materias primas, que podrán cambiar según la producción requerida.



4. BALANCE ECONÓMICO



También en estos costes está incluido el gasto energético de los equipos. Se encuentra detallado en el anexo VI.

Tabla 4.3. Costes variables

Coste Fungibles	365.588,08 €
-----------------	--------------

4.1.3 Costes fijos anuales

El precio referido al personal engloba 3 técnicos y un responsable de la producción.

Tabla 4.4. Coste anual en personal

Coste en personal	117.490,32 €
-------------------	--------------

4.1.4 Costes totales

Tabla 4.5. Inversión inicial

Inversión inicial (costes directos y costes indirectos)	982.553,35 €
---	--------------

Tabla 4.6. Costes anuales

Coste en fungibles	365.588,08 €
Coste en personal	117.490,32 €



4.2 ESTUDIO DE LA RENTABILIDAD

Para el estudio de la rentabilidad del proyecto se utilizan los siguientes parámetros:

- VAN (Valor Actual Neto): se basa en estudiar el movimiento de los fondos generados o consumidos por el propio proyecto, debe ser mayor que cero para que el proyecto sea rentable. Se calcula mediante la fórmula:

$$VAN = -A + \sum_{j=0}^{j=n} \frac{Q_j}{(1 + \Pi + r)^n} \quad \text{Ecuación 4.1}$$

Siendo:

A: Desembolso inicial.

Q_j: Es el flujo de caja anual en MM€.

Π: Inflación esperada.

r: Rentabilidad exigida.

j :Es el tiempo para el que se estima el balance económico

- TIR (Tasa Interna de Retorno): Equivale a un tipo de interés anual para el cual el VAN se iguala a cero. Si el TIR es alto, estamos ante un proyecto empresarial rentable, que supone un retorno de la inversión equiparable a unos tipos de interés altos que posiblemente no se encuentren en el mercado. Sin embargo, si el TIR es bajo, posiblemente podríamos encontrar otro destino para nuestro dinero.

$$0 = -A \sum_{j=0}^{j=n} \frac{Q_j}{(1 + TIR)^n} \quad \text{Ecuación 4.2}$$

Para la realización del balance económico se fija una amortización de la planta a 10 años y unos impuestos de 35%.



4. BALANCE ECONÓMICO

Tabla 4.7. Datos del balance económico en MM€.

	Año										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A1.	0,98										
A2.		0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48
A.	-0,98	-0,48									
B1.		1,16	1,16	1,16	1,16	1,16	1,16	1,16	1,16	1,16	1,16
B2.		-0,48	-0,48	-0,48	-0,48	-0,48	-0,48	-0,48	-0,48	-0,48	-0,48
B.		0,68									
C1.		-0,10	-0,10	-0,10	-0,10	-0,10	-0,10	-0,10	-0,10	-0,10	-0,10
C.		0,58									
D1.		-0,20	-0,20	-0,20	-0,20	-0,20	-0,20	-0,20	-0,20	-0,20	-0,20
D.		0,79									
E.	-0,98	0,30									
F.	-0,98	-0,68	-0,38	-0,08	0,23	0,53	0,83	1,13	1,44	1,74	2,04

Tabla 4.8. Leyenda Tabla 26. Datos del balance económico en MM€.

A1.	Capital inmovilizado
A2.	Capital circulante
A.	Fondos invertidos
B1.	Ingresos por ventas
B2.	Costes
B.	Margen Bruto
C1.	Amortización
C.	Beneficio antes de impuestos
D1.	Impuestos
D.	Beneficio después de impuestos
E.	Fondos generados por las operaciones
F.	Movimiento de fondos. Flujo de caja



4. BALANCE ECONÓMICO

Tabla 4.9. VAN y TIR

VAN:	0,97	MM€
TIR:	28%	

El precio del gramo de polímero se ha fijado ajustando el balance para que salga rentable el proyecto. Es decir, $VAN > 0$ y TIR un valor mayor que la tasa mínima de rentabilidad exigida que es de 8%.

1,16MM€ al año de ingresos por ventas lo que implica la venta a **617,02€ gramo de polímero**.

Se trata de un producto de alto valor añadido debido a sus aplicaciones biomédicas.

5 PLIEGO DE CONDICIONES



5. PLIEGO DE CONDICIONES

5.1 OBJETIVO

El objeto del presente Pliego de Condiciones es servir de base a la instalación y montaje de la planta industrial que se describe en este proyecto.

Contiene las condiciones técnicas normalizadas referentes a los materiales y equipos, el modo de ejecución, medición de las unidades de obra y, en general, cuantos aspectos han de regir en los trabajos comprendidas en el presente proyecto.

El contratista está obligado a ejecutar el proyecto según se especifica en el Pliego de Condiciones. Del mismo modo, la administración podrá conocer de forma detallada las diferentes tareas que se desarrollarán durante la ejecución del proyecto.



5. PLIEGO DE CONDICIONES

5.2 PLIEGO DE CONDICIONES GENERALES

El presente Pliego de Condiciones Generales tiene por finalidad regular la ejecución de todas las obras e instalaciones que integran el proyecto en el que se incluye, así como aquellas que estime convenientes su realización la Dirección Facultativa del mismo, estableciendo los niveles técnicos y de calidad exigibles, precisando aquellas actuaciones que correspondan según el contrato y con arreglo a la legislación aplicable, al Propietario de la obra, al Contratista o constructor de la misma, sus técnicos y encargados, al Ingeniero, así como las relaciones entre todos ellos y sus correspondientes obligaciones para el cumplimiento del contrato de obra.

El Contratista estará obligado al cumplimiento de la Reglamentación del trabajo correspondiente, la contratación del Seguro Obligatorio, Subsidio Familiar o de Vejez, Seguro de Enfermedad y todas aquellas reglamentaciones de carácter social vigentes en el momento de la ejecución de los trabajos.

5.2.1 Definiciones

Propietario: Se entenderá por Propietario aquel para el que el Contratista ejecutará los trabajos. Esta definición se extiende a los apoderados del Propietario y a sus representantes legales.

Contratista: Es la persona natural o jurídica, cuya oferta fue aceptada por el Propietario, y con quien ha firmado el correspondiente contrato de ejecución. Comprende asimismo, a sus representantes legales, apoderados y sucesores expresamente aceptados por aquel.

Subcontratista: Es toda persona, natural o jurídica, que tiene una relación contractual no laboral con el Contratista para ejecutar cualquier trabajo o prestar algún servicio, suministro o aprovisionamiento en relación con las obras, sin vinculación alguna con el Propietario, ante quien responderá por la actuación de aquel.

Director de obra: Es la persona natural o jurídica designada por el Propietario para realizar las funciones de dirección de obra previstas, cuyo nombramiento será notificado por escrito al Contratista.

Dirección facultativa: Estará formada por el Ingeniero-Director y por aquellas personas tituladas o no, que al objeto de auxiliar al Ingeniero-Director en la realización de su cometido, ejerzan, siempre bajo las órdenes directas de



5. PLIEGO DE CONDICIONES

éste, funciones de control y vigilancia, así como las específicas por él encomendadas.

5.2.2 Obras que se proyectan-disposiciones

Las obras que se proyectan son las que se especifican en la Memoria y sus anexos, planos y presupuesto, y las necesarias para dejar totalmente terminados los trabajos objeto de este proyecto.

Cualquier excepción o modificación de lo establecido en el Pliego requerirá la notificación por escrito y la aprobación correspondiente al propietario.

5.2.3 Interpretación de las distintas partes del proyecto

En caso de contradicción entre los planos y el Pliego de Prescripciones Técnicas, prevalecerá lo indicado en este último. Lo mencionado en el Pliego de Prescripciones Técnicas y omitido en los planos o viceversa, habrá de ser aceptado como si estuviese expuesto en ambos documentos, siempre que, a juicio del director de obra, quede suficientemente definida la unidad de obra correspondiente y esta tenga precio en el contrato.

En todo caso, las contradicciones, omisiones o errores que se adviertan en estos documentos por el Director de obra o Contratista deberán reflejarse en el acta de comprobación.

5.2.4 Trabajos preparatorios

Los trabajos preparatorios para el inicio de las obras consistirán en:

- Comprobación del replanteo.
- Fijación y conservación de los puntos del replanteo.
- Programación de los trabajos.

5.2.4.1 **Comprobación del replanteo**

En el plazo de quince días a partir de la adjudicación definitiva se comprobarán, en presencia del adjudicatario o de su representante, el replanteo de las obras efectuadas antes de la licitación, extendiéndose la correspondiente acta de comprobación del replanteo.



5. PLIEGO DE CONDICIONES

El acta de comprobación del replanteo reflejará la conformidad o la disconformidad del replanteo respecto a los documentos contractuales del proyecto, refiriéndose expresamente a las características geométricas de los trabajos, así como a cualquier punto que en caso de disconformidad pueda afectar al cumplimiento del contrato.

Cuando el acta de comprobación del replanteo refleje alguna variación respecto a los documentos contractuales del proyecto, deberá ser acompañada de un nuevo presupuesto, valorado a los precios del contrato.

5.2.4.2 Fijación de los puntos de replanteo

La comprobación del replanteo deberá incluir como mínimo los datos y referencias previstos para poder materializar las obras, así como los puntos fijos o auxiliares necesarios para los sucesivos replanteos de detalles y de otros elementos que puedan estimarse precisos.

Los puntos de referencia para los sucesivos replanteos se marcarán con los medios adecuados para evitar su desaparición. Los datos, cotas y puntos fijados se anotarán en un anexo al acta de comprobación del replanteo, el cual se unirá al expediente de las obras, entregándose una copia al contratista. El contratista se responsabilizará de la conservación de las señales de los puntos que hayan sido entregados.

5.2.4.3 Programación de los trabajos

En el plazo que se determine en días hábiles a partir de la aprobación del acta de comprobación del replanteo, el adjudicatario presentará el programa de trabajos de las obras.

Dicho programa de trabajo incluirá los siguientes datos:

- Fijación de las clases de obras y trabajos que integran el proyecto e indicación de las mismas.
- Determinación de los medios necesarios (instalaciones, equipos y materiales).
- Valoración mensual y acumulada de la obra, programada sobre la base de los precios unitarios de adjudicación.
- Representación gráfica de las diversas actividades, en un gráfico de barras o en un diagrama espacio - tiempo.



5. PLIEGO DE CONDICIONES

5.2.5 Obligaciones y responsabilidad del contratista

El Contratista queda sometido al cumplimiento de las prescripciones técnicas contenidas en este Pliego de Condiciones. Si los trabajos exigiesen su realización por personal especializado, la Dirección Facultativa, podrá en todo momento solicitar al Contratista la presentación de los documentos necesarios que acrediten la adecuada titulación del personal.

En la ejecución de los trabajos que se hayan contratado, la empresa contratista será la única responsable, no teniendo en derecho a indemnización alguna por el mayor precio que pudiera costarle o por las erróneas maniobras que cometiese durante su construcción, siendo por su cuenta y riesgo e independiente de la inspección de la Dirección Facultativa.

Asimismo, el Contratista será responsable de los accidentes que pudieran sobrevenir a todo el personal, debiendo atenerse a las disposiciones de la Policía Urbana y Leyes comunes sobre la materia, Reglamentación de Seguridad e Higiene en el trabajo, etc., y lo mismo para cualquier persona con autorización para entrar en la obra.

5.2.6 Personal y medios auxiliares

Será obligación de la Contrata disponer con la suficiente antelación de toda clase de personal cualificado, debiéndolo sustituir cuando, a juicio de la Dirección Facultativa, no reúna las características de trabajo que se le encomiende o carezca de las condiciones precisas para la convivencia en el trabajo que le corresponda.

El personal estará dado de alta en la Seguridad Social y deberá disponer de los correspondientes equipos de protección individual.

5.2.7 Recepción del material

El Director de Obra, de acuerdo con el Contratista, dará su aprobación a los materiales suministrados y confirmará su validez para una instalación correcta. La vigilancia y conservación de los materiales será por cuenta del Contratista.



5.2.8 Ejecución de las obras

Las obras se ejecutarán conforme al Proyecto, a las condiciones contenidas en el presente Pliego de Condiciones Generales y en el pliego particular, si lo hubiera y de acuerdo con las especificaciones señaladas en el Pliego de Condiciones Técnicas. El Contratista, salvo aprobación por escrito del Director de Obra, no podrá realizar ninguna alteración o modificación de cualquier naturaleza en los datos fijados en Proyecto. El Contratista no podrá utilizar en los trabajos personal que no sea de su exclusiva cuenta y cargo.

El Contratista deberá tener al frente de los trabajos un técnico suficientemente especializado, a juicio del Director de Obra.

5.2.9 Plazo de ejecución

Los plazos de ejecución, totales y parciales, indicados en el contrato, empezarán a contar a partir de la fecha del replanteo de las obras. El Contratista estará obligado a cumplir los plazos señalados, que serán improrrogables. No obstante lo anteriormente indicado, los plazos podrán ser objeto de modificaciones cuando los cambios determinados por el Director de Obra y debidamente aprobados por el Contratante influyan realmente en los plazos señalados en el contrato. Si por causas ajenas al Contratista, no fuera posible comenzar los trabajos en la fecha prevista, o tuvieran que ser suspendidos una vez empezados, se concederá por el Director de Obra la prórroga estrictamente necesaria.

5.2.10 Recepción provisional

Para proceder a la recepción provisional de las obras será necesaria la asistencia del propietario, del Ingeniero Director de la obra y del Contratista o su representante debidamente autorizado.

Si las obras se encuentran en buen estado y han sido ejecutadas con arreglo a las condiciones establecidas, se darán por percibidas provisionalmente, comenzando a correr en dicha fecha el plazo de garantía, que se considerará de tres meses.

Cuando las obras no se hallen en estado de ser recibidas, se hará constar en el acta y se especificarán en la misma las precisas y detalladas instrucciones que el ingeniero director debe señalar al contratista para remediar los defectos observados, fijándose un plazo para subsanarlos, expirado el cual,



5. PLIEGO DE CONDICIONES

se efectuará un nuevo reconocimiento en idénticas condiciones a fin de proceder a la recepción provisional de la obra.

Después de realizar un escrupuloso reconocimiento y si la obra estuviese conforme con las condiciones de este Pliego, se levantará un acta por duplicado, a la que acompañarán los documentos justificantes de la liquidación final. Una de las actas quedará en poder de la propiedad y la otra se entregará al contratista

5.2.11 Plazo de garantía

Desde la fecha en que la recepción provisional quede hecha, comienza a contratarse el plazo de garantía que será de un año. Durante este periodo, el Contratista se hará cargo de todas aquellas reparaciones de desperfectos imputables a defectos y vicios ocultos.

5.2.12 Recepción definitiva

Una vez finalizado el plazo de garantía señalado, se procederá a la recepción definitiva de las obras, con la concurrencia del Director de Obra y del representante del Contratista, levantándose, si las obras son conformes, el Acta correspondiente, por duplicado, firmada por el Director de Obra y el representante del Contratista y ratificada por el Contratante.

5.2.13 Calidad de los materiales

Los materiales que se emplearán en la construcción y montaje de esta planta deberán cumplir las normas UNE en vigor que les afecte y los requisitos indicados en el Pliego de Condiciones. En caso contrario serán otorgados como defectuosos y retirados de la zona de la obra a no ser que el ingeniero considere lo contrario.

Los materiales rechazados, de los cuales sus defectos se hayan corregido, no se utilizarán mientras no se les haya otorgado la aprobación.

Los materiales empleados de las partes en contacto con la solución serán:

- Tanques, agitadores, fermentador: AISI 316
- Intercambiador de calor: AISI 316
- Reactor: vidrio
- Filtros: poliestireno; membrana: poliestersulfona
- Torre de destilación: borosilicato



Todo ello perfectamente esterilizado antes de su uso.

Los materiales del resto de partes vienen indicados en el ANEXO III: Diseño de equipos y en el ANEXO IX Catálogos.

5.2.14 Personal técnico

El contratista está obligado a dedicar a los trabajos personal técnico cualificado responsable de la instalación y montaje de las líneas que estará a pie de obra.

El personal así designado no será asignado a otras obligaciones mientras duren los trabajos.

Por otra parte, el personal a cargo del contratista deberá estar lo suficientemente cualificado para la realización de los trabajos. Es responsabilidad del contratista, por lo tanto, cualquier retraso derivado de la incompetencia o ignorancia del personal a su cargo.

El director podrá prohibir la presencia en la zona de trabajos de determinado personal del contratista por motivo de falta de obediencia o respeto, o por causa de actos que comprometan o perturben, a su juicio, la seguridad, integridad o marcha de los trabajos.

El contratista podrá recurrir, si entendiéndose que no hay motivo fundado para dicha prohibición.

5.2.15 Libro de órdenes

Se dispondrá en la propia obra de un Libro de Órdenes, en donde se recogerán todas las incidencias, modificaciones, aclaraciones, etc., que surjan durante el desarrollo de los trabajos.

El Director de Obra, en ejercicio de sus atribuciones, velará por el cumplimiento de los requisitos especificados en el proyecto, así como de las exigencias de las disposiciones legales que sean de aplicación, y en especial aquellas que afecten al buen funcionamiento de las instalaciones y a la seguridad de las personas.

El Libro de Órdenes, como instrumento destinado a garantizar estos extremos, dejará constancia del desarrollo de la obra, conteniendo las firmas de la Dirección Facultativa y de quienes ejerzan como promotores, empleando a tal efecto cuantas copias fueran necesarias.



5. PLIEGO DE CONDICIONES

5.3 PLIEGO DE PRESCRIPCIONES TÉCNICAS PARTICULARES

5.3.1 Normas de diseño utilizadas

- API 650: Welded Steel Tanks
- ANSI: American National Standard Institute.
- ASME B36.19M-2004: Stainless Steel Pipe
- ASME B36.10M-2004: Welded and Seamless Wrought Steel Pipe
- Norma UNE EN-ISO 10628
- ISA S5.1

5.3.2 Definiciones

Con el objetivo de que se entienda todo lo expuesto en este Pliego de Condiciones Técnicas se definen a continuación, los parámetros técnicos utilizados.

- Presión de diseño ($P_{\text{DISEÑO}}$): Se entiende como el valor de la presión que se toma para el cálculo del espesor del aparato, a la temperatura de diseño. La presión de diseño no podrá ser menor que la presión máxima de servicio.
- Presión máxima (PMO): Se entiende como la presión más alta que se puede dar en el aparato o sistema, en condiciones extremas de funcionamiento del proceso.
- Presión alivio: Se entiende como la presión a la que están tarados los elementos de seguridad que protegen al aparato o al sistema.
- Presión de operación (Pop.): Se entiende como la presión normal de trabajo del aparato o sistema a la temperatura de servicio.
- Presión shut-off ($P_{\text{shut-off}}$): Máxima presión de una bomba cuando el caudal que circula por ella es nulo (La válvula a la salida de la bomba está cerrada, con el fluido en contacto con el rodete)
- Presión de prueba (P_p): Se entiende como aquella presión a la que se somete el aparato o sistema para comprobar su resistencia en las condiciones estáticas para las que fue diseñado. Corresponde a la mayor presión efectiva que se ejerce en el punto más alto del aparato o sistema durante la prueba de presión.
- Temperatura de diseño ($T_{\text{DISEÑO}}$): Es el valor de la temperatura que se toma para el cálculo del espesor del aparato.
- Temperatura máxima de operación ($T_{\text{máx.operación}}$): Es el máximo valor de la temperatura que se estima puede producirse en el interior del aparato o sistema, en condiciones extremas de funcionamiento.



5. PLIEGO DE CONDICIONES

- Temperatura de operación ($T_{\text{operación}}$): Es el valor de la temperatura alcanzada en el interior del aparato o sistema en condiciones normales de funcionamiento a la presión de servicio.

5.3.3 Instalación mecánica

5.3.3.1 Tuberías

Las tuberías que forman parte de las instalaciones receptoras han de ser de acero inoxidable 316, cuyo tamaño está normalizado en ASME B36.19M-2004. Las tuberías de la parte del circuito de refrigeración, no van a ser de inoxidable, estas siguen la norma ASME B36.10M-2004.

- Presión de diseño:
 - Tubería conectada a un equipo: $P_{\text{DISEÑO}} = P_{\text{DISEÑO EQUIPO}}$
 - Línea con válvula de seguridad: $P_{\text{DISEÑO}} = P_{\text{TARADO}}$
 - Impulsión bomba: $P_{\text{DISEÑO}} = 1,2(P_{\text{MÁX,ASPIRACIÓN}} + \Delta P_{\text{PROYECTO,bomba}})$
- Temperatura de diseño:
 - Tuberías metálicas no aisladas (ANSI B 31.3)
 - Si $T_{\text{FLUIDO}} < 38^{\circ}\text{C} \rightarrow T_{\text{DISEÑO}} = T_{\text{FLUIDO}}$
 - Si $T_{\text{FLUIDO}} \geq 38^{\circ}\text{C} \rightarrow T_{\text{DISEÑO}} = 0,95 \cdot T_{\text{FLUIDO}}$
 - Tuberías metálicas con aislamiento externo: $T_{\text{DISEÑO}} = T_{\text{FLUIDO}}$
 - En ausencia de datos: $T_{\text{DISEÑO}} = T_{\text{OPERACIÓN}} + 30^{\circ}\text{C}$
- Pérdidas de carga aceptables cuando el fluido es un líquido:
 - Succión de bomba: $-\Delta P < 2 \text{ bar/km}$
 - Impulsión: $-\Delta P < 5 \text{ bar/km}$
 - Por gravedad: $-\Delta P < 0,3 \text{ bar/km}$

El tiempo de vida útil de las tuberías es de 20 años.

5.3.3.2 Características: diámetros, longitudes y espesores

Las medidas y tolerancias de los accesorios de inoxidable serán acordes con las características dimensionales del tubo al que han de unirse. Los accesorios para realizar soldadura TIG y los de soldadura manual deberán ser compatibles con el tubo al que han de soldarse.

5.3.3.3 Uniones

La unión de los tubos tanto los de acero como los de acero inoxidable 316 se realizarán por soldadura TIG.



5. PLIEGO DE CONDICIONES

El proceso de soldadura **TIG** (Tungsten Inert Gas), es un tipo de soldadura por arco bajo la protección de gas con electrodo (no consumible), se usa un arco eléctrico como fuente de energía que se establece entre el electrodo no consumible y la pieza a soldar con la envoltura protectora del gas inerte. Cuando se usa material de relleno, éste se proporciona mediante el uso de varillas, de la misma forma que en la soldadura de oxiacetileno.

Durante el proceso, la antorcha TIG debe estar conectada al polo negativo (-) y la pinza de masa al polo positivo (+).

La ventaja de este método de soldadura es, básicamente, la obtención de cordones más resistentes, más dúctiles y menos sensibles a la corrosión que en el resto de procedimientos, ya que el gas protector impide el contacto entre el oxígeno de la atmósfera y el baño de fusión.

Los accesorios para la ejecución de uniones, derivaciones, codos, curvas, etc., mediante soldadura, estarán fabricados con inoxidable 316 de las mismas características que las del tubo al que han de unirse mediante soldadura TIG.

Las uniones de los tubos entre sí y de éstos con los accesorios, se harán de acuerdo con los materiales en contacto y de modo que la ejecución de las operaciones se lleve a cabo de forma que no se llegue a provocar pérdidas de estanqueidad en las uniones.

Durante el premontaje las uniones de acero inoxidable se realizarán mediante soldadura TIG, siempre que sea posible, y para el montaje in-situ mediante soldadura manual de aportación.

5.3.3.4 Elementos de sujeción de tuberías

Las tuberías que se instalen, deberán estar convenientemente sujetas a las paredes o techos mediante elementos de sujeción del tipo abrazaderas o soportes guía.

El diseño de los elementos de sujeción mencionados, es decir, los abarcones y los soportes guía, ha de ser tal que cumplan las siguientes condiciones: El anclaje de la abrazadera ha de poder realizarse directamente a la pared, bien por empotramiento o bien atornillada con tacos de expansión. El anclaje del soporte-guía se realizará por empotramiento en la pared o techo.

El sistema de fijación del abarcón a la tubería no ha de poder realizarse manualmente ni por presión, sino que para su montaje y desmontaje deberá utilizarse un útil adecuado (destornillador, llave fija, etc.).



5. PLIEGO DE CONDICIONES

El diseño del abarcón ha de ser tal que en ningún caso pueda producirse contacto de la tubería con la pared, techo o soporte. Los abarcones de sujeción que seguirán la norma AISI-304 INOX 18/10 A-2. Deben ser situados de tal manera que quede asegurada la estabilidad y alineación de la tubería.

Han de estar contruidos con materiales metálicos de probada resistencia mecánica y química (acero inoxidable 304 o 316L) no deberán estar en contacto directo con la tubería, sino que deberán aislarse de la misma a través de un revestimiento, banda de elastómero o material plástico preferentemente, o bien encintando convenientemente la tubería en la zona de contacto.

5.3.3.5 Pruebas para las tuberías

Para todas las tuberías contempladas en este proyecto se realizarán las siguientes pruebas y comprobaciones en el lugar de emplazamiento:

1. Examen visual, control de espesores e identificación de los materiales.
2. Primera prueba de presión, en el caso de no haber sido probadas en el taller.
3. Prueba de los sistemas antes de la puesta en marcha.
4. Prueba hidrostática.

Se deberá comprobar hidrostáticamente todas las líneas y equipos después de terminar la construcción del circuito, con los equipos interconectados entre sí (comprobación del sistema). El sistema se llenará con agua y se comprobará al menos a 1,25 veces la presión de diseño.

Las válvulas de control y placas de orificio deberán quitarse de servicio, así como los instrumentos. Las válvulas de seguridad estarán aisladas. Las secciones cuyas presiones de prueba sean diferentes serán separadas mediante juntas ciegas temporales.

Durante la prueba, se comprobará que no existen fugas, especialmente por las bridas atornilladas y por los asientos de las válvulas.

5.3.3.6 Instalación electroneumática

Todos los materiales a emplear en la presente instalación serán de primera calidad y reunirán las condiciones exigidas en el Reglamento Electrotécnico para Muy Baja Tensión y demás disposiciones vigentes referentes a materiales y prototipos de construcción.



5. PLIEGO DE CONDICIONES

Todos los materiales podrán ser sometidos a los análisis o pruebas, por cuenta de la contrata, que se crean necesarios para acreditar su calidad. Cualquier otro que haya sido especificado y sea necesario emplear deberá ser aprobado por la Dirección Técnica, bien entendiendo que será rechazado el que no reúna las condiciones exigidas por la buena práctica de la instalación.

Los materiales no consignados en proyecto que dieran lugar a precios contradictorios reunirán las condiciones de bondad necesarias, a juicio de la Dirección Facultativa, no teniendo el contratista derecho a reclamación alguna por estas condiciones exigidas.

5.3.3.7 Canalizaciones eléctricas

Los cables se colocarán dentro de tubos o canales, fijados directamente sobre las paredes, directamente empotrados en estructuras, bajo molduras, en bandeja o soporte de bandeja.

Durante el desmantelamiento o el desplazamiento de elementos eléctricos se retirarán y modificarán todos aquellos soportes que requiera la nueva instalación. Todo ello bajo la autorización de la dirección de obra.

Antes de iniciar el tendido de la red de distribución, deberán estar ejecutados los elementos estructurales que hayan de soportarla o en los que vaya a ser empotrada: forjados, tabiquería, etc. Deberá replantearse sobre ésta en forma visible la situación de las cajas de mecanismos, de registro y protección, así como el recorrido de las líneas, señalando de forma conveniente la naturaleza de cada elemento.

5.3.3.8 Condiciones para las válvulas

Las válvulas serán del tipo que la dirección de la obra estime el más adecuado de cara a la línea y servicio en que vayan a ser instaladas. Estarán libres de defectos, irregularidades, etc., que puedan dificultar su instalación o montaje, o que puedan afectar negativamente a su comportamiento durante el proceso.

Durante su instalación se tendrá especial cuidado de alinear correctamente los extremos con la tubería en la que vayan a ser instaladas.

El apriete de los espárragos se hará con llave dinamométrica, previa introducción de las correspondientes juntas.



5. PLIEGO DE CONDICIONES

Hay varios tipos de válvulas, todas ellas debidamente representadas en el diagrama P&ID según la Norma UNE EN-ISO 10628 de simbología de equipos. En el plano PFD 100 se indica el símbolo de cada una de ellas.

- Válvula de paso
- Válvula de globo
- Válvula de control
- Válvula antirretorno
- Válvula on/off
- Válvula de compensación
- Válvula de estrechamiento
- Válvula de seguridad

Todas ellas tendrán el diámetro correspondiente a la tubería que acompañan. Las válvulas de seguridad serán de $\frac{3}{4}$ " como mínimo.

5.3.3.9 Condiciones para las juntas

Las juntas serán espirometálicas o de amianto encamisadas. Estarán libres de defectos, irregularidades, etc., que puedan dificultar su instalación o montaje, o que puedan afectar negativamente a su comportamiento durante el proceso.

5.3.3.10 Equipos de proceso

- Presión de diseño:
 - De 0 a 1 bara \rightarrow 3,5 barg
 - 1 bara \rightarrow la mayor de:
 - $P_{\text{diseño}} = 1,1 \cdot P_{\text{operación}}$
 - $P_{\text{diseño}} = P_{\text{shut off}}$ \rightarrow si hay una bomba aguas arriba y una válvula aguas abajo
 - $P_{\text{diseño}} = P_{\text{alivio}}$ (PSV) \rightarrow válvula de seguridad
- Temperatura de diseño:
 - $T > 0 \text{ } ^\circ\text{C}$ \rightarrow La mayor de:
 - $T_{\text{diseño}} = T_{\text{operación}} + 20 \text{ } ^\circ\text{C}$
 - $T_{\text{diseño}} = T_{\text{máx.operación}} + 5 \text{ } ^\circ\text{C}$
 - $T < 0 \text{ } ^\circ\text{C}$ \rightarrow $T_{\text{diseño}} = T_{\text{operación}} - 5 \text{ } ^\circ\text{C}$
- Ratio L/D:
 - $P < 17.5 \text{ barg}$ \rightarrow L/D = 1,5 a 3
 - $17.5 < P < 35 \text{ barg}$ \rightarrow L/D = 3 a 4



5. PLIEGO DE CONDICIONES

- $P > 35 \text{ barg} \rightarrow L/D = 4 \text{ a } 6$

Presión máxima permisible del equipo: Presión de diseño.

Para todos los tanques, agitadores y fermentador de esta planta, como no se trabaja con presiones altas, tendrá un valor de 3,5 barg.

En caso de que supere dicho valor disponen de una válvula de seguridad tarada a la presión de diseño.

El tiempo de vida útil de estos equipos es de 30 años.

5.3.3.11 Bombas

Será capaz de suministrar el caudal a la presión que se detalla en la Memoria y anexo de diseño; será de las características específicas. La casa comercial suministradora de las bombas se responsabilizará del transporte e instalación definitiva y la comprobación del buen funcionamiento, según las pruebas que el Ingeniero Director estime oportunas.

La parte en contacto de las bombas con el producto va a ser de acero inoxidable 316 a excepción de las bombas del circuito de refrigeración que será de otro material.

Especificaciones de diseño indicadas en el anexo de diseño.

Se dispondrá de al menos 2 bombas de recambio de cada tipo para cubrir posibles averías.

5.3.3.12 Condiciones para las purgas y venteos

Las purgas y los venteos de las líneas y equipos principales serán de $\frac{3}{4}$ " como mínimo, y dispondrán de válvulas de compuerta soldadas como elementos de cierre.

5.3.3.13 Elementos de seguridad

Todos los aparatos y sistemas comprendidos en el presente proyecto deben ir provistos de los elementos de seguridad que prescriban los códigos de diseño empleados y los adicionales especificados en el manual de diseño.

Todas las válvulas de seguridad deben ser de apertura total y sistema de resorte, debiéndose cumplir la condición de que la apertura total de la válvula



5. PLIEGO DE CONDICIONES

deberá ser ayudada por la presión del fluido evacuado, de tal manera que la apertura asegure una sección de paso a través de la válvula igual al 80 % de la sección neta de paso en el asiento después de la deducción de la sección transversal de los obstáculos en el orificio, debido a las guías y a la forma del cuerpo de la válvula en la posición de apertura máxima.

No se permitirá el uso de válvulas de seguridad de peso ni de palanca de contrapeso.

La descarga de las válvulas de seguridad deberá realizarse de tal forma que impida eficazmente que el fluido evacuado pueda producir daños a personas o cosas.

Durante las inspecciones interiores periódicas de los aparatos o sistemas a presión la válvula o válvulas de seguridad que protejan dichos aparatos o sistemas se desmontarán y ajustarán para, a continuación, probarlas y precintarlas.

5.3.3.14 Lavado del equipos

Esta operación tiene por objeto eliminar cuerpos extraños que, durante el montaje, hayan podido quedar en las líneas o en los equipos, tales como virutas de metal o de madera.

Estos restos pueden provocar durante la operación atascos en las líneas, bloqueos en válvulas o destrozamiento de partes móviles de las bombas.

El lavado se llevará a cabo mediante circulación de agua, a la que previamente se habrá añadido la cantidad adecuada de inhibidor de corrosión.

Las bombas habrán sido alineadas, comprobadas y rodadas de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se instalarán en ellas filtros de aspiración, que deberán limpiarse tan a menudo como sea necesario. Mientras dure el rodaje de las máquinas se vigilarán estrechamente todos los aspectos relacionados con sobrecalentamientos, vibraciones, posibles fugas y consumo eléctrico de motores.

Durante el lavado en los puntos bajos, líneas desconectadas, etc., se debe purgar para eliminar materiales sólidos. El cambiador de calor será incluido en el circuito al final de la operación, así como las conexiones a los instrumentos, teniendo sus purgas abiertas.



5. PLIEGO DE CONDICIONES

Cuando se observe que los filtros instalados en las bombas han dejado de ensuciarse y el agua que se purga aparece limpia, puede darse por concluida la operación de lavado. Se parará entonces la circulación y se drenará completamente de agua el sistema.

Por último, se instalarán las válvulas automáticas y las placas de orificio, verificándose su posición.

5.3.3.15 Comprobación de servicios auxiliares

- Red eléctrico

Se comprobará la tensión de los equipos. Esta debe de ser de 220 V.

- Red contra incendios

Se comprobará la llegada de agua a los hidrantes, así como el libre y rápido acceso a los mismos.

También se comprobará que funcionan los detectores de humo.

Esto se va a hacer al inicio, justo antes de la puesta en marcha de la planta y posteriormente como medida preventiva se realizará cada 6 meses.

- Sistema de drenaje

Se comprobará que todos los drenajes y arquetas desalojan adecuadamente.

- Seguridad

Se comprobará que todas las válvulas de seguridad estén instaladas sin discos ciegos ni cerrojos.

5.3.3.16 Requerimientos técnicos del contrato de mantenimiento

Se realizará un contrato de mantenimiento preventivo y correctivo, al menos, de tres años.

El mantenimiento preventivo implicará, como mínimo, una revisión anual.

El contrato de mantenimiento de la instalación incluirá las labores de mantenimiento de todos los elementos de la instalación aconsejados por los diferentes fabricantes.



5. PLIEGO DE CONDICIONES

Se definen dos escalones de actuación para englobar todas las operaciones necesarias durante la vida útil de la instalación, para asegurar el funcionamiento, aumentar la producción y prolongar la duración de la misma:

- Mantenimiento preventivo
- Mantenimiento correctivo

Plan de mantenimiento preventivo: operaciones de inspección visual, verificación de actuaciones y otras, que aplicadas a la instalación deben permitir mantener, dentro de límites aceptables, las condiciones de funcionamiento, prestaciones, protección y durabilidad de la instalación.

Plan de mantenimiento correctivo: todas las operaciones de sustitución necesarias para asegurar que el sistema funcione correctamente durante su vida útil. Incluye:

- La visita a la instalación en los plazos indicados y cada vez que el usuario lo requiera por avería grave en la instalación.
- El análisis y presupuestación de los trabajos y reposiciones necesarias para el correcto funcionamiento de la misma.
- Los costes económicos del mantenimiento correctivo, con el alcance indicado, forman parte del precio anual del contrato de mantenimiento.

Podrán no estar incluidas ni la mano de obra, ni las reposiciones de equipos necesarias más allá del período de garantía.

El mantenimiento debe realizarse por personal técnico cualificado bajo la responsabilidad de la empresa instaladora.

El mantenimiento preventivo de la instalación incluirá una visita anual en la que se realizarán, como mínimo, las siguientes actividades:

- Verificación del funcionamiento de todos los componentes y equipos.
- Revisión del cableado, conexiones, pletinas, terminales, etc.
- Comprobación del estado de los módulos: situación respecto al proyecto original, limpieza y presencia de daños que afecten a la seguridad y protecciones.
- Estructura soporte: revisión de daños en la estructura, deterioro por agentes ambientales, oxidación, etc.



- Instrumentación: estado de indicadores y alarmas.
- Comprobación del estado de los elementos de seguridad.

Las operaciones de mantenimiento realizadas se registrarán en un libro de mantenimiento.

Garantías

Ámbito general de la garantía:

- Sin perjuicio de una posible reclamación a terceros, la instalación será reparada de acuerdo con estas condiciones generales si ha sufrido una avería a causa de un defecto de montaje o de cualquiera de los componentes, siempre que haya sido manipulada correctamente de acuerdo con lo establecido en el manual de instrucciones.
- La garantía se concede a favor del comprador de la instalación, lo que deberá justificarse debidamente mediante el correspondiente certificado de garantía, con la fecha que se acredite en la entrega de la instalación.

Plazos

- El suministrador garantizará la instalación durante un período mínimo de tres años, para todos los materiales utilizados y el montaje. Para los módulos fotovoltaicos, la garantía será de ocho años.
- Si hubiera de interrumpirse la explotación del sistema debido a razones de las que es responsable el suministrador, o a reparaciones que haya de realizar para cumplir las estipulaciones de la garantía, el plazo se prolongará por la duración total de dichas interrupciones.



5.4 PLIEGO DE CONDICIONES LEGALES

5.4.1 Jurisdicción

El Contrato se formalizará mediante documento privado o público a petición de cualquiera de las partes y con arreglo a las disposiciones vigentes. En el contrato se especificará las particularidades que convengan a ambas partes. El Contratista y el Propietario, antes de firmar el documento, firmarán el pie del Pliego de Condiciones.

El Contratista convocado, tiene derecho a sacar copias, a su costa, de los Planos, Pliegos de Condiciones y demás documentos que los Contratistas e Industriales precisen, para redactar proposiciones de Presupuesto.

Ambas partes se comprometen en sus diferencias al arbitraje de equidad, que se ofrecerá a la Dirección Facultativa.

El Contratista es responsable de la ejecución de las obras en las condiciones establecidas en el Contrato y en los documentos que componen el desarrollo técnico del Proyecto. Como consecuencia de ello, vendrá obligado el desmontaje o reconstrucción de todo lo mal ejecutado, sin que pueda servir de excusa el que la Dirección Facultativa hayan examinado y reconocido la Construcción durante las obras, ni el que le hayan sido abonadas en liquidaciones parciales.

5.4.2 Accidentes de trabajo

En caso de accidentes ocurridos con motivo y en el ejercicio de los trabajos para el montaje de la planta, el Contratista se atenderá a lo dispuesto a estos respectos, en la legislación vigente, y siendo, en todo caso el único responsable de su cumplimiento y sin que por ningún conducto pueda quedar afectada la Propiedad por responsabilidades en cualquier aspecto.

El Contratista será responsable de todos los accidentes que por inexperiencia o descuido sobrevengan, durante la ejecución de los trabajos de instalación. Será por tanto de su cuenta el abono de las indemnizaciones a quien corresponda y cuando ello hubiera lugar, de todos los daños y perjuicios que se puedan causar.

El Contratista cumplirá los requisitos que prescriben las disposiciones vigentes sobre la materia, debiendo exhibir, cuando a ello fuera requerido, el justificante de tal cumplimiento.



5. PLIEGO DE CONDICIONES

5.4.3 Pago de arbitrios

En caso de necesitar algún tipo de arbitrio, éste se llevará a cabo por la jurisprudencia municipal o comarcal en la que se sitúe la empresa constructora sometiéndose ésta a las leyes y normas del citado municipio o comarca.

El pago se deberá hacer durante el tiempo de ejecución y correrá a cargo de la Contrata, siempre que en las condiciones particulares del Proyecto no estipule lo contrario.

5.4.4 Causas de rescisión del contrato

Se considerarán causas suficientes de rescisión las que a continuación se señalan:

1. La muerte o incapacidad del Contratista
2. La quiebra del Contratista
3. Las alteraciones del contrato por las causas siguiente:
 - a. La modificación del Proyecto de forma tal que presente alteraciones fundamentales del mismo a juicio del Ingeniero Director, y en cualquier caso siempre que al variación del Presupuesto de ejecución, como consecuencia de estas modificaciones, represente en más o menos, del 40 %, como mínimo, de algunas unidades del Proyecto modificadas.
 - b. La modificación de unidades de obra, siempre que estas modificaciones representes variaciones en más o menos, del 40% como mínimo de las unidades del Proyecto modificadas.
4. La suspensión de la obra comenzada y, en todo caso, siempre que por causas ajenas a la Contrata, no se dé comienzo a la obra adjudicada dentro del plazo de tres meses, a partir de la adjudicación, en este caso, la devolución de la fianza será automática.
5. La suspensión de obra comenzada, siempre que el plazo de suspensión haya excedido un año.
6. El no dar comienzo la Contrata a los trabajos dentro del plazo señalado en las condiciones particulares del Proyecto.
7. El incumplimiento de las condiciones del contrato, cuando implique descuido o mala fe, con perjuicio de los intereses de la obra.
8. La terminación del plazo de ejecución de la obra, sin haberse llegado a esta.
9. El abandono de la obra sin causa justificada.



5. PLIEGO DE CONDICIONES

5.5 PLIEGO DE CONDICIONES ECONÓMICAS

Como base fundamental, se establece el principio de que el Contratista debe percibir el importe de todos los trabajos ejecutados, siempre que éstos se hayan realizado con arreglo y sujeción el Proyecto y Condiciones Generales y Particulares que rijan la obra.

5.5.1 Garantías

El Ingeniero Director podrá exigir al Contratista la presentación de referencias bancarias o de otras entidades o personas al objeto de cercenarse de si este reúne todas las condiciones requeridas para el exacto cumplimiento del Contrato; dichas referencias, si le son pedidas, las presentará el Contratista antes de la firma del Contrato.

5.5.2 Fianzas

Se podrá exigir al Contratista para que responda del cumplimiento de lo contratado, una fianza del 10% del presupuesto de las obras adjudicadas.

5.5.3 Ejecución de los trabajos con carga a la fianza

Si el Contratista se negase a hacer por su cuenta los trabajos precisos para utilizar la obra en las condiciones contratadas, el Ingeniero Director, en nombre y representación del Propietario, los ordenará ejecutar a un tercero, o directamente por administración, abonando su importe con la fianza depositada, sin perjuicio de las acciones legales a que tenga derecho el Propietario en el caso de que el importe de la fianza no baste para abonar el importe de los gastos efectuados en las unidades de obra que fueran de recibo.

5.5.4 Devolución de la fianza

La fianza depositada será devuelta al Contratista en un plazo que no excederá de 8 días una vez firmada el acta de recepción definitiva de la obra, siempre que el Contratista haya acreditado que no existe reclamación alguna contra él por los daños y perjuicios que sean de su cuenta o por deudas de los jornales o materiales, ni por indemnizaciones derivadas de accidentes ocurridos en el trabajo.



5. PLIEGO DE CONDICIONES

5.5.5 Precios contradictorios

Si ocurriese algún caso por virtud de la cual fuese necesario fijar un nuevo precio, se procederá a estudiarlo y convenirlo contradictoriamente de la siguiente forma:

- El adjudicatario formulará por escrito, bajo su firma, el precio que a su juicio debe aplicarse a la nueva unidad.
- La dirección técnica estudiará el que, según su criterio, deba utilizarse. Si ambos son coincidentes se formulará por la dirección técnica el Acta de Avenencia, igual que si cualquier pequeña diferencia o error fuesen salvados por simple exposición y convicción de una de las partes, quedando así formalizado el precio contradictorio.
- Si no fuera posible conciliar por simple discusión los resultados, el director propondrá a la propiedad que adopte la resolución que estime conveniente, que podrá ser aprobatoria del precio exigido por el adjudicatario, o, en otro caso, la segregación de la obra o instalación nueva, para ser ejecutada por administración o por otro adjudicatario distinto.
- La fijación del precio contradictorio habrá de proceder necesariamente, al comienzo de la nueva unidad, puesto que, si por cualquier motivo ya se hubiese comenzado, el adjudicatario estará obligado a aceptar el que buenamente quiera fijar el director y a concluirlo a satisfacción de éste.

5.5.6 Reclamaciones de aumento de precios

Si el Contratista, antes de la firma del Contrato, no hubiese hecho la reclamación u observación oportunas, no podrá, bajo ningún pretexto de error y omisión, reclamar aumento de los precios fijados en el cuadro correspondiente del presupuesto que sirve de base para la ejecución de las obras.

Tampoco se le admitirá reclamación de ninguna especie fundada en las indicaciones que, sobre las obras se hagan en la Memoria, por no servir este documento de base a la Contrata. Las equivocaciones materiales o errores aritméticos en las unidades de obra o en su importe, se corregirán en cualquier época que se observen, pero no se tendrán en cuenta a los efectos de la rescisión de contrato, señalados en los apartados relativos a las Condiciones Generales o Particulares de Índole Facultativa, sino en el caso de que el ingeniero director o el contratista los hubieran hecho notar dentro del plazo de cuatro meses contados desde la fecha de adjudicación.



5. PLIEGO DE CONDICIONES

Las equivocaciones materiales no alterarán la baja proporcional hecha en la Contrata, respecto del importe del presupuesto que ha de servir de base a la misma, pues esta baja se fijará siempre por la relación entre las cifras de dicho presupuesto, antes de las correcciones y la cantidad ofrecida.

5.5.7 Penalizaciones

5.5.7.1 Penalizaciones por baja calidad

Si se advirtiese que los materiales, servicios o productos adquiridos no cumplen con los requisitos de calidad estipulados el constructor queda exento del pago de la actividad realizada o de los elementos obtenidos. En el caso concreto de adquisición de piezas, si se detecta más de un 2% de piezas defectuosas el proveedor será sancionado con una multa de 10.000 euros, que serán abonados en un plazo máximo de 6 meses.

5.5.7.2 Desperfectos en la propiedad

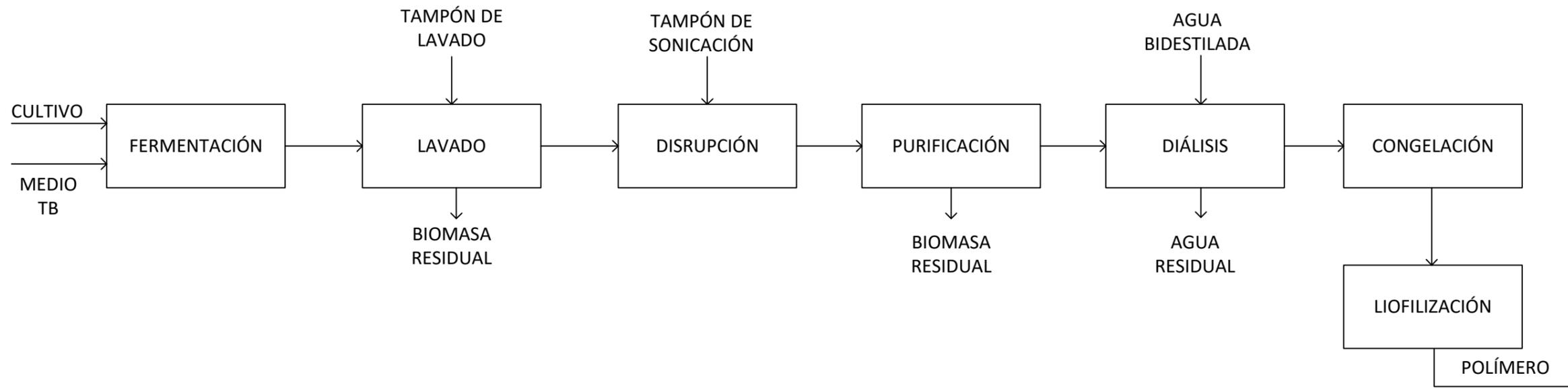
Si el constructor causara algún desperfecto en la propiedad, tendrá que restaurarla a su cuenta, dejándola en el estado que las encontró al dar comienzo las obras de la instalación.

5.5.7.3 Replanteos

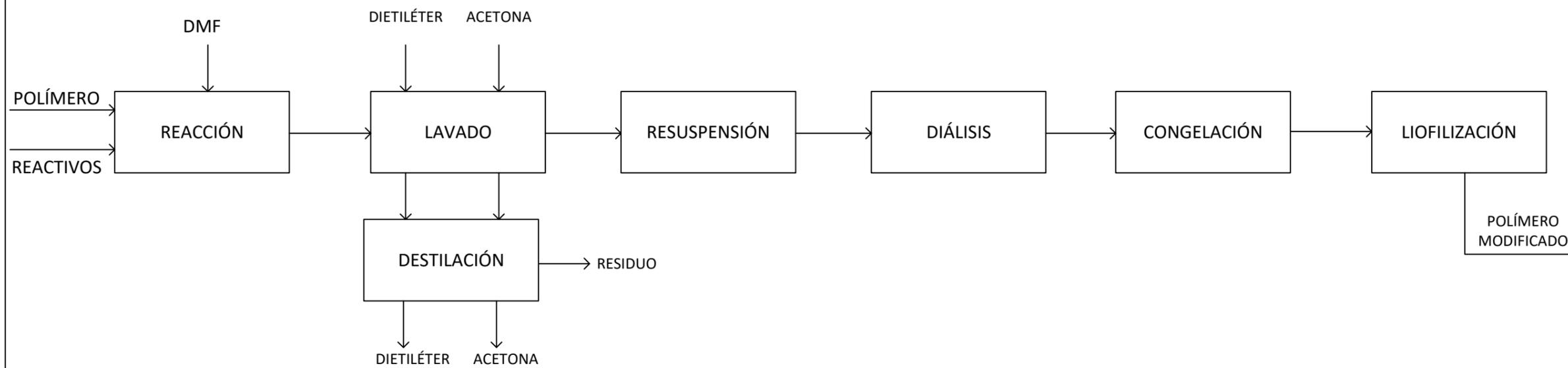
Todas las operaciones y medios auxiliares que se necesite para los replanteos serán de cuenta del contratista, no teniendo por este concepto derecho a indemnización de ninguna clase. El contratista será responsable de los errores que resulten de los replanteos con relación a los planos acotados que el director de la obra facilite a su debido tiempo.

6 PLANOS

FASE I: PROCESO DE FERMENTACIÓN



FASE II: PROCESO DE MODIFICACIÓN



REV.	POR	FECHA	FIRMA
00	EFL	29/03/2019	
LICENCIANTE: UNIVERSIDAD DE VALLADOLID			
TÍTULO: PLANTA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOPOLÍMEROS			
TÍTULO DEL DIAGRAMA: DIAGRAMA DE BLOQUES			
AUTOR: ERIKA DE LA FUENTE LÓPEZ			
NOMBRE DEL DIBUJO: A3-DB-1B2-01-00			
		UNIDAD	PÁGINA 1 OF 1
			REV 00

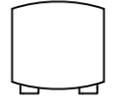
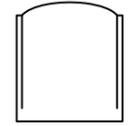
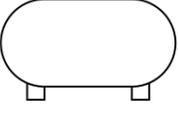
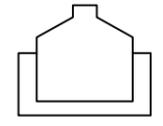
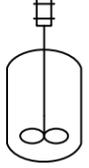
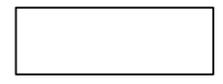
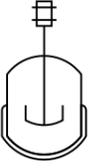
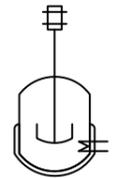
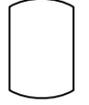
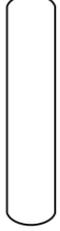
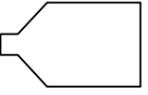
EQUIPOS

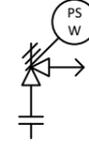
VÁLVULAS

ELEMENTOS DE CONTROL

LÍNEAS Y ACCESORIOS

NOTAS

	TANQUE VERTICAL		LIOFILIZADOR
	TANQUE HORIZONTAL		TANQUE DE DIÁLISIS
	REACTOR		CONGELADOR
	FERMENTADOR AGITADOR		AGITADOR DE CALENTAMIENTO
	INTERCAMBIADOR DE CALOR		BOMBA
	CENTRIFUGADORA CONTINUA		CENTRIFUGADORA DISCONTINUA
	TANQUE PULMÓN		TORRE DE DESTILACIÓN
	DISRUPTOR		
	SILO		
	FILTRO		

	VÁLVULA DE PASO
	VÁLVULA DE 3 VÍAS
	VÁLVULA DE GLOBO
	VÁLVULA ANTIRRETORNO
	VÁLVULA DE CONTROL
	VÁLVULA ON/OFF
	VÁLVULA DE SEGURIDAD
	VÁLVULA DE COMPENSACIÓN

	CONTROLADOR DE FLUJO
	CONTROLADOR DE TIEMPO
	CONTROLADOR DE PH
	MOTOR
	CONTROLADOR DE PRESIÓN
	TRANSMISOR DE FLUJO
	TRANSMISOR CÁLCULO DE FLUJO
	ALARMA DE NIVEL MUY ALTO
	ALARMA DE NIVEL BAJO
	INDICADOR DE VIDRIO DE NIVEL
	TRANSMISOR DE PRESIÓN
	VÁLVULA DE CONTROL DE FLUJO
	TRANSMISOR DE PH
	TRANSMISOR DE NIVEL
	VÁLVULA DE CONTROL

	LÍNEA DE PROCESO
	SENTIDO DE PROCESO
	SEÑAL ELÉCTRICA
	AISLANTE
	FILTRO
	PENDIENTE DEL EQUIPO
	DRENAJE
	DRENAJE MEDIANTE VÁLVULA DE DISCO

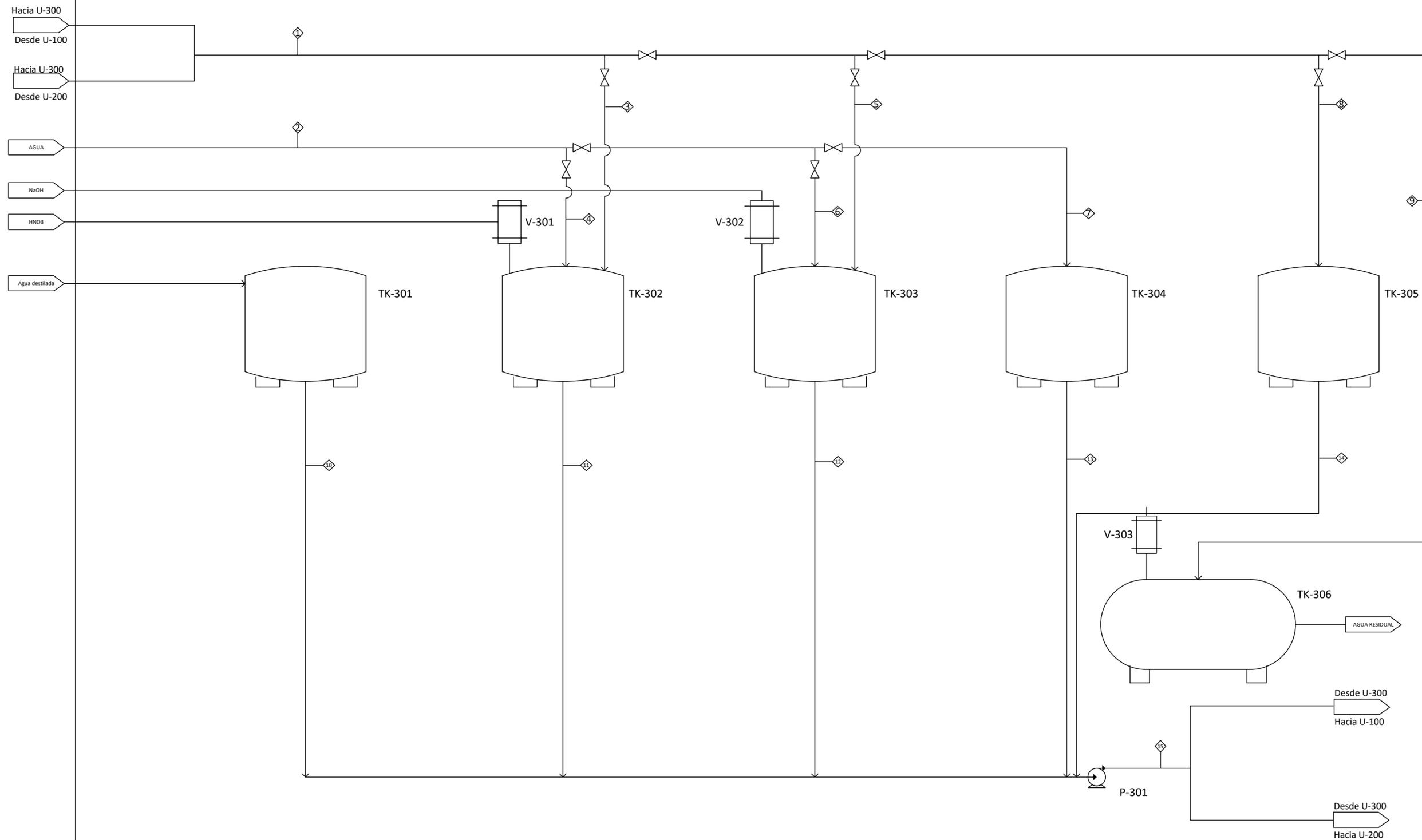
ABREVIATURAS

CWS	SUMINISTRO DE AGUA DE REFRIGERACIÓN
CWR	AGUA DE REFRIGERACIÓN DE RETORNO

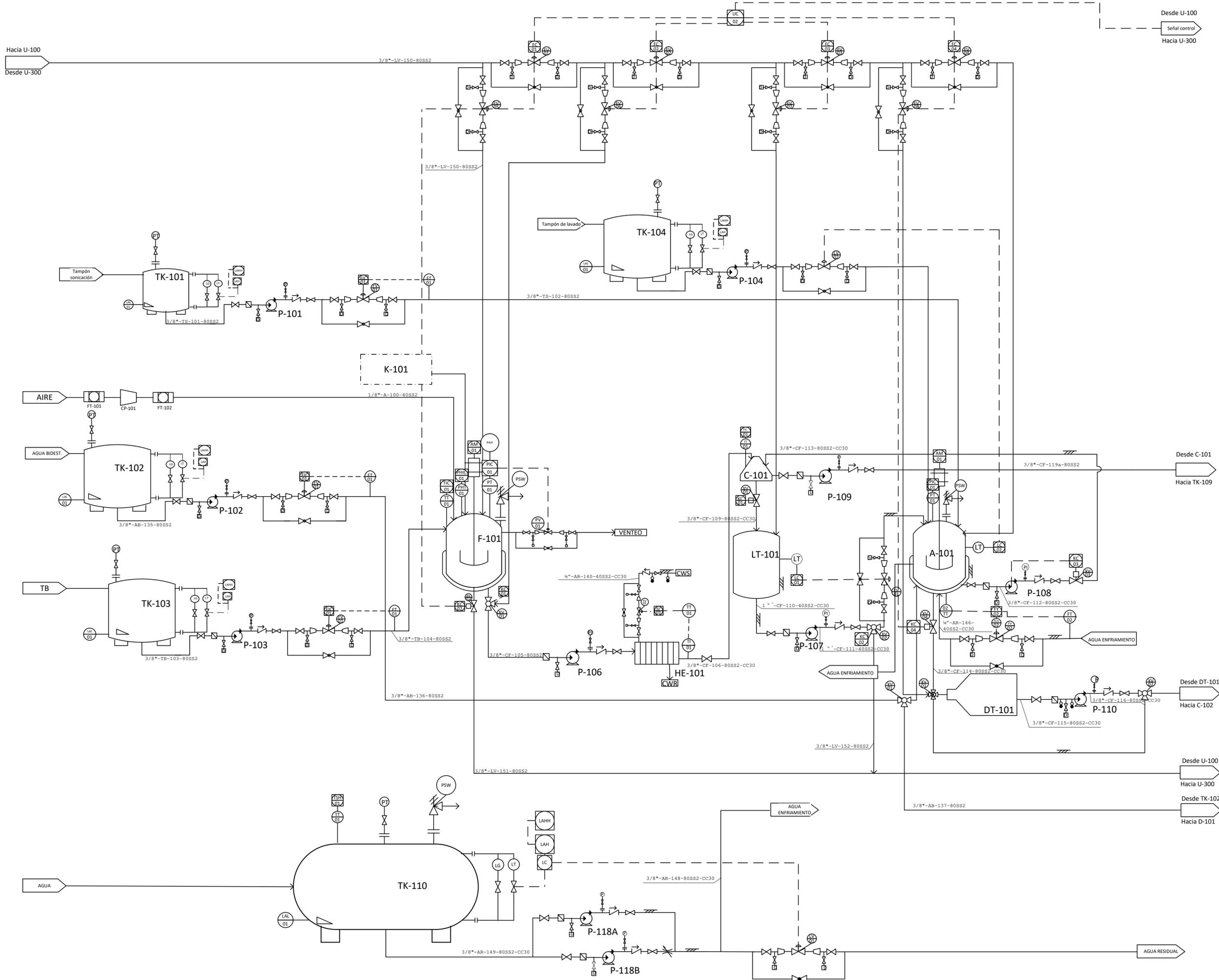
REV.	POR	FECHA	FIRMA
00	EFL	11/06/2019	
LICENCIANTE: UNIVERSIDAD DE VALLADOLID			
TÍTULO: PLANTA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOPOLÍMEROS			
TÍTULO DEL DIAGRAMA: PFD 100			
AUTOR: ERIKA DE LA FUENTE LÓPEZ			
NOMBRE DEL DIBUJO: A3-PFD-100-00			
		PÁGINA 1 OF 1	REV 00

TK-301 TANQUE AGUA DESTILADA
 TK-302 TANQUE SOLUCIÓN HNO3
 TK-303 TANQUE SOLUCIÓN NaOH
 TK-304 TANQUE DE AGUA
 TK-305 TANQUE DE RETORNO
 V-301 SILO HNO3
 V-302 SILO NaOH
 P-301 BOMBA LAVADO
 TK-306 TANQUE AGUA RESIDUAL
 V-303 SILO NaOH

NOTAS



REV.		FOR.	FECHA	FIRMA
01		STL	15/04/2015	
LICENCIANTE: UNIVERSIDAD DE VALLADOLID				
TITULO: PLANTA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOPOLÍMEROS				
TITULO DEL DIAGRAMA: PFD 301				
AUTOR: ERICA DE LA FUENTE LOPEZ				
NOMBRE DEL DIBUJO: A2-PFD-301-00				
	UNIDAD	PÁGINA	REV	
	U-300	3 of 3	01	



NOTAS

Desde U-100
Señal control
Hacia U-300

Hacia U-100
Desde U-300

Desde C-101
Hacia TK-109

Desde DT-101
Hacia C-102

Desde U-100
Hacia U-300

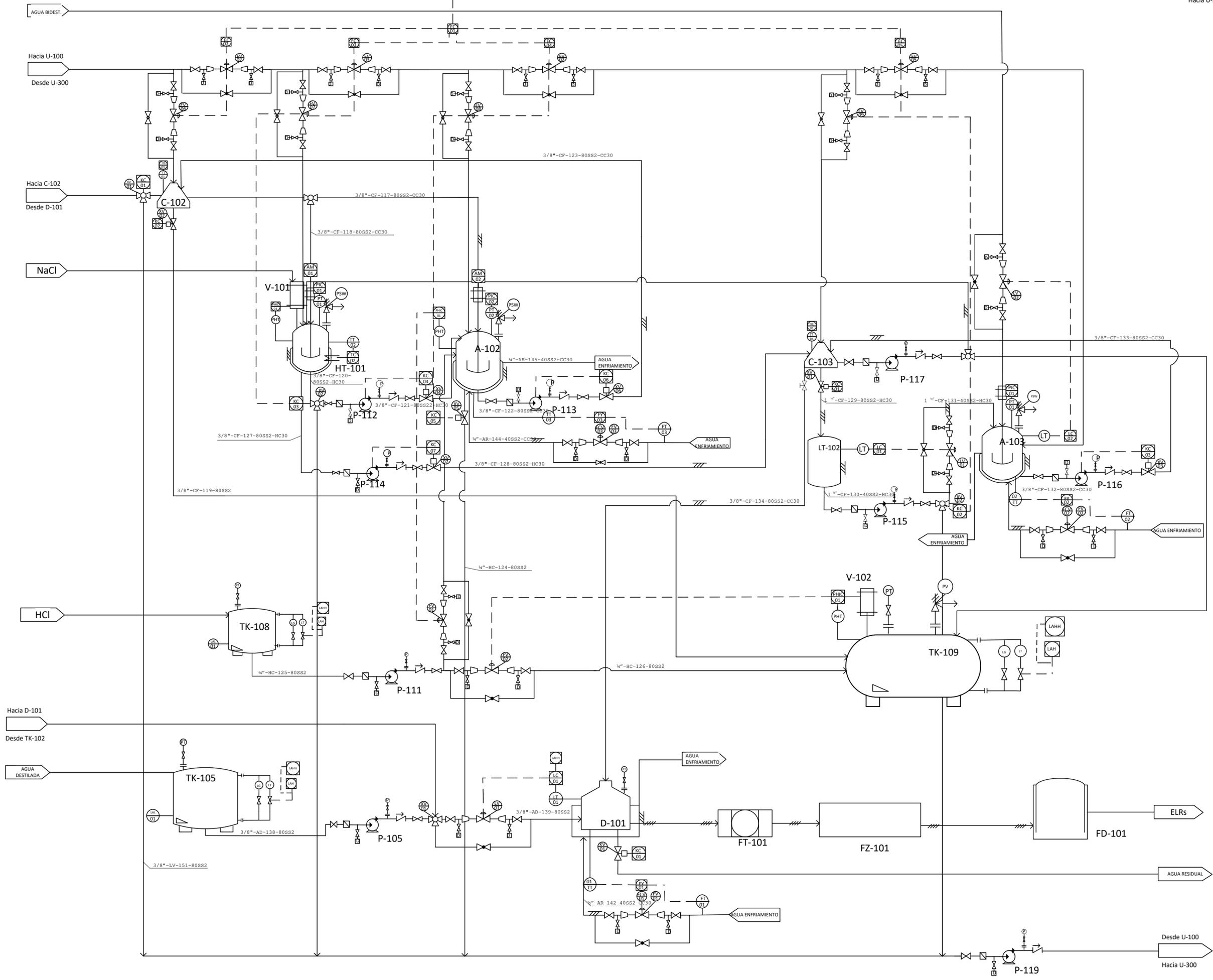
Desde TK-102
Hacia D-101

- LEYENDA**
- Aislante
 - Tubería
 - Conexión a proceso
 - Señal eléctrica
 - Indicador de tubería
 - Estapa manual

REV:	FOR:	FECHA:	FIRMA:
01	01	22/04/2015	
LICENCIANTE: UNIVERSIDAD DE VALLADOLID			
TÍTULO: PLANTA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOPOLÍMEROS			
TÍTULO DEL DIAGRAMA: PD 101			
AUTOR: ERICA DE LA FUENTE LÓPEZ			
NOMBRE DEL DIBUJO: A3-P-101-00			
UNIDAD: U-100	PÁGINA: 1 OF 4	REV: 00	

Desde U-100
Señal control
Hacia U-300

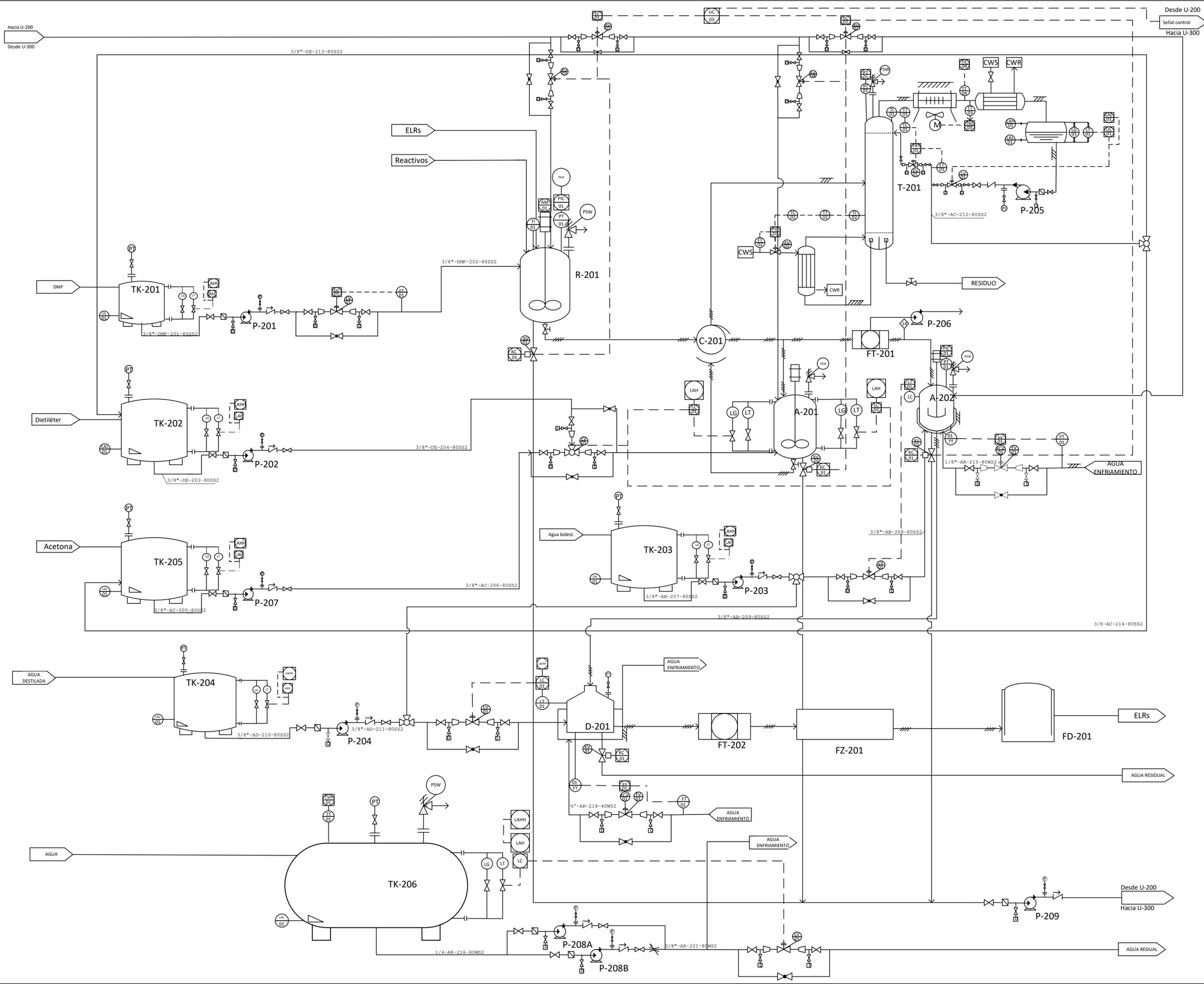
NOTAS



LEYENDA

- Aislante
- Tubería
- Conexión a proceso
- Señal eléctrica
- Indicador de tubería
- Estapa manual

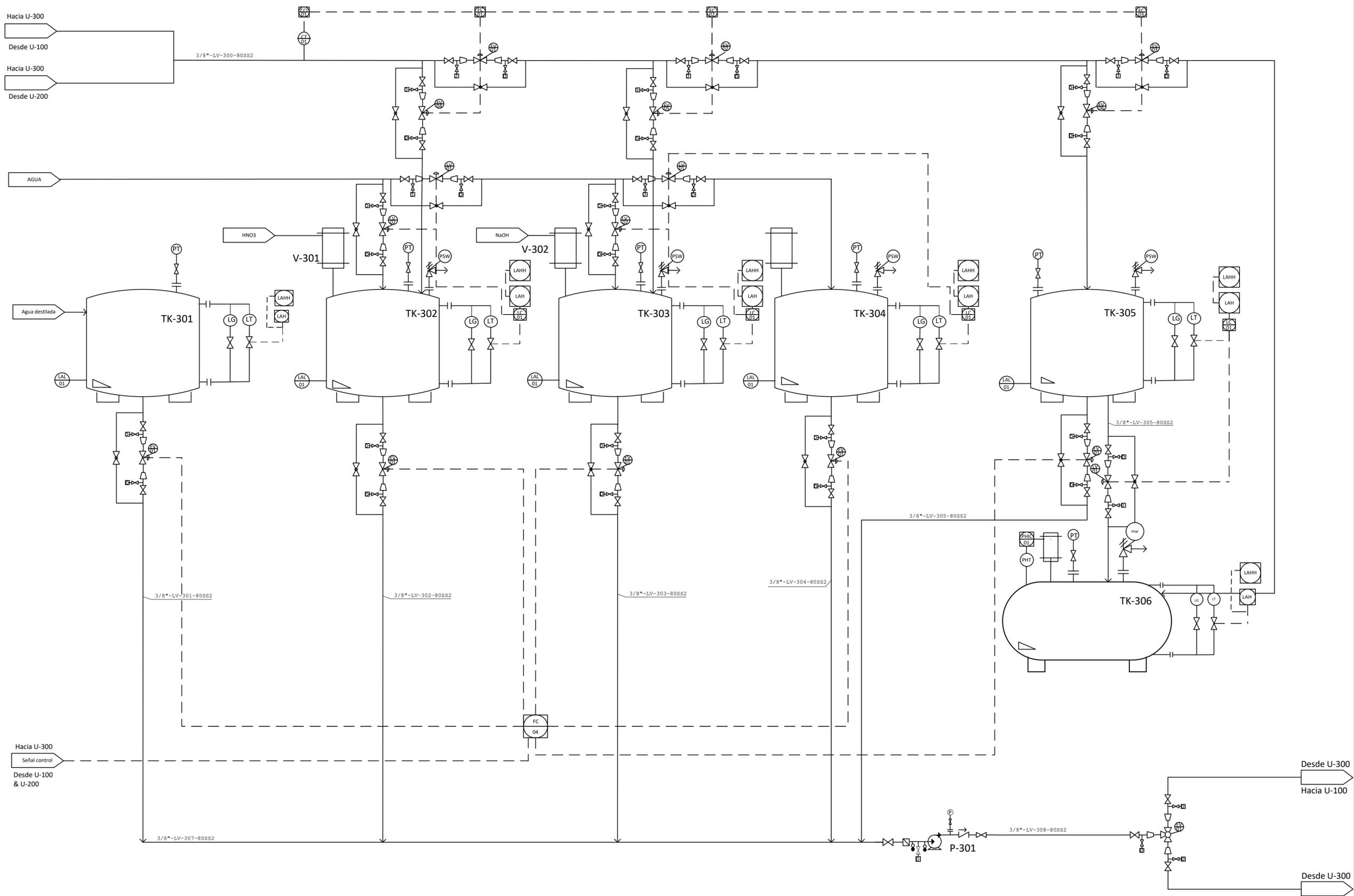
REV:	FOR:	FECHA:	FIRMA:
01	01	22/04/2012	
LICENCIANTE: UNIVERSIDAD DE VALLADOLID			
TÍTULO: PLANTA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOPOLÍMEROS			
TÍTULO DEL DIAGRAMA: PD 102			
AUTOR: ERICA DE LA FUENTE LÓPEZ			
NOMBRE DEL DIBUJO: A3-P1-102-00			
UNIDAD:	PÁGINA:	REV:	
U-100	2 OF 4	00	



NOTAS

- LEYENDA**
- Aislante
 - Tubería
 - Conexión a proceso
 - Señal eléctrica
 - Indicador de tubería
 - Estapa manual

REV.	FOR.	FECHA	FIRMA
01	01	22/04/2012	
LICENCIANTE: UNIVERSIDAD DE VALLADOLID			
TÍTULO: PLANTA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOPOLÍMEROS			
TÍTULO DEL DIAGRAMA: PID 201			
AUTOR: ERICA DE LA FUENTE LÓPEZ			
NOMBRE DEL DIBUJO: A2-PID-201-00			
UNIDAD	PÁGINA	REV.	
U-200	3 OF 4	00	



LEYENDA

—	Tubería
—	Conexión a proceso
- - -	Señal eléctrica
—	Indicador de tubería

REV.	FOR.	FECHA.	FIRMA.
01	STL	22/04/2015	
LICENCIANTE: UNIVERSIDAD DE VALLADOLID			
TITULO: PLANTA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOPOLÍMEROS			
TÍTULO DEL DIAGRAMA: PID 301			
AUTOR: ERICA DE LA FUENTE LOPEZ			
NOMBRE DEL DIBUJO: A2-PID-301-05			
UNIDAD	PÁGINA	REV.	
U-300	4 OF 4	05	

ANEXOS

BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

1. Young, R. and Lovell, P. Introduction to polymers. Third ed. Boca Raton, Fla.: CRC Press. 2011.
2. Walton, A.G. and Blackwell, J. Biopolymer. Academic Press. 2008.
3. Girotti, A., Orbanic, D., Ibáñez-Fonseca, A., González-Obeso, C. and Rodríguez-Cabello, J. Recombinant Technology in the Development of Materials and Systems for Soft-Tissue Repair. *Adv. Healthcare Mater.* 4 (2015) 2423–2455.
4. Rodríguez-Cabello, J., González de Torre, I., Ibáñez-Fonseca, A. and Alonso, M. Bioactive scaffolds based on elastin-like materials for wound healing. *Advanced Drug Delivery Reviews* 129 (2018) 118–133.
5. Rodríguez-Cabello, J., Testera Gorgoja, A., González de Torre, I., Alonso, M., Arias Vallejo, F.J., Fernández Colino, A. and Santos García, M. Hydrogel used as an injectable support for application in cell therapy and as a system for the controlled release of drugs. Universidad de Valladolid. (2014)
6. Fernández-Colino, A., Wolf, F., Keijdener, H., Rütten, S., Schmitz-Rode, T., Jockenhoevel, S., Rodríguez-Cabello, J.C., Mela, P. Macroporous click-elastin-like hydrogels for tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering: C*. 88 (2018) 140-147.
7. Bin Li, Alonso, DO and Daggett, V. The Molecular Basis for the Inverse Temperature Transition of Elastin. University of Washington, Seattle. *J. Mol Biol.* (2001) 305, 581-592.
8. Rodríguez Cabello, J., de la Torre, I., Cipriani, F. and Poozca, L. (2018). Elastin-like materials for tissue regeneration and repair. *Peptides and Proteins as Biomaterials for Tissue Regeneration and Repair*. 12 (2018) 309-329.
9. González de la Torre, I., Santos, M., Quintanilla, L., Testera, A., Alonso, M. and Rodríguez Cabello, J. Elastin-like recombinamer catalyst-free click gels: Characterization of poroelastic and intrinsic viscoelastic properties. *Acta Biomaterialia* 10 (2014) 2495–2505.
10. Innovation in Layer-by-Layer Assembly
11. Biomimetic click assembled multilayer coatings exhibiting responsive properties.
12. Microencapsulation of Islets within Functionalized Peg Hydrogel. Istanbul: KOK University. (2008).
13. González de la Torre, I., Ibáñez Fonseca, A., Quintanilla, L., Alonso, M. and Rodríguez Cabello, J. Random and oriented electrospun fibers based on a multicomponent, in situ clickable elastin-like recombinamer system for dermal tissue engineering. *Acta Biomaterialia* 72 (2018) 137–149.



BIBLIOGRAFÍA

14. Rodríguez Cabello, J., González de la Torre, I., Acosta, S., Salinas, S. and Herrero, M. Elastin-like proteins: Molecular design for self-assembling. *Self-Assembling Biomaterials*. 4 (2018) 49-78.
15. W. Blanch. Introduction to Bioreactor engineering hervey. *Biotechnology and food process engineering*. University of California at Berkeley. Berkeley California
16. García, J., Santana, Z. and Zumalacárregui, L. Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *VacciMonitor* (2013) 22(2):30-39.
17. Plataforma de compensacion de emisiones cero CO₂. (s.f.). Recuperado el 16 de Mayo de 2019, de Plataforma de compensacion de emisiones ceroCO₂: <https://www.ceroco2.org/calculadoras/electrico>
18. Ministerio para la transición ecológica. (s.f.). Recuperado el 27 de Mayo de 2019, de 1. <https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/productos-quimicos/reglamento-reach/default.aspx>
19. Agencia estatal boletín oficial del estado. Recuperado el 8 de junio de 2019, de Agencia estatal boletín oficial del estado: <http://www.boe.es>
20. Climate-Data.ORG. Recuperado el 28 de febrero de 2019, de Climate-Data.ORG: <https://es.climate-data.org>
21. Coulson, J. R. *Chemical engineering*. Oxford: Butterworth-Heineman. (2003)
22. Instituto Nacional de seguridad e higiene en el trabajo. (s.f.). Recuperado el 29 de mayo de 2019, de Instituto Nacional de seguridad e higiene en el trabajo: <http://www.insht.es>
23. Instituto para la Competitividad empresarial (ICE) Dpto. de suelo empresarial. Recuperado el 28 de febrero de 2019, de Instituto para la Competitividad empresarial (ICE) Dpto. de suelo empresarial: comercial.icesuelo@jcyl.es
24. Ludwig, E. *Applied process design for chemical and petrochemical plants*. Burlington, MA [etc.]: Gulf Professional Publishing. (2007)
25. Manual de bioseguridad en el laboratorio. OMS. (2005) Recuperado el 8 de junio de 2019. https://www.who.int/topics/medical_waste/manual_bioseguridad_laboratorio.pdf