

## Estudio de viabilidad de instalación de una planta de producción de vitamina B<sub>12</sub> en España

ANTONIO GÓMEZ MANRIQUE<sup>1</sup>

*Universidad Complutense de Madrid*  
antoniogomezmanrique@usal.es

### SUMARIO

El objetivo del presente estudio es analizar la posibilidad de instalar una planta de producción de cobalamina (vitamina B<sub>12</sub>) en España. Se cree que este tipo de industrias podrían favorecer la creación de empleo en zonas fuertemente desindustrializadas como causa del reciente período de recesión económica. Este estudio pretende analizar los principales factores económicos y técnicos que intervendrían en la instalación de una planta de producción de cobalamina en territorio español<sup>2</sup>.

*Palabras clave:* Cobalamina, planta de producción, industria biotecnológica, vitamina B<sub>12</sub>.

1 Antonio GÓMEZ MANRIQUE es Graduado en Ingeniería Química por la Universidad de Salamanca y estudiante de Máster en *Ingeniería Química: Ingeniería de Procesos* en la Universidad Complutense de Madrid.

2 En el presente informe se analiza brevemente la posibilidad de implantación de una planta de producción de cobalamina en España, habiéndose desarrollado de un modo más completo el tema en el proyecto “Diseño de una planta de producción de cobalamina”, presentado como Trabajo de Fin de Grado en Ingeniería Química por Antonio GÓMEZ MANRIQUE en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Salamanca durante el curso 2015-2016.

## SUMMARY

The aim of this study is the analysis of the possible installation of a factory for cobalamin (vitamin B<sub>12</sub>) production in Spain. These biotechnological industries could develop employment creation in deindustrialized areas caused by the economical crisis period. This review shows main economic and technical factors taking part on the installation of a factory for production of cobalamin in Spain.

*Key words:* Cobalamin, factory for production, biotechnological industry, vitamin B<sub>12</sub>.

## 1. INTRODUCCIÓN

A continuación se describirá brevemente el bien de interés que desea producirse, la vitamina B<sub>12</sub>, así como sus principales aplicaciones y las diferentes posibilidades disponibles en la actualidad para su producción.

1.1. COBALAMINA (VITAMINA B<sub>12</sub>)

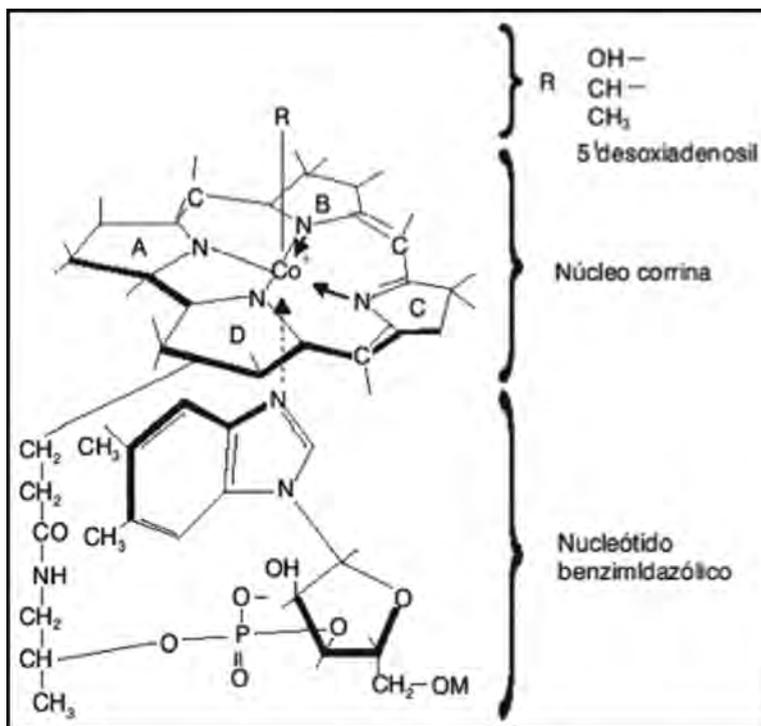
La cobalamina (vitamina B<sub>12</sub>) es una vitamina hidrosoluble, que presenta la particularidad de ser la vitamina de mayor peso molecular (1355, 42 Da) y la más compleja desde un punto de vista estructural. La estructura de la vitamina B<sub>12</sub> se observa en la ilustración 1, en función del radical (-R) que se enlace al cobalto presente en la molécula se distingue entre las cuatro formas de cobalamina conocidas: cianocobalamina (-CN), hidroxocobalamina (-OH), metilcobalamina (CH<sub>3</sub>-) y desoxiadensilcobalamina (5'-desoxiadensil-)<sup>3</sup>.

De forma natural la cobalamina se encuentra en vísceras, mariscos, carnes rojas, lácteos, pescados y la yema de huevo<sup>4</sup>.

El organismo humano no es capaz de obtener vitamina B<sub>12</sub> por otra vía que no sea la dieta, resultando las patologías derivadas de su déficit, megaloblastosis, anemia, pérdida de peso y principalmente trastornos neurológicos<sup>4</sup>.

3 A. ENTRALA BUENO. "Vitamina B<sub>12</sub>". *Vitaminas aspectos prácticos en medicina*. (1995) 99-103.

4 M. FORRELLAT BARRIOS, H. GAUTIER DU DÉFAIX, I. HERNÁNDEZ GÓMIS. "Vitamina B<sub>12</sub>: metabolismo y aspectos clínicos de su deficiencia". *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*. n.º. 3- vol. 15 (1999)



*Ilustración 1. Estructura de la molécula de cobalamina*

## 1.2. PRINCIPALES APLICACIONES DE LA VITAMINA B<sub>12</sub>

El mercado que más cantidad de vitamina B<sub>12</sub> demanda es el de producción de alimentación para ganado, especialmente porcino y aviar, requiriendo 2/3 del total producido a nivel mundial. La práctica totalidad de la tercera parte restante se destina al mercado farmacéutico para producir complementos vitamínicos y suplementos alimenticios de consumo humano<sup>5</sup>. Otro campo de aplicación de cobalamina, con una demanda mucho menor que los ya mencionados, sería el de producción de cosméticos<sup>6</sup>.

5 J.W. SCOTT. "Vitamins. Vitamin B12" en R.E. KIRK, D.F. Othmer. Encyclopedia of Chemical Technology. vol. 25 (2001) 102-127.

6 J. CHEN, G. DU, Z. KANG, Q. QI, J. ZHANG, J. ZHOU. "Recent advances in microbial production of  $\delta$ -aminolevulinic acid and vitamin B<sub>12</sub>". *Biotechnology Advances*. vol. 30 (2012) 1533-1542.

1.3. MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE VITAMINAS. SELECCIÓN DE PROCESO<sup>7</sup>

En la actualidad las vitaminas en general se producen por cuatro métodos diferenciados: aislamiento a partir de fuentes naturales, síntesis química, síntesis bioquímica y síntesis microbiana. En el caso concreto de la producción de cobalamina<sup>8</sup>:

- El aislamiento no es viable económicamente, por no conocerse fuentes naturales en las cuales la vitamina B<sub>12</sub> se encuentre en cantidades lo suficientemente elevadas como para que se rentabilice su extracción, que resulta cara y compleja.
- La síntesis química resulta muy tediosa, comprendiendo hasta 70 etapas de reacción debido a la elevada complejidad estructural de la molécula de cobalamina, por lo que se considera inviable tecnológicamente.
- La síntesis bioquímica implementa procesos de reacción enzimática, simplificando la síntesis química y reduciendo el número de etapas de reacción. No obstante, la simplificación resulta insuficiente, pues en la actualidad sigue sin ser viable desde el punto de vista tecnológico, aunque se postula como una posible opción de futuro.
- La síntesis microbiana es actualmente la única opción viable de producción industrial de cobalamina. Este proceso consiste en obtener el producto de interés a través del metabolismo de un microorganismo, empleándose en el caso de la vitamina B<sub>12</sub>, bacterias.

Los microorganismos, cuyo empleo en la producción de vitamina B<sub>12</sub>, ha sido más ampliamente estudiado son: *Acetobacterium sp.*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Propionibacterium shermanii* y *Pseudomonas denitrificans*.

No obstante, los avances en la mejora de procesos industriales de producción microbiológica se centran en la modificación genética de especies cuyo desempeño en los equipos de proceso es bien conocido, como *Escherichia coli*, mediante la inserción de los factores genéticos responsables de la producción del bien de interés buscado (GMO, “genetic modified organisms”, organismos modificados genéticamente), más que en investigar en posibles

7 J.W. SCOTT. “Vitamins. Vitamin B12” en R.E. Kirk, D.F. Othmer. *Encyclopedia of Chemical Technology*. vol. 25 (2001) 102-127.

8 W. HÄHLEIN, H.P. HOHMAN, B. KAESLER, R. KURTH, G. MOINE, H. PAULING, J. PAUST, B. WEIMANN. “Vitamins, 6. B Vitamins”. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (2011).

procesos que aumenten la producción de los actuales a partir de microorganismos disponibles en la naturaleza (wild type microorganism).

A continuación, se analizan las especies que, como ya se mencionó, han sido estudiadas más ampliamente en la producción de vitamina B<sub>12</sub>:

- Los procesos que emplean *Pseudomonas denitrificans* presentan el inconveniente de ser aerobios, lo que dificulta en gran medida la operación, siendo el oxígeno el elemento fundamental a controlar de los presentes en el sistema reaccionante.
- Los procesos que emplean *Acetobacterium sp.* presentan la ventaja de resultar sencillos y versátiles, adaptándose a una gran diversidad de sustratos, pero tienen una productividad notablemente más baja que el resto de procesos (4 mg/l por ciclo)<sup>9</sup>.
- En caso de usarse *Propionibacterium freudenreichii* o *Propionibacterium shermanii*, se deberán implementar estrategias de control para mantener la concentración de ácido propiónico, subproducto metabólico, en condiciones de correcta operación. Además en algunos de los procesos que emplean este tipo de cepas se obtienen producciones elevadas, que pueden llegar a superar los 50 mg/l por ciclo de operación, empleando medios de cultivo relativamente sencillos y sin necesidad de incluir operaciones previas de ingeniería genética que, a priori, podrían complicar y encarecer en gran medida la preparación de las cepas<sup>10</sup>.

El proceso de producción que se propondrá en la planta cuya instalación se analiza, produciría la cobalamina a partir de la fermentación del metabolismo del microorganismo *Propionibacterium freudenreichii* por considerarse el óptimo a dichos efectos. La vitamina B<sub>12</sub> se obtendría en forma de cianocobalamina, la forma más estable de la vitamina, y aquella más empleada desde el punto de vista comercial. Siendo la composición del medio de cultivo empleado el mostrado a continuación<sup>10</sup>:

9 A. E. BAINOTTI, N. NISHIO, M. SETOGAICHI. "Kinetic Studies and Medium Improvement of Growth and Vitamin B<sub>12</sub> Production by *Acetobacterium sp.* In Batch Culture". *Journal of fermentation and Bioengineering*, vol. 81 n° 4 (1996) 324-328.

10 Y. JIAO, S. LIU, P. WANG, Y. WANG, Z. ZHANG. "Improved propionic acid and 5,6-dimethylbenzimidazole control strategy for vitamin B<sub>12</sub> fermentation by *Propionibacterium freudenreichii*". *Biotechnology Advances* 193 (2015) 123-129.

- Medio de fermentación (por litro de agua desionizada): 60 g de glucosa; 40 g de licor de maceración de maíz (CSL); 4.6 g de dihidrógenofosfato de potasio; 0.0127 g de cloruro de cobalto. El pH debe ser ajustado entre 6.8-7.

## 2. ESTUDIO DE MERCADO

### 2.1. MATERIAS PRIMAS

Las principales materias primas que se emplearían en el proceso de producción de cianocobalamina que se propone implantar, según lo expuesto en investigaciones realizadas en el laboratorio para medios de cultivo óptimos<sup>10</sup>, serían:

- Una fuente carbonada, como podría ser la glucosa ( $C_6H_{12}O_6$ ), la más empleada en este tipo de procesos. La glucosa podría adquirirse de las múltiples empresas dedicadas al tratamiento de cultivos diversos (remolacha, cereal...) para obtención de azúcares y jarabes.
- En el sistema de fermentación propuesto, se incluye además un medio complejo como el licor de maceración de maíz (CSL, corn steep liquor por sus siglas en inglés). Este tipo de sustancias son generalmente subproductos de la industria de tratamiento de cultivos de cereal, por lo que su obtención podría asociarse a la de la glucosa.
- Una fuente de nitrógeno, generalmente sulfato de amonio ( $(NH_4)_2SO_4$ ). Por ser componente de uso recurrente en fertilizantes, la obtención del sulfato estaría también asegurada por el fuerte asentamiento de la industria agrícola y las asociadas a ésta en gran parte de la superficie de España.
- Un sistema amortiguador de pH, como dihidrógeno fosfato de potasio ( $KH_2PO_4$ ). Tal y como ocurriese en caso del sulfato de amonio, el dihidrógeno fosfato de potasio es otro componente habitual de fertilizantes, por lo que su obtención estaría asegurada en prácticamente toda la península.
- Precursor vitamínico 5,6-dimetilbenzimidazol (DMB), requiriéndose éste en cantidades mínimas, por lo que en caso de no poder obtenerse de productores españoles, la importación de pequeñas cantidades no resultaría un coste económico excesivo.
- Una sustancia que ceda el ión cobalto que se presenta en la estructura de la molécula de cobalamina. Generalmente con este fin, se emplea cloruro de cobalto ( $CoCl_2$ ), sal que en disolución en el medio de cultivo aporta iones de cobalto en cantidad suficiente para que se efectúe la síntesis de vitamina.

- Agua desionizada en grandes cantidades en comparación con el resto de materias primas. El medio de cultivo, en el cual se produciría la cianocobalamina de interés como resultado de los procesos metabólicos de *Propionibacterium freudenreichii*, no sería sino una disolución de las materias primas anteriormente mencionadas en agua, por tanto será ésta la materia prima mayoritaria del proceso, por lo que sería interesante la instalación de un sistema de desionización de agua anejo a la industria que se propone implantar.

En la tabla 1 se adjuntan los precios aproximados en España a fecha de 2016 de las materias primas, que se emplearían en el proceso.

*Tabla 1. Precio de mercado de materias primas de proceso*

Materia prima	Precio (€/tm)
Glucosa <sup>11</sup>	840,00
CSL <sup>12</sup>	560,00
Dihidrógeno fosfato de potasio <sup>13</sup>	1.150,00
Cloruro de cobalto <sup>14</sup>	1.100.000,00
DMB <sup>13</sup>	1.664.000,00

Otras materias primas, que resultarían recurrentes en procesos de este tipo, serían:

- Un agente extractor en caso de emplearse unidades de adsorción. Un sistema de adsorción con lecho de resinas Duolite S861, por ejemplo, emplearía una disolución de metanol (CH<sub>3</sub>OH) en agua<sup>15</sup>. No obstante, no resultaría crucial tener en cuenta el precio de mercado del metanol en una primera estimación, por no resultar una sustancia de elevado coste, y emplearse en un circuito cerrado, sin ser apenas necesaria su reposición.

11 Tereos SYRAL, [contacto directo via email]. [Consulta: junio 2016].

12 Hangzhou FOCUS. Catálogo de productos. [En línea]. [Consulta: junio 2016].

13 MONBAND. Catálogo de productos. [En línea]. [Consulta: junio 2016].

14 Sigma ALDRICH. Catálogo de productos [En línea]. [Consulta: junio 2016].

15 A. M. RAMOS, M. OTERO, A. E. RODRIGUES. "Recovery of Vitamin B<sub>12</sub> and cephalosporin-C from aqueous solutions by adsorption on non-ionic polymeric adsorbents". *Separation Purification Technology* 38 (2004) 85-98.

- En caso de incluirse una unidad de cianidación para homogeneizar toda la cobalamina producida a cianocobalamina, sería necesario una sustancia que cediese los grupos cianuro necesarios al proceso. La sustancia más empleada en estos casos sería, pese a su peligrosidad, cianuro de hidrógeno (HCN). Aunque de igual modo, dadas las ínfimas cantidades empleadas en comparación con las de los componentes del medio de cultivo, su coste no presentaría un gran impacto en el global del proceso.
- La cepa del propio microorganismo, en este caso *Propionibacterium freudenreichii*, no debería ser adquirida más que al comienzo de la operación de la planta, en caso de conservarse en condiciones en las que su reproducción pudiese llevarse a cabo correctamente cuando correspondiese. En cualquier caso la cepa empleada en concreto se encontraría disponible en la Colección Española de Cultivos Tipo asociada a la Universidad de Valencia a un precio despreciable frente al de otras materias primas (319,50 €)<sup>16</sup>.

## 2.2. PRODUCTO

En lo relativo al producto de interés, la cianocobalamina, resulta complicado determinar si existiría realmente una demanda insatisfecha debido a la escasa disponibilidad de datos de producción, importación y exportación de la misma y de las vitaminas en general. Por ello, se realiza una aproximación mediante la metodología de coeficientes técnicos, asociando su Consumo Nacional Aparente (CNA) al del producto a cuya cadena de producción se incorpora en mayor cuantía, es decir, el pienso para alimentación de ganados porcino y aviar. En la tabla 2 se adjuntan los datos de CNA, producción, exportaciones e importaciones de pienso avícola y en la tabla 3 de porcino.

El CNA mostrado en las tablas 2 y 3 se calcula por aplicación de la ecuación 1:

$$\mathbf{CNA = (Prod. + Imp.) - Exp.}$$

(Ec.1)

<sup>16</sup> Colección Española de Cultivos Tipo. Tarifas de suministro. Universidad de Valencia. [En línea]. [Consulta: junio 2016].

Tabla 2. CNA y datos de comercio pienso avícola en España (1997-2015)<sup>17</sup>

<b>Año</b>	<b>Prod. (Tm/año)</b>	<b>Exp. (Tm/año)</b>	<b>Imp. (Tm/año)</b>	<b>CNA (Tm/año)</b>
1997	3.563.584,000	147.956,546	745.435,544	4.161.062,998
1998	3.673.900,000	168.579,786	893.160,958	4.398.481,172
1999	3.794.304,000	139.633,632	1.052.138,078	4.706.808,446
2000	4.015.685,000	167.318,064	939.369,506	4.787.736,442
2001	4.388.186,000	222.354,118	839.839,884	5.005.671,766
2002	4.559.170,000	222.879,776	970.062,226	5.306.352,450
2003	4.762.741,000	325.002,470	931.679,288	5.369.417,818
2004	4.978.311,000	324.425,348	1.029.444,830	5.683.330,482
2005	4.351.152,000	307.197,218	1.240.471,992	5.284.426,774
2006	4.633.497,000	328.597,752	1.217.390,174	5.522.289,422
2007	4.582.842,000	404.069,300	1.181.852,616	5.360.625,316
2008	4.539.530,000	356.923,356	1.026.077,562	5.208.684,206
2009	4.815.895,000	354.760,568	952.694,990	5.413.829,422
2010	4.482.783,000	435.871,040	803.362,560	4.850.274,520
2011	4.442.009,000	529.570,126	837.196,728	4.749.635,602
2012	4.409.360,000	624.090,508	863.098,746	4.648.368,238
2013	4.232.451,000	540.813,412	760.670,000	4.452.307,588
2014	4.654.401,000	601.314,274	867.211,944	4.920.298,670
2015	4.654.401,000	636.966,230	1.012.270,172	5.029.704,942

17 Instituto Nacional de Estadística (INE) Encuesta Industrial Anual de Productos. Serie CNAE-93 (1997-2007); Serie CNAE-09 (2008-2014). [En línea]. [Consulta: abril-mayo 2016].

Tabla 3. CNA y datos de comercio pienso porcino en España (1997-2015)<sup>18</sup>

<b>Año</b>	<b>Prod. (Tm/año)</b>	<b>Exp. (Tm/año)</b>	<b>Imp. (Tm/año)</b>	<b>CNA (Tm/año)</b>
1997	5.752.452,000	366.932,234	1.848.680,149	7.234.199,915
1998	6.546.404,000	418.077,869	2.215.039,176	8.343.365,307
1999	6.785.411,000	346.291,407	2.609.302,433	9.048.422,026
2000	7.732.660,000	414.948,799	2.329.636,375	9.647.347,576
2001	7.732.860,000	551.438,213	2.082.802,912	9.264.224,700
2002	8.137.137,000	552.741,844	2.405.754,320	9.990.149,476
2003	8.606.849,000	806.006,126	2.310.564,634	10.111.407,509
2004	8.935.416,000	804.574,863	2.553.023,178	10.683.864,315
2005	8.712.948,000	761.849,101	3.076.370,540	11.027.469,440
2006	9.212.386,000	814.922,425	3.019.127,632	11.416.591,207
2007	10.184.527,000	1.002.091,864	2.930.994,488	12.113.429,624
2008	9.651.508,000	885.169,923	2.544.672,354	11.311.010,431
2009	9.004.535,000	879.806,209	2.362.683,575	10.487.412,367
2010	8.844.189,000	1.080.960,179	1.992.339,149	9.755.567,970
2011	8.732.093,000	1.313.333,912	2.076.247,885	9.495.006,973
2012	8.758.280,000	1.547.744,460	2.140.484,890	9.351.020,430
2013	8.778.658,000	1.341.217,262	1.886.461,600	9.323.902,338
2014	9.625.128,000	1.491.259,400	2.150.685,621	10.284.554,222
2015	9.625.128,000	1.579.676,250	2.510.430,027	10.555.881,776

18 Instituto Nacional de Estadística (INE) Encuesta Industrial Anual de Productos. Serie CNAE-93 (1997-2007); Serie CNAE-09 (2008-2014). [En línea]. [Consulta: abril-mayo 2016].

Una vez se conoce el valor del CNA de pienso avícola y porcino en España, a partir de su composición media en cobalamina, se determina de forma aproximada el CNA de ésta en el país. A su vez, debido a que, como se dijo anteriormente, es en torno a 2/3 de la producción mundial de cobalamina, la fracción que se emplea en la producción de alimentación animal, se aplicará un factor de corrección de 3/2 para obtener el CNA total de vitamina B<sub>12</sub> en España.

En las tablas 4 y 5 se recogen las composiciones medias de los piensos de alimentación de ganado avícola y porcino, respectivamente.

Tabla 4. Necesidades de cobalamina por kg de dieta según peso en ganado avícola<sup>19</sup>

<b>Pollos</b>	<b>Edad/ tipo</b>	0-8 sem	8-18 sem	Ponedoras	Reproductoras
	<b>Vitamina B<sub>12</sub> (µg)</b>	9	3	3	3
<b>Pavos</b>	<b>Edad/ tipo</b>	0-8 sem	> 8 sem	Reproductoras	
	<b>Vitamina B<sub>12</sub> (µg)</b>	3	3	3	

Tabla 5. Necesidades de cobalamina por kg de dieta según peso en ganado porcino<sup>18</sup>

<b>Peso vivo (kg)</b>	1-5	5-10	10-20	20-35	35-60	60-100
<b>Vitamina B<sub>12</sub> (µg)</b>	22	22	15	11	11	11

Conocida la composición en vitamina B<sub>12</sub> de los piensos de ganado porcino y aviar, los CNA de estos dos productos en España en los últimos veinte años y sabiendo que dos tercios de la producción mundial de cobalamina se emplean como aditivo en la industria alimentaria animal; se puede obtener aproximadamente el Consumo Nacional Aparente de cobalamina en España mediante el siguiente procedimiento (Ec. 2, Ec. 3, Ec. 4 y Ec. 5). Nótese que se toman 11 µg/kg alimento en el caso del ganado porcino por suponerse que el animal consume mucho más pienso pesando más de 20 kg que por debajo de este peso. En el caso del ganado avícola ocurre igual, los pollos consumirán mucho más pienso a partir de las 8 semanas que hasta entonces.

$$\text{CNA pienso porcino} \left( \frac{\text{Tm}}{\text{año}} \right) \cdot \frac{1000 \text{ kg}}{1 \text{ Tm}} \cdot \frac{11 \text{ µg cobalamina} \cdot \frac{1 \text{ kg}}{10^6 \text{ µg}}}{1 \text{ kg pienso}} = \frac{\text{kg cobalamina en pienso por el}}{\text{año}} \quad (\text{Ec. 2})$$

19 J. W. ZARTHA SOSSA. Tecnología de alimentos balanceados para animales. Universidad Pontificia Bolivariana. Medellín, 2007. pp-109,116.

$$\text{CNA pienso avícola} \left( \frac{\text{Tm}}{\text{año}} \right) \cdot \frac{1000 \text{ kg}}{1 \text{ Tm}} \cdot \frac{3 \text{ } \mu\text{g cobalamina} \cdot \frac{1 \text{ kg}}{10^6 \text{ } \mu\text{g}}}{1 \text{ kg pienso}} = \frac{\text{kg cobalamina en pienso avícola}}{\text{año}}$$

(Ec. 3)

$$\frac{\text{kg cobalamina en pienso porcino}}{\text{año}} + \frac{\text{kg cobalamina en pienso avícola}}{\text{año}} = \frac{\text{kg cobalamina en pienso total}}{\text{año}}$$

(Ec. 4)

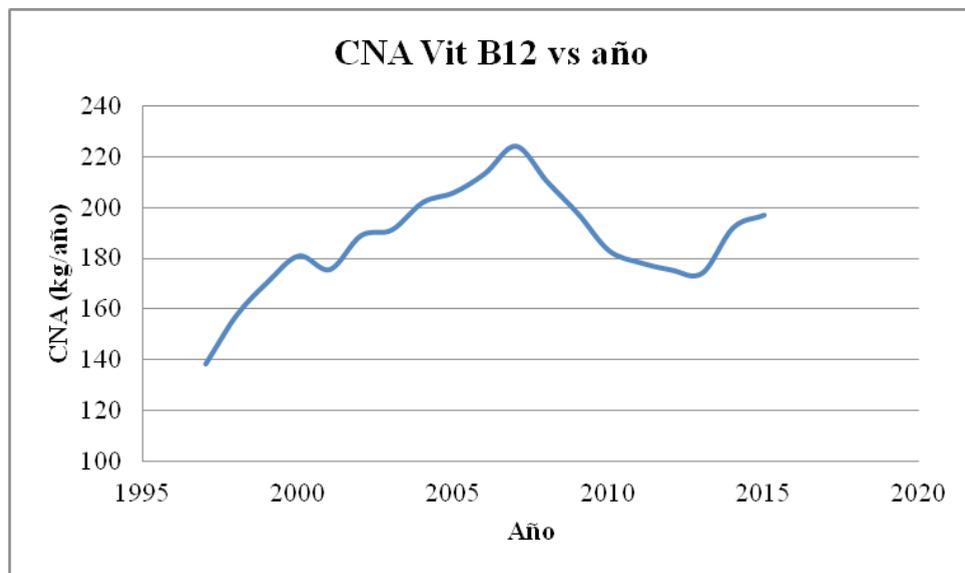
$$\frac{\text{kg cobalamina en pienso total}}{\text{año}} \cdot \frac{3 \text{ kg cobalamina total}}{2 \text{ kg cobalamina en pienso total}} = \frac{\text{kg cobalamina total}}{\text{año}} = \text{CNA cob.}$$

(Ec. 5)

Tabla 6. CNA de vitamina B<sub>12</sub> en España (1997-2015)

Año	CNA Vit B <sub>12</sub> (kg/año)
1997	138,089
1998	157,459
1999	170,480
2000	180,726
2001	175,385
2002	188,716
2003	191,001
2004	201,859
2005	205,733
2006	213,224
2007	223,994
2008	210,071
2009	197,405
2010	182,793
2011	178,041
2012	175,209
2013	173,880
2014	191,836
2015	196,806

Finalmente, por aplicación de las ecuaciones anteriormente mostradas se obtienen los datos de CNA de vitamina B<sub>12</sub> adjuntos en la tabla 6, a partir de los cuales se genera la representación de la ilustración 2, que permite estimar la proyección de la demanda de cobalamina en España.



*Ilustración 2. Proyección de la demanda histórica de cobalamina en España*

En la representación de la ilustración 2 se observa un descenso abrupto en el CNA de cobalamina coincidente con el período de fuerte recesión económica que atravesó España entre los años 2008 y 2013. No obstante, a partir del año 2014 se atisba una situación de notable mejora en la economía del país, que repercute en una recuperación de los mercados, y que se asocia a un aumento del CNA de la cobalamina.

De este modo, debido al incipiente aumento de la demanda de cobalamina en España y por no existir ninguna factoría productora de este bien en la actualidad en el país, podría resultar positiva la instalación de una planta de producción de vitamina B<sub>12</sub> que pudiese abastecer a los productores de pienso y correctores vitamínicos para alimentación animal españoles, que actualmente se surten de cobalamina de importación con origen en China o Francia, principalmente.

### 3. TAMAÑO DE PROYECTO

En vista al análisis de mercado realizado en el presente estudio, podría concluirse que resultaría una buena estrategia tratar de hacer frente a la totalidad de la demanda nacional actual de cobalamina con la capacidad de producción de la planta estudiada. Esta afirmación se apoya a su vez, en la proyección creciente del CNA que podría derivar en caso de buenos resultados de la planta industrial en el aumento de su capacidad. Así, la planta propuesta en el presente estudio se proyectará con una capacidad máxima en torno a 200 kg/año.

#### 3.1. INGRESOS POR VENTAS

La capacidad mínima a la cual resulta rentable la operación de la planta se calcula suponiendo un precio de mercado de la cobalamina a una pureza del 98 %, que es la empleada en producción de alimentación animal, de en torno a 1645 €/25 g.<sup>20</sup>

$$V = \left( 1645 \frac{\text{€}}{25 \text{ g}} \cdot \frac{10^3 \text{ g}}{1 \text{ kg}} \right) \cdot 200 \frac{\text{kg}}{\text{año}} = 13.160.000 \frac{\text{€}}{\text{año}}$$

(Ec. 6)

#### 3.2. COSTES DE PRODUCCIÓN

La estimación de los costes de producción se realiza mediante la siguiente ecuación Ec. 9.<sup>21</sup>

$$C = M_1 + M_5 + 1,5 \cdot M_2 + 0,3 \cdot I$$

(Ec. 9)

Donde:

- C: coste de producción (€/año).
- M<sub>1</sub>: coste de las materias primas (€/año).
- M<sub>5</sub>: coste de los servicios generales (€/año).
- M<sub>2</sub>: coste de la mano de obra directa (€/año).
- I: coste de inmovilizado (€).

20 Sigma ALDRICH. Catálogo de productos. [En línea]. [Consulta: junio 2016].

21 A. VIÁN ORTUÑO. Pronóstico económico en química industrial. Madrid; Eudemia Universidad, 1991.

### 3.2.1. Costes de las Materias Primas ( $M_1$ )

Las materias primas del proceso son agua destilada, glucosa, licor de maceración de maíz, dihidrógeno fosfato de potasio, cloruro de cobalto y 5,6-dimetilbenzimidazol. El sulfato de amonio no se tendrá en cuenta por sólo incluirse en el medio de crecimiento, cuya cantidad es muy difícil de calcular a estas alturas de estudio del proyecto, y no en el de fermentación, por lo que se empleará en cantidades despreciables comparado con el resto de materias primas, no interfiriendo excesivamente su coste en los cálculos. El coste del microorganismo *Propionibacterium freudenreichii*, pese a poder considerarse una materia prima más, no se computa junto al del resto de materias primas, puesto que tras adquirir la cepa al inicio de la actividad de la instalación a un principio relativamente bajo, si ésta se mantuviese en condiciones óptimas no sería necesaria su reposición.

Teniendo en cuenta la composición del medio de cultivo mostrada en el apartado 1, Introducción, y los precios de materias primas adjuntos en la tabla 1, se calculan las cantidades y el coste anual de materias primas para una producción máxima de 200 kg/año, correspondiendo al mostrado en la tabla 7. En los costes totales se incluye un margen de un 10 % derivado de posibles gastos imprevistos debidos a los costes de transporte o de variaciones en el precio de mercado.

Tabla 7. Coste anual de materias primas

Materia prima	Consumo (kg/año)	Precio (€/año)
Glucosa	195.360,71	164.103,00
CSL	130.241,42	72.612,00
Dihidrógeno fosfato de potasio	15.133,50	17.437,00
Cloruro de cobalto	44,30	48.730,00
DMB	3,08	5.125,00
<b>TOTAL (+10 %)</b>		<b>343.052,00</b>

### 3.2.2. Coste de Servicios Generales ( $M_3$ )

Es sabido que los costes de servicios generales suele ser en torno al 10-20% del total de los costes de producción. Por tanto se considerará el valor medio del intervalo, un 15 %, como se muestra en la ecuación (Ec. 10)<sup>22</sup>:

22 A. VIÁN ORTUÑO. Pronóstico económico en química industrial. Madrid; Eudemia Universidad, 1991.

$$M_5 = 0,15 \cdot c$$

(Ec. 10)

### 3.2.3. Costes de la Mano de Obra Directa ( $M_2$ )

El coste total de la mano de obra directa puede estimarse empleando la siguiente ecuación (Ec. 11)<sup>22</sup>:

$$M_2 = \left( \frac{Hh}{tm \cdot op} \right) \cdot \left( \frac{tm}{año} \right) \cdot op \cdot \left( \frac{€}{Hh} \right)$$

(Ec. 11)

Donde:

- $M_2$ : coste de la mano de obra directa (€/año).
- $\left( \frac{Hh}{tm \cdot op} \right)$  : hombres hora por tonelada y por número de operaciones.
- $\left( \frac{tm}{año} \right)$  : capacidad de producción anual.
- op: número de operaciones llevadas a cabo en el proceso de producción.
- $\left( \frac{€}{Hh} \right)$  : salario por hombre y por hora.

Dado que la planta se situará en España, puede emplearse el método de Andrés para el cálculo de los hombres hora por tonelada y por número de operaciones según la ecuación (Ec. 12)<sup>22</sup>:

$$\left( \frac{Hh}{tm \cdot op} \right) = 61,33 \cdot q^{-0,82}$$

(Ec. 12)

Donde:

- q: capacidad máxima (Tm/día) (Ec. 13). Se consideran 334 días, por considerarse habitual una parada anual de la planta de un mes de duración (31 días).

$$q = \frac{0,2 \text{ Tm}}{\text{año}} \cdot \frac{1 \text{ año}}{334 \text{ días}} = 0,000599 \frac{\text{Tm}}{\text{día}}$$
(Ec. 13)

Sustituyendo en la ecuación (Ec. 14):

$$\left( \frac{\text{Hh}}{\text{tm} \cdot \text{op}} \right) = 61,33 \cdot 0,000599^{-0,82} = 26.926,69$$
(Ec. 14)

Sustituyendo en la ecuación (Ec. 11) se pueden calcular los costes debidos a la mano de obra, suponiendo que la planta consta de 4 operaciones divididas en:

- 1) Zona de almacenamiento de materias primas y productos.
- 2) Zona de pretratamiento de materias primas.
- 3) Zona de reacción (reactor de siembra y fermentador).
- 4) Zona de purificación de productos.

Además se sabe que el precio medio por hora trabajada para cada trabajador en el año 2015 fue de 22,88 €<sup>23</sup>. Debiéndose actualizar para el año 2016 por medio del IPC según la ecuación (Ec. 15).

$$\text{Salario} \left( \frac{\text{€}}{\text{h}} \right) \cdot \frac{\text{IPC}_{2016}}{\text{IPC}_{2015}} = 22,88 \frac{\text{€}}{\text{h}} \cdot 103, \frac{52}{103}, 21 = 22,95 \text{ €}$$
(Ec. 15)

$$M_2 = 26.926,69 \cdot 0,2 \cdot 4 \cdot 22,95 = 494.361 \frac{\text{€}}{\text{año}}$$
(Ec. 16)

### 3.2.4. Cálculo del Inmovilizado Total (I)

El inmovilizado requerido para llevar a cabo la implantación de la instalación industrial analizada, se estima mediante la ecuación (Ec. 17)<sup>24</sup>:

$$I = I_A + I_B + I_C$$
(Ec. 17)

<sup>23</sup> Instituto Nacional de Estadística (INE). Índice de precios de consumo (IPC). [En línea]. [Consulta: junio 2016].

<sup>24</sup> A. VIÁN ORTUÑO. Pronóstico económico en química industrial. Madrid; Eudemia Universidad, 1991.

Donde:

- I: capital inmovilizado (€).
- $I_A$ : activo fijo (€).
- $I_B$ : coste de los estudios previos para llevar a cabo el proyecto (€).
- $I_C$ : coste de puesta en marcha (€).

### 3.2.4.1. Activo Fijo ( $I_A$ )

El activo fijo puede estimarse por diferentes métodos. Se utilizará el método del coeficiente de giro ( $g$ ) utilizando el valor de  $g = 0,97$ , que es el estándar utilizado para la industria química cuando se carece de otro valor más específico. Los otros métodos que se emplean para calcular el activo fijo, el método del coeficiente de inmovilizado unitario y el método de Williams, no se pueden usar porque no se dispone de datos de una planta análoga en operación, con una capacidad similar a la máxima propuesta, 200 kg/año.

Se define el coeficiente de giro para un determinado tipo de industria como (Ec. 18):

$$g = \frac{V}{I_A} \quad (\text{Ec. 18})$$

Donde:

- $g$ : coeficiente de giro ( $\text{tiempo}^{-1}$ ).
- $V$ : ingresos por ventas (€/tiempo).
- $I_A$ : coste de activo fijo (€).

Conocidos los ingresos por ventas que se calcularon previamente mediante la ecuación (Ec. 6). El coeficiente de giro utilizado genéricamente en ausencia de datos más específicos es de  $0,97 \text{ años}^{-1}$  para la industria química y será el que se emplee. Por tanto, conocidos  $g$  y  $V$ , se estima el activo fijo  $I_A$  según lo mostrado en la ecuación (Ec. 19).

$$I_A = \frac{V}{g} = \frac{13.160.000 \frac{\text{€}}{\text{año}}}{0,97 \text{ años}^{-1}} = 13.567.010 \text{ €} \quad (\text{Ec. 19})$$

3.2.4.2. Estudios Previos (I<sub>B</sub>)

La cuantía de la partida de estudios previos es en función de la capacidad de producción máxima de la planta y de si el producto es nuevo o mejorado, de la forma que se muestra en la tabla 8<sup>25</sup>.

Tabla 8. Distribución de coste de inmovilizado en partidas (% Inmovilizado)

Distribución del capital en %			
Capital empleado en	Productos nuevos; gran tonelaje	Productos mejorados; pequeño tonelaje	Productos nuevos; pequeño tonelaje
Investigación de laboratorio	4	7	33
Investigación piloto	4	16	30
Estudios y proyectos de la planta industrial -	4	12	4
Instalación industrial, incluida su puesta a punto	88	65	33
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

Se denominan plantas de pequeño tonelaje aquellas que anualmente producen menos de 500 Tm. En el caso del presente análisis la capacidad máxima de la planta se ha fijado en 200 kg/año, por lo que, en efecto, se trata de una planta de pequeño tonelaje. A su vez la producción de cobalamina se considerará un producto mejorado, dado que el proceso de fermentación con *Propionibacterium freudenreichii* seguido<sup>26</sup>, es una mejora basada en el control del ácido propiónico presente en el medio de cultivo así como de la adición a éste del precursor vitamínico 5,6-dimetilbenzimidazol. Por tanto, considerando esto, se tendría que el coste de estudios previos correspondería al de un producto mejorado de pequeño tonelaje. Así, sumándose los costes de investigación de laboratorio (7 %), los de investigación

25 A. VIÁN ORTUÑO. Pronóstico económico en química industrial. Madrid; Eudemia Universidad, 1991.

26 Y. JIAO, S. LIU, P. WANG, Y. WANG, Z. ZHANG. "Improved propionic acid and 5,6-dimethylbenzimidazole control strategy for vitamin B<sub>12</sub> fermentation by *Propionibacterium freudenreichii*". *Biotechnology Advances* 193 (2015) 123-129.

piloto (16 %) y los estudios y proyectos de planta industrial (12 %), se tiene que el coste debido a estudios previos corresponde a un 35 % del inmovilizado.

### 3.2.4.3. Puesta en Marcha ( $I_C$ )

La partida de puesta en marcha se calcula en función del importe del inmovilizado total. Si el inmovilizado total es superior a los 10 millones de dólares, que según el cambio de divisa empleado ( $1,13 \$ = 1 €$ )<sup>27</sup> corresponden a 8,85 millones de euros, el coste de la puesta en marcha será un 8 % del mismo como se muestra en la tabla 9<sup>28</sup>. Se conoce con certeza que el inmovilizado total es superior a esos 10 millones de dólares (8,85 millones de €) si el activo fijo (13,5 millones de €) por sí solo es mayor que este valor, como ocurre en el caso del presente proyecto. Por tanto se tendrá que los costes de puesta en marcha corresponden a un 8 % del inmovilizado.

Tabla 9. Costes de puesta en marcha (% Inmovilizado)

Costes de puesta en marcha	
Inmovilizado MM \$	Costes, en porcentaje de inmovilizado
0.3	22
1.0	15
3.0	11
10.0	8

Aplicando la ecuación 17, para la determinación del importe del inmovilizado total, se obtiene (Ec. 20):

$$\begin{aligned}
 I &= I_A + I_B + I_C = 13.567.010 + 0,35 \cdot I + 0,08 \cdot I \\
 I &= 13.567.010 \cdot \frac{0,57}{0,57} = 23.801.772 \text{ €}
 \end{aligned}
 \tag{Ec. 20}$$

27 Datosmacro. Cambio dólar USA (12/06/2016). Expansión. [En línea]. [Consulta: junio 2016].

28 A. VIÁN ORTUÑO. Pronóstico económico en química industrial. Madrid; Eudemia Universidad, 1991.

Una vez estimado el coste de todas las partidas, que se muestra desglosado en la tabla 10, se procede a calcular el importe total de los costes de producción aplicando la ecuación 9 y mostrado también en la tabla 10.

*Tabla 10. Desglose de costes de producción aproximados*

<b>Materias primas (€/año)</b>	343.052,00
<b>Servicios generales (€/año)</b>	1.451.493,00
<b>Mano de obra directa (€/año)</b>	494.361,00
<b>Inmovilizado (€)</b>	23.801.772,00
<b>Coste total de producción (€/año)</b>	9.676.618,00

### 3.2.5. Punto de Nivelación

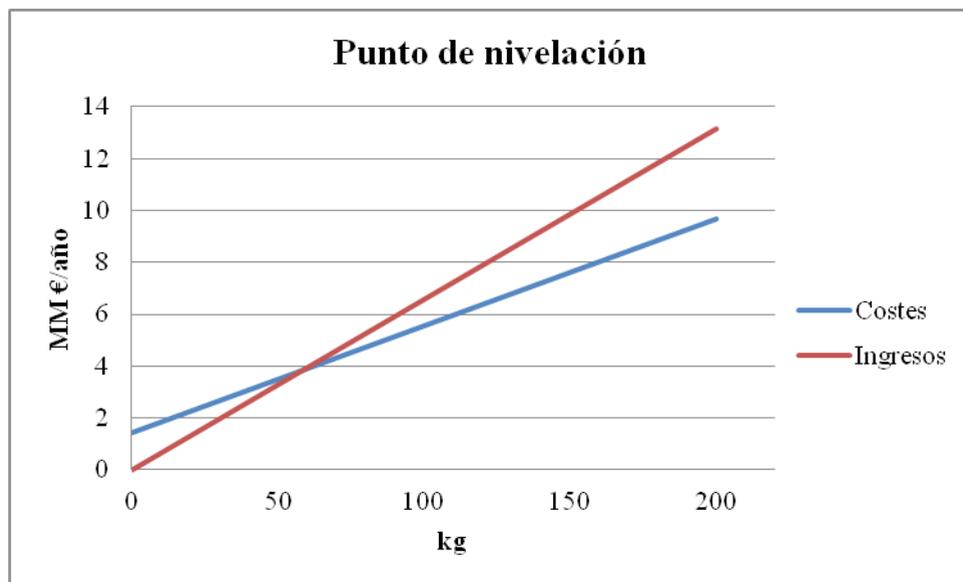
Resulta habitual considerar a efectos de este tipo de cálculos, los costes fijos de producción de la planta en un 15 % de los costes totales de la misma<sup>29</sup>. De este modo, según la ecuación 20, se estiman los costes fijos de la instalación analizada.

$$C_f = 0,15 \cdot C = 0,15 \cdot 9.676.618 \text{ €} = 1.451.492 \text{ €} \quad (\text{Ec. 20})$$

Ajustando a sendas rectas dependientes de la capacidad de producción los beneficios por ventas y los costes como la suma de fijos y variables, se obtiene la representación de la ilustración 3.

En base a la estimación básica sobre costes y beneficios de la planta analizada realizada en el presente estudio, se obtendría que una planta de producción microbiológica de cobalamina, con una capacidad máxima de producción de unos 200 kg anuales, obtendría beneficios a partir de producciones de en torno a 60 kg anuales, la tercera parte de su capacidad máxima.

<sup>29</sup> A. VIÁN ORTUÑO. Pronóstico económico en química industrial. Madrid; Eudemia Universidad, 1991.



*Ilustración 3.*

#### 4. LOCALIZACIÓN

En lo relativo a la selección del emplazamiento en el cual ubicar una instalación industrial como la propuesta en este estudio, cabe destacar que existirían una gran variedad de posibilidades, al no presentar este tipo de industria requerimientos excesivos ni altamente específicos.

Las materias primas componentes del medio de cultivo estarán aseguradas a precios similares en la práctica totalidad de la superficie de la península ibérica. Este hecho se explica, ya que como se dijo con anterioridad, la glucosa, los componentes nitrogenados y el sistema tampón se producen en estrecha relación con la actividad del sector agrícola, que presenta un fuerte asentamiento en numerosas regiones españolas como Andalucía, Castilla y León, Castilla-La Mancha, Extremadura y Aragón<sup>30</sup>, entre otras. En el caso de la glucosa, la existencia de industrias de tratamiento de productos de cultivo de cereal, asegura su abastecimiento<sup>31</sup>. En

<sup>30</sup> Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. Encuesta sobre Superficies y Rendimientos de Cultivos. Resumen de resultados España y Comunidades Autónomas 2016. [En línea]. [Consulta: julio 2017].

<sup>31</sup> Expansión.com. Directorio de empresas.

lo relativo a los compuestos nitrogenados (sulfato de amonio) y al tampón fosfato (dihidrógeno fosfato de potasio), en regiones que presentan un asentamiento fuerte de la actividad agrícola se ubicarán asociada a ésta, industrias productoras de fertilizantes, lo que asegura la disponibilidad de estos compuestos que resultan componentes recurrentes de fertilizantes y productos para el tratamiento de cultivos<sup>32</sup>. Sin embargo, debido a que el volumen de producción de este tipo de instalaciones es muy pequeño, la cercanía al origen de las materias primas, aún resultando positivo, no sería capital para el desarrollo final del proyecto.

Los mercados de destino podrían considerarse las industrias productoras de correctores vitamínicos para pienso avícola y porcino. Se tiene constancia de presencia de este tipo de empresas en las provincias españolas de Burgos, Salamanca, Segovia, Lérida o Badajoz, entre otras. No obstante, la cercanía con los mercados de destino tendría, como ocurriese con las materias primas, poco peso en la selección de la ubicación de la planta proyectada, dado el hecho de que la cantidad de producto que requeriría cada cliente, como ya se vio en el estudio de mercado, se adquiriría con poca frecuencia y en cantidades muy pequeñas, por incorporarse en proporciones ínfimas a los piensos de alimentación animal. Así, 25 gramos de cobalamina al 98 % con un precio de mercado aproximado de 1.600 € abastecen la cadena de producción de 2.200 toneladas de pienso para ganado porcino, o de 8.300 toneladas para ganado avícola.

De este modo, debido a la inexistencia de requerimientos específicos por parte del tipo de industrias cuya implantación aquí se analiza, siendo necesario para su emplazamiento un polígono industrial con disponibilidad de servicios generales básicos (agua, vapor de agua, electricidad, combustible...), una variable que podría cobrar fuerza a la hora de seleccionar la ubicación óptima de la industria podría ser el factor social, o la repercusión positiva que podría generar la industria en un área de población por favorecer la creación de empleo o la industrialización de una zona empobrecida económicamente, por ejemplo. Esta repercusión positiva de la industria en la población vendría acompañada de una reacción igualmente favorable por parte de los núcleos urbanos cercanos a la planta de producción.

## 5. INGENIERÍA DE PROCESO

A continuación se describen de forma general los aspectos técnicos relativos a la operación de la planta de producción de cobalamina cuya puesta en marcha se

analiza. Junto con dicha descripción se adjuntan las ilustraciones 5, 6, 7 y 8, en las cuales se observa el diagrama de flujo del proceso de producción de vitamina B<sub>12</sub> estudiado.

## 5.1. DESCRIPCIÓN DE ETAPAS DEL PROCESO

En la ilustración 4 se observa un diagrama de bloques del proceso y en la ilustración 5, se adjunta un diagrama de flujo del proceso que se describirá en los apartados siguientes, a fin de comprender mejor la operación llevada a cabo y poder realizar el correspondiente estudio de la instrumentación y control de la sección de fermentación.

### 5.1.1. *Etapa de Pretratamiento*

El medio de cultivo debe prepararse a partir del mezclado de sus sustancias componentes. Para evitar la degradación temprana del medio de cultivo, la mezcla de la disolución de glucosa y la disolución fosfatada, que lo componen, se efectuará justo antes de comenzar la etapa de reacción en el propio fermentador R-01.

La glucosa almacenada en ST-01 se disuelve en agua desionizada en el mezclador M-01. El dihidrógeno fosfato de potasio almacenado en ST-02, el cloruro de cobalto almacenado en ST-03 y el CSL almacenado en LT-01 se disuelven en agua desionizada en el mezclador M-02.

Tanto la disolución de glucosa que sale de M-01, como la disolución fosfatada que sale de M-02 deben esterilizarse. El tratamiento de esterilización es idéntico en ambos casos, la corriente líquida de salida de cada mezclador se alimenta a un intercambiador de calor (M-01 a E-01 y M-02 a E-03) previo aumento de su presión para evitar que se evapore. En los intercambiadores de calor (E-01 y E-03) se aumenta la temperatura de la corriente hasta 121 °C, manteniéndose así 30 segundos para asegurar la lisis celular. Tras este aumento de temperatura, sendas corrientes líquidas se alimentan a otro intercambiador (E-01 a E-02 y E-03 a E-04) donde su temperatura se disminuye hasta 50 °C.

Una vez se ha llevado a cabo el proceso de esterilización las corrientes de salida de los trenes de esterilización son enviadas a depósitos de líquido, que actúan como tanques pulmón previos a la entrada del reactor (E-02 a LT-02 y E-04 a LT-03).

En la ilustración 6 se observa el detalle del diagrama de flujo en la sección de pretratamiento.

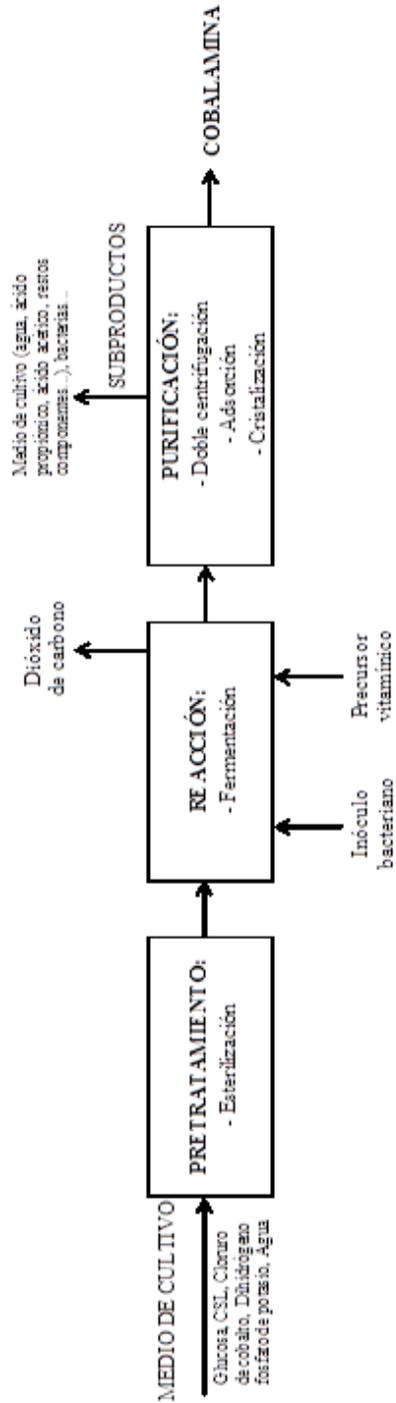


Ilustración 4. Diagrama de bloques del proceso de producción de cobalamina

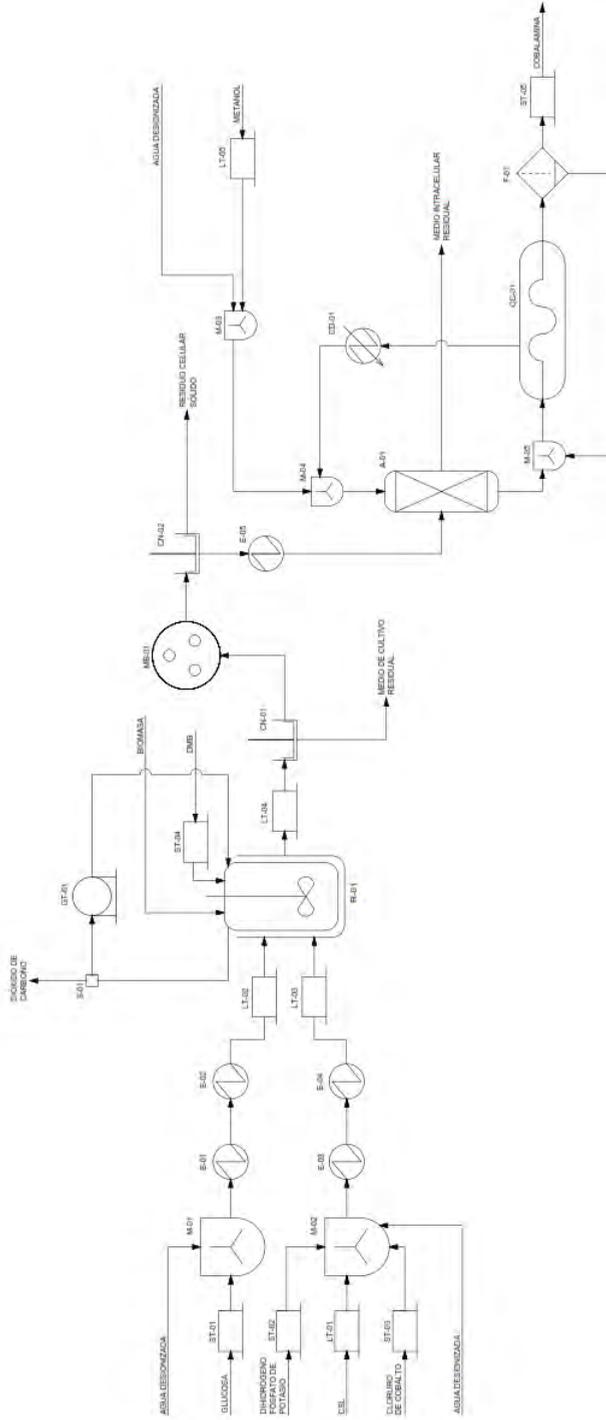


Ilustración 5. Diagrama de flujo del proceso

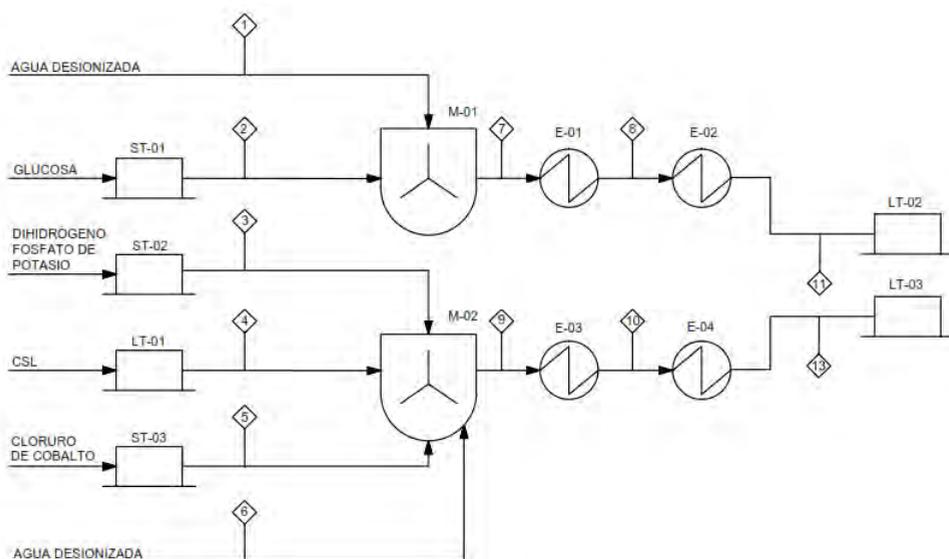


Ilustración 6. Diagrama de flujo (sección de pretratamiento de materias primas)

### 5.1.2. Etapa de Fermentación

El proceso de fermentación se llevará a cabo en régimen discontinuo, en un reactor batch de tipo tanque agitado con refrigeración, procesándose por lotes.

Teniéndose el medio de cultivo esterilizado almacenado en los tanques de líquido LT-02 (disolución de glucosa) y LT-03 (disolución fosfatada) se extraerá de éstos por lotes, correspondientes a la capacidad de los fermentadores. Tras introducir el medio de cultivo en el correspondiente fermentador, se alimenta un inóculo de elevada concentración del microorganismo *Propionibacterium freudenreichii* procedente del reactor de siembra, comenzando la fermentación que dura 160 horas<sup>33</sup>.

Las condiciones de fermentación son 30 °C y pH 7. El proceso empleado controla la adición del precursor vitamínico 5,6-dimetilbenzimidazol (DMB), almacenado en el depósito ST-04, que se ha de añadir a las 84 horas de fermentación para obtener los mejores rendimientos de obtención de vitamina B<sub>12</sub><sup>33</sup>.

33 Y. JIAO, S. LIU, P. WANG, Y. WANG, Z. ZHANG. "Improved propionic acid and 5,6-dimethylbenzimidazole control strategy for vitamin B<sub>12</sub> fermentation by *Propionibacterium freudenreichii*". *Biotechnology Advances* 193 (2015) 123-129.

Dada la naturaleza anaerobia del proceso de fermentación, en los biorreactores se establecerá una sobrepresión por inyección de una corriente de dióxido de carbono, para evitar la entrada de agua del circuito de refrigeración de producirse algún desperfecto en el reactor.

Una vez pasadas las 160 horas de fermentación, el medio de cultivo resultante sin glucosa, que ha sido consumida en la fermentación, con el ácido propiónico y el ácido acético generados por el metabolismo bacteriano, con un incremento notable en la cantidad de biomasa por crecimiento celular, y con la cobalamina contenida en el medio intracelular, se extrae del fermentador, pasando a almacenarse en el depósito de líquido LT-04, que se emplea como tanque pulmón para dosificar el volumen tratado en la etapa de separación y purificación de la vitamina B<sub>12</sub>.

En la ilustración 7 se observa el detalle del diagrama de flujo en la sección de fermentación.

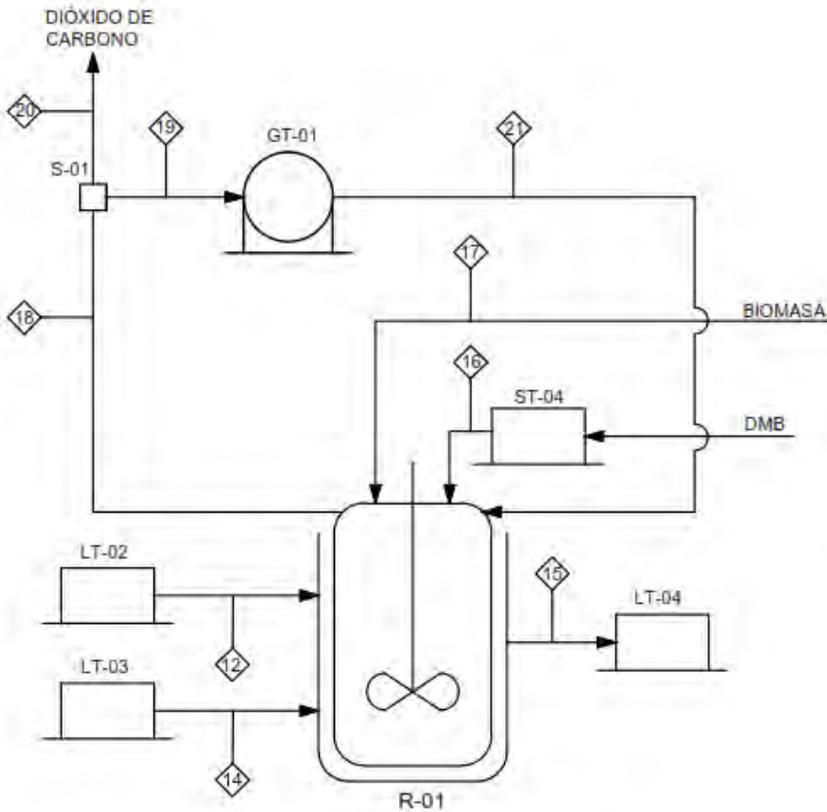


Ilustración 7. Diagrama de flujo (sección de fermentación)

### 5.1.3. Etapa Postfermentación<sup>34,35</sup>

Una vez finaliza el proceso de fermentación, se realiza un proceso de recuperación de la vitamina B<sub>12</sub> en unas condiciones de pureza adecuadas para su comercialización como aditivo alimentario en piensos, esto es un mínimo del 96 %, y en el caso concreto de la planta aquí proyectada de un 98 %. El tratamiento postfermentación se lleva a cabo tomando como materia prima el producto almacenado que proviene de la salida del reactor, almacenado en LT-04.

#### 5.1.3.1. Separación del Microorganismo del Medio de Cultivo Restante

En primer lugar el medio de cultivo almacenado en el tanque pulmón LT-04, se extrae a una temperatura media de 20 °C, enviándose a la centrífuga CN-01. En este dispositivo se centrifuga en régimen continuo retirándose el sobrenadante<sup>36</sup>, considerándose que en la centrifugación no existe aumento de temperatura. El líquido obtenido en la centrifugación, que es una disolución acuosa de los componentes del medio de cultivo y los subproductos del metabolismo bacteriano, se envía a tratamiento de residuos, mientras que el sólido sobrenadante obtenido en la centrifugación, compuesto por la población de bacterias productora de la fermentación se envía al molino de bolas MB-01.

#### 5.1.3.2. Ruptura Celular y Separación del Medio Intracelular del Residuo Sólido

En el molino de bolas se produce la ruptura celular, obteniéndose un sólido, compuesto por los residuos de la membrana celular húmeda, y un líquido, el medio intracelular en el cual está contenida la vitamina B<sub>12</sub> producida por la bacteria. Se

34 AAROS, L., DELGADO, M., GAMBOA, S. & GARCÍA, C. Procesos de recuperación de productos en fermentación. *Recursos para Ingeniería de fermentaciones*, 2012. Facultad de ciencias naturales, matemáticas y del medio ambiente. Universidad Tecnológica Metropolitana.

35 Universidad Nacional de Quilmes. Introducción a los procesos biotecnológicos. Separación y purificación en Biotecnología. (“Downstream processing”). *Recursos para Bioprocesos II (Biotecnología)*, 2016.

36 Y. JIAO, S. LIU, P. WANG, Y. WANG, Z. ZHANG. “Improved propionic acid and 5,6-dimethylbenzimidazole control strategy for vitamin B<sub>12</sub> fermentation by *Propionibacterium freudenreichii*”. *Biotechnology Advances* 193 (2015) 123-129.

considera que en su operación no se produce aumento de temperatura, al actuar el líquido como lubricante en el equipo<sup>37</sup>.

La suspensión obtenida de la operación en el molino de bolas MB-01 se alimenta a la centrífuga CN-02. En esta centrífuga se separará una fase líquida, compuesta por el citoplasma (fundamentalmente agua), material genético, lípidos y la propia vitamina B<sub>12</sub>, de una fase sólida, compuesta por los restos de membrana plasmática y pared celular (fundamentalmente lípidos) húmedas. El sobrenadante obtenido en la centrífuga CN-02 se envía a tratamiento de residuos, mientras que el líquido obtenido se envía al adsorbedor A-01.

### 5.1.3.3. Adsorción/desorción de Cobalamina<sup>38</sup>

El líquido obtenido de la centrifugación en CN-02 se hace pasar por una torre de lecho fijo empaquetado de Duolite S861 (A-01). El lecho adsorbe durante un período de 25 horas hasta saturarse. Para operar en régimen continuo es necesario alternar los períodos de adsorción y desorción en las dos torres de las cuales se dispone. Por lo tanto, de los adsorbedores saldrán y entrarán alternativamente diferentes corrientes líquidas, según se esté llevando a cabo la operación de adsorción o regeneración. Mientras se esté produciendo la operación de adsorción a la torre de lecho fijo entra la corriente líquida procedente de la centrífuga CN-02 y sale una corriente líquida cuya composición es idéntica a la del alimentado, pero habiéndose retirado toda la vitamina B<sub>12</sub>. La vitamina B<sub>12</sub> está quedando adsorbida en el lecho de Duolite S861. En caso de que se esté dando la operación de regeneración a la torre de adsorción se alimenta una disolución acuosa de metanol al 40 %, extrayéndose un efluente de la disolución alimentada enriquecido por la cobalamina desorbida del adsorbedor.

El proceso de desadsorción se lleva a cabo en un tiempo de 10 minutos. Tanto el proceso de adsorción como el de desorción se llevan a cabo a 25 °C y pH 5,0. El lecho de adsorción está compuesto por partículas de 0,4 mm de diámetro, con una porosidad interparticular de 0,4.

37 GALLARDO ALFONSO, J. Evaluación de la ruptura celular con molino de bolas en el proceso de obtención del antígeno de la nucleocápsula del virus de la hepatitis. *Convención científica de ingeniería y arquitectura (paper)*, 2012.

38 RAMOS, A. M., OTERO, M. & RODRIGUES, A. E. Recovery of Vitamin B<sub>12</sub> and cephalosporin-C from aqueous solutions by adsorption on non-ionic polymeric adsorbents. *Separation Purification Technology. Elsevier*, 2004, 38, 85-98.

#### 5.1.3.4. Cristalización Fría de Cobalamina

La disolución acuosa de metanol y cobalamina que proviene de la regeneración del lecho de adsorción A-01, se envía al cristalizador CC-01. En el cristalizador CC-01 la disolución de cobalamina se concentra por evaporación a un vacío del 85 % (0,15 atm de presión) y una temperatura de 50 °C. Al evaporarse el disolvente, la solución se concentrará progresivamente. El disolvente gaseoso sale del cristalizador CC-01 hacia el condensador CD-01 donde se condensa enfriando hasta 25 °C para aprovecharse, recirculándolo como agente extractor de nuevo en el adsorbedor.

La disolución concentrada con la cobalamina precipitada pasa del cristalizador CC-01 al filtro F-01 donde, por una parte se obtiene el sólido precipitado como cobalamina de alta pureza (98 %), y por otra, una disolución acuosa de metanol y cobalamina, saturada de ésta.

La cobalamina cristalizada que se obtiene del paso por el filtro F-01 de la disolución de salida del cristalizador CC-01 se enviará a almacenamiento al tanque de sólidos ST-05. No obstante la cobalamina debe almacenarse a 4 °C para evitar su deterioro, por lo que posteriormente a su envío a ST-05 recibirá dicho tratamiento.

La disolución saturada que sale del filtro F-01 se recircula mezclándose con el efluente del adsorbedor A-01, compuesto también por agua, metanol y cobalamina, en el mezclador M-04 para optimizar los resultados de cristalización de vitamina B<sub>12</sub> obtenidos.

En la ilustración 8 se observa el detalle del diagrama de flujo en la etapa post-fermentación.



## 6. CONCLUSIONES

En el presente informe se ha realizado un breve análisis de la posibilidad de implantar una factoría de producción de vitamina B<sub>12</sub> en España. La producción debe llevarse a cabo por métodos microbianos, siendo la única opción viable desde los puntos de vista tecnológico y económico.

La disponibilidad de las materias primas necesarias en el proceso estudiado (agua desionizada, glucosa, licor de maceración de maíz, dihidrógeno fosfato de potasio, cloruro de cobalto, 5,6-dimetilbenzimidazol y la cepa de *Propionibacterium freudenreichii*) estaría asegurada en la práctica totalidad de la península ibérica a precios poco fluctuantes. Este hecho propicia que la ubicación de la instalación pudiese llevarse a cabo en prácticamente cualquier punto de la geografía española.

El estudio de la demanda de vitamina B<sub>12</sub> en España concluye en que la capacidad máxima anual óptima de una planta de producción de cobalamina, que hiciese frente a la totalidad de la demanda nacional, debe ser 200 kg. A la vista de estimaciones propias en el análisis de procesos industriales, se obtiene que una planta de dichas características resultaría rentable produciendo por encima de 1/3 de su capacidad máxima.

Finalmente, se ha descrito brevemente cómo operaría la planta de producción de cobalamina cuya posibilidad de instalación ha sido estudiada.