

UNIVERSIDAD DE INGENIERÍA Y TECNOLOGÍA

CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA



**ESTUDIO DE LA VIABILIDAD TÉCNICA Y
ECONÓMICA PARA LA PRODUCCIÓN DE
VITAMINA B12 POR *PROPIONIBACTERIUM
FREUDENREICHII* EN EL PERÚ**

TESIS

Para optar el título profesional de Ingeniera Química

AUTORES

Claudia Janet Neyra Saavedra (ORCID: 0000-0002-8197-0206)

Jesdely Sugely Velito Pastor (ORCID: 0000-0002-5206-4298)

ASESOR

Úrsula Fabiola Rodríguez Zúñiga (ORCID: 0000-0001-5426-9871)

Lima – Perú

2024

DECLARACIÓN JURADA

Yo, Úrsula Fabiola Rodríguez Zúñiga, identificada con DNI N° 29722081, en mi condición de persona responsable de validar la autenticidad de los trabajos de investigación y tesis de la Universidad de Ingeniería y Tecnología (en adelante, la Universidad), **declaro bajo juramento** lo siguiente:

Que el trabajo de investigación/tesis denominado: "ESTUDIO DE LA VIABILIDAD TÉCNICA Y ECONÓMICA PARA LA PRODUCCIÓN DE VITAMINA B12 POR PROPIONIBACTERIUM FREUDENREICHII EN EL PERÚ" ha sido elaborado, bajo mi asesoría, por Claudia Janet Neyra Saavedra, identificada con DNI N° 70799445 y Jesdely Suguey Velito Pastor, identificada con DNI N° 73607062 para obtener el título profesional de Ingeniería Química.

El trabajo de investigación/tesis antes mencionado ha sido sometido a los mecanismos de control y sanciones anti plagio previstos en la normativa interna de la Universidad, encontrándose un porcentaje de similitud de 0%.

En fe de lo cual firmo la presente.



Barranco, el 09 de septiembre de 2024

Firma del asesor

Dedicatoria:

A nuestros padres, familiares y amigos. Por su apoyo constante e incondicional a lo largo de nuestra carrera y en el proceso de titulación.

Agradecimientos:

A todos nuestros profesores de UTEC, que dedicaron su tiempo a nuestro aprendizaje e impulsaron nuestro potencial.

A nuestra asesora, la Dra. Úrsula Rodríguez Zúñiga, quien nos guió en el proceso del desarrollo del presente trabajo de investigación.

Por su compromiso, su apoyo incondicional, sus enseñanzas y su dedicación.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	9
ABSTRACT	10
INTRODUCCIÓN	11
OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN	13
Objetivo general:	13
Objetivos específicos:	13
CAPÍTULO I	14
REVISIÓN CRÍTICA DE LA LITERATURA	14
1.1. Microorganismos productores de vitamina b12	14
1.1.1. Fuentes de carbono para la producción de vitamina b12	16
1.2. Vías de conducción para la fermentación por <i>P. freudenreichii</i>	17
1.2.1. Fermentación anaeróbica	17
1.2.2. Fermentación en dos fases anaeróbica y aeróbica	17
1.3. Métodos empleados en la fermentación con <i>P. freudenreichii</i>	19
1.4. Recuperación y purificación de la vitamina b12	22
CAPÍTULO II	24
MARCO TEÓRICO	24
2.1. Vitamina b12	24
2.1.1. Estructura y composición química	24
2.1.2. Dosaje y comercialización	25
2.1.3. Estudio de mercado de la vitamina b12 y sus derivados	27
2.2. Microorganismo productores	28
2.2.1. <i>Propionibacterium Freudenreichii</i>	28
2.2.2. Crecimiento microbiano	29
2.2.3. Modelamiento matemático para el crecimiento microbiano	29
2.3. Materias primas para la síntesis de vitamina b12	33
2.4. Fermentación	34
2.5. Etapas importantes posteriores a la fermentación	35
2.5.1. Adsorción	35
2.5.2. Cristalizador - Evaporador	36
CAPÍTULO III	37
MARCO METODOLÓGICO	37
3.1. Determinación de la base de diseño	37
3.2. Planteamiento y descripción de las etapas del proceso	38
3.2.1. Preparación del medio de cultivo y el inóculo	38
3.2.2. Producción de vitamina b12 por fermentación anaerobia	39
3.2.3. Operaciones de separación	40
3.2.4. Operaciones de purificación	41

3.3. Construcción del diagrama de bloques (BFD)	42
3.4. Obtención de parámetros cinéticos	43
3.5. Determinación de volúmenes en el proceso UPSTREAM	44
3.6. Construcción del PFD	44
3.7. Balance de materia del proceso	44
3.8. Balance de energía de los equipos principales	46
3.9. Dimensionamiento de los equipos principales	47
3.9.1. Biorreactor y prefermentadores	47
3.9.2. Intercambiadores de calor	48
3.9.3. Molino de bolas	49
3.9.4. Columnas de adsorción	50
3.9.5. Cristalizador	52
3.9.6. Secado por atomización	52
3.9.7. Equipos de mezcla	53
3.9.8. Tanques de almacenamiento	54
3.10. Planificación del proceso (Scheduling)	54
3.11. Evaluación económica del proceso	55
3.11.1. CAPEX	55
3.11.2. OPEX	56
3.11.3. Flujo de caja	56
3.11.4. Indicadores de rentabilidad	56
3.11.5. Análisis de sensibilidad	57
3.13. Análisis de seguridad	57
CAPÍTULO IV	58
RESULTADOS	58
4.1. Determinación de volúmenes en el proceso UPSTREAM	58
4.2. Construcción del PFD	61
4.3. Balance de materia del proceso	70
4.3.1. Proceso Upstream	71
4.3.2. Proceso Downstream	80
4.4. Balance de energía de los equipos principales	87
4.4.1. Intercambiadores de calor	87
4.4.2. Biorreactor y prefermentadores	89
4.4.3. Centrifugación	90
4.4.4. Molino de bolas	91
4.4.5. Adsorbedor	92
4.4.6. Cristalizador	94
4.4.7. Secador	95
4.5. Dimensionamiento de equipos	97
4.5.1. Intercambiadores de calor	97
4.5.2. Prefermentadores y biorreactor	99

4.5.3. Equipos de mezcla	100
4.5.4. Tanques de almacenamiento	101
4.5.5. Centrífugas	102
4.5.6. Molino de bolas	103
4.5.7. Columna de adsorción	103
4.5.8. Cristalizador	108
4.5.9. Secador	109
4.6. Planificación del proceso (Scheduling)	109
4.7. Evaluación económica del proceso	112
4.7.1. CAPEX	112
4.7.2. OPEX	115
4.7.3. Flujo de caja	116
4.7.4. Indicadores de rentabilidad	118
4.7.5. Análisis de sensibilidad	119
4.8. E-Factor	120
4.9. Análisis de riesgos	122
CONCLUSIONES	126
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128
ANEXOS	141

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1: Información importante para el cultivo de los microorganismos más utilizados en la industria para producir vitamina b12. Adaptada de [6] [21]	15
Tabla 1.2: Matriz de decisión del proceso para la selección del microorganismo. Adaptada de [25][23][26]	16
Tabla 1.3: Matriz de decisión del proceso para la selección de la vías de conducción de la fermentación.	18
Tabla 1.4: Matriz de decisión del proceso para la selección de la configuración del biorreactor.	21
Tabla 2.1: Especificaciones de la vitamina b12. Adaptada de [52]	26
Tabla 2.2: Resumen del crecimiento celular en un cultivo discontinuo. Adaptada de [64]	29
Tabla 2.3: Descripción de las materias primas que componen el medio de cultivo.	33
Tabla 3.1: Rendimientos de la fermentación por lotes de <i>P. freudenreichii</i> . Adaptada de [31]	43
Tabla 3.2: Parámetros necesarios para el dimensionamiento de los prefermentadores y el biorreactor.	47
Tabla 3.3: Parámetros necesarios para el dimensionamiento de los intercambiadores de calor.	49
Tabla 3.4: Parámetros necesarios para el dimensionamiento del molino de bolas.	50
Tabla 3.5: Parámetros necesarios para el dimensionamiento de los intercambiadores de calor.	50
Tabla 3.6: Parámetros necesarios para el dimensionamiento del cristalizador.	52
Tabla 3.7: Parámetros necesarios para el dimensionamiento de los intercambiadores de calor.	52
Tabla 3.8: Parámetros necesarios para el dimensionamiento de los equipos de mezcla.	53
Tabla 3.9: Parámetros necesarios para el dimensionamiento de los tanques de almacenamiento.	54
Tabla 4.1: Datos generales de los equipos del proceso.	65
Tabla 4.2: Tabla de balance de masa etapa upstream.	68
Tabla 4.3: Tabla de balance de masa etapa downstream.	69
Tabla 4.4: Balance de masa general del proceso.	70
Tabla 4.5: Balance de masa de los componentes en el prefermentador 1.	72
Tabla 4.6: Balance de masa de los componentes en el prefermentador 2.	73
Tabla 4.7: Balance de masa de los componentes en el biorreactor.	75
Tabla 4.8: Balance de masa de los componentes en los equipos de mezcla y esterilizadores.	78
Tabla 4.9: Balance de masa de los componentes en la primera centrífuga.	80
Tabla 4.10: Balance de masa de los componentes en la segunda centrífuga.	81
Tabla 4.11: Balance de masa de los componentes en el molino de bolas.	82
Tabla 4.12: Balance de masa de los componentes en adsorbedor.	83
Tabla 4.13: Balance de masa de los componentes en el cristalizador.	84
Tabla 4.14: Balance de masa de los componentes en el secador.	85
Tabla 4.15: Balance de masa de los componentes en el secador.	86

Tabla 4.16: Parámetros para el cálculo en los equipos de calentamiento.	87
Tabla 4.17: Parámetros para el cálculo en los equipos de enfriamiento.	88
Tabla 4.18: Calores generados en las etapas de fermentación.	89
Tabla 4.19: Parámetros para hallar la masa de agua de enfriamiento.	90
Tabla 4.20: Balance de energía de la primera centrifugación.	90
Tabla 4.21: Balance de energía de la segunda ultrafiltración.	91
Tabla 4.22: Datos para el balance energético.	92
Tabla 4.23: Parámetros para hallar la pérdida de presión	93
Tabla 4.24: Parámetros para el cálculo de potencia de la bomba.	93
Tabla 4.25: Balance de energía en el tanque de cristalización.	94
Tabla 4.26: Balance de energía del agua de calentamiento para el tanque de cristalización.	94
Tabla 4.27: Balance de energía del agua de enfriamiento para el condensador.	95
Tabla 4.28: Flujos de energía en el equipo de secado.	95
Tabla 4.29: Síntesis energética para el proceso	96
Tabla 4.30: Dimensionamiento de las bombas pre esterilización.	97
Tabla 4.31: Parámetros y resultados del dimensionamiento de los intercambiadores de calor.	99
Tabla 4.32: Parámetros y resultados del dimensionamiento de los prefermentadores y biorreactor.	99
Tabla 4.33: Parámetros y resultados del dimensionamiento de los equipos de mezcla.	101
Tabla 4.34: Parámetros y resultados del dimensionamiento de los tanques de almacenamiento.	102
Tabla 4.35: Dimensionamiento de la primera centrífuga.	102
Tabla 4.36: Dimensionamiento de la segunda centrífuga.	102
Tabla 4.37: Parámetros del dimensionamiento del molino de bolas.	103
Tabla 4.38: Parámetros para calcular la masa de soluto adsorbida en el tiempo de saturación. Adaptada de [95].	105
Tabla 4.39: Parámetros experimentales para el cálculo de la capacidad de adsorción de la resina.	105
Tabla 4.40: Parámetros para calcular las longitudes de la columna a escala industrial con sólido completamente saturado (LES) y sin saturar (LUB). Adaptada de [87]	106
Tabla 4.41: Parámetros para el cálculo del tiempo de desorción.	107
Tabla 4.42: Parámetros del dimensionamiento de la columna de adsorción.	107
Tabla 4.43: Parámetros del dimensionamiento del cristalizador.	108
Tabla 4.44: Parámetros del dimensionamiento del secador. Adaptado de [91]	109
Tabla 4.45: Tiempos para los equipos del proceso Upstream.	110
Tabla 4.46: Tiempos para los equipos del proceso Downstream.	111
Tabla 4.47: Costo de compra e instalación de los equipos.	112
Tabla 4.48: Factores para el cálculo de los ISBL. Adaptada de [78].	114
Tabla 4.49: Factores para el cálculo de los OSBL, costos de ingeniería y construcción y cargos de contingencia.	114
Tabla 4.50: Resultado del capital de trabajo y el CAPEX.	115
Tabla 4.51: Costos variables.	115
Tabla 4.52: Costos directos, cargos fijos, costos generales y gastos generales. .	115
Tabla 4.53: Resultados de la ganancia bruta anual.	116
Tabla 4.54: Resultados de la ganancia bruta anual - Flujo de caja.	117
Tabla 4.55: Matriz de Análisis de modos y efectos de falla (FMEA). Adaptada de [99]	122

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Método de biorreactor con separación por membrana [13].	20
Figura 1.2. Método ISPR con biorreactor basado en EBAB [24].	20
Figura 1.3. Método de biorreactor batch [31]	21
Figura 2.1. Estructura química de la cobalamina [48].	25
Figura 2.2. Gráfica de velocidad específica de crecimiento vs concentración de sustrato. [64]	31
Figura 2.3. Patrones cinéticos de crecimiento y formación de productos en fermentaciones discontinuas: (a) formación de productos asociados al crecimiento, (b) formación de productos asociados al crecimiento mixto y (c) formación de productos no asociados al crecimiento. [65]	32
Figura 2.4. Progreso de un frente de transferencia de masa estable a través de un lecho de adsorción y de la concentración del efluente [71]	35
Figura 2.5. Sistema de cristalización. [73]	36
Figura 3.1. Diagrama de flujo de la metodología del trabajo de investigación.	37
Figura 3.2. Diagrama de bloques preliminar del proceso.	42
Figura 3.3. Diagrama de flujo para el desarrollo del balance de masas en cada equipo.	45
Figura 4.1. Determinación del volumen de los equipos pertenecientes al tren de siembra.	60
Figura 4.2. PFD producción de vitamina b12.	61
Figura 4.3. PFD Etapa Upstream - producción de vitamina b12.	62
Figura 4.4. PFD Etapa downstream separación - producción de vitamina b12.	63
Figura 4.5. PFD Etapa downstream purificación - producción de vitamina b12.	64
Figura 4.6. Scheduling proceso Upstream.	110
Figura 4.7. Scheduling proceso Downstream.	111
Figura 4.8. Análisis de sensibilidad del VAN con respecto al precio de venta, el gasto por materias primas, el gasto por utilidades, y los costos de ISBL y OSBL.	119

RESUMEN

Este estudio evalúa la viabilidad técnica y económica para el diseño de un proceso de producción de vitamina b12 por *Propionibacterium freudenreichii* en el Perú. Plantea el proceso de producción desde las etapas de preparación (del inóculo y del medio de cultivo), fermentación, separación (centrífuga y molienda) y purificación (adsorción, desorción, cristalización y secado) ejemplificado en un diagrama de flujo de procesos (PFD). Este proceso contempla un tiempo de fermentación por lote de 144 h, con volúmenes del biorreactor ($31.97 m^3/lote$) y de los prefermentadores ($0.69 m^3/lote$ y $0.02 m^3/lote$). Asimismo, el diseño posee un 85.6 % como rendimiento total del proceso y produce un 1.163 kg de vitamina b12 por lote con una pureza del 98%. La energía consumida del proceso fue de 2378.08 kW/lote. Con base en estos resultados, se dimensionaron los equipos. La evaluación económica indica que para una proyección de 20 años en la que se procesan 51 lotes por año, el valor presente neto del proyecto es de 12.4 millones de dólares y la tasa interna de retorno es de 19.5%. Asimismo, el análisis de sensibilidad reveló que el proyecto es rentable hasta una variación del -27 % del precio de la vitamina b12. Además, se obtuvo un E-Factor de 26215 debido a la alta pureza requerida para la producción de vitamina b12. Por último, se desarrolló el análisis de riesgos, evaluando las posibles fallas de cada equipo y planteando propuestas de solución.

Palabras clave: Bioproceso, vitamina b12, cobalamina, fermentación anaeróbica, cinética, *Propionibacterium Freudenreichii*.

ABSTRACT

ESTUDIO DE LA VIABILIDAD TÉCNICA Y ECONÓMICA PARA LA PRODUCCIÓN DE VITAMINA B12 POR *PROPIONIBACTERIUM FREUDENREICHII* EN EL PERÚ

This study evaluates the technical and economic feasibility of designing a process for the production of vitamin b12 using *Propionibacterium freudenreichii* in Peru. It outlines the production process from the preparation stages (inoculum and culture medium), fermentation, separation (centrifuge and grinding) and purification (adsorption, desorption, crystallization and drying) exemplified in a process flow diagram (PFD). This process contemplates a batch fermentation time of 144 h, with volumes of the bioreactor (31.97 m³/batch) and the prefermenters (0.69 m³/batch and 0.02 m³/batch). Likewise, the design has a total process efficiency of 85.6% and produces 1,163 kg of vitamin B12 per batch with a purity of 98%. The energy consumed by the process was 2378.08 kW/batch. Based on these results, the equipment was sized. The economic evaluation indicates that for a 20-year projection in which 51 batches are processed per year, the net present value of the project is 12.4 million dollars and the internal rate of return is 19.5%. Likewise, the sensitivity analysis revealed that the project is profitable up to a variation of -27% in the price of vitamin B12. In addition, an E-Factor of 26215 was obtained due to the high purity required for the production of vitamin B12. Finally, the risk analysis was developed, evaluating the possible failures of each equipment and proposing solutions.

Keywords: Bioprocess, vitamin b12, cobalamin, anaerobic fermentation, kinetics, *Propionibacterium Freudenreichii*.

INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años, la demanda de suplementos y vitaminas en las industrias de alimentos, farmacéuticas y cosméticas ha incrementado debido al aumento del interés en las personas por adquirir estos productos. En tal sentido, dentro del grupo de las vitaminas, se encuentra la vitamina b12 (cianocobalamina), una sustancia de gran importancia para nuestro organismo, porque ayuda a mantener el sistema nervioso central estable y sirve para la formación de glóbulos rojos en la sangre [1]. Esta vitamina se encuentra en productos de origen animal como carnes, leche, huevos, mariscos y queso, pero no en alimentos de origen vegetal [2]. Por lo que, las personas que no consumen alimentos de origen animal, como los veganos y vegetarianos, y personas con dificultad de adsorción de vitamina b12, se ven perjudicadas por la falta de esta en su nutrición.

Por ejemplo, en América Latina existe un 7% de la población en tendencia creciente que no consume carnes ni derivados, con perspectivas de crecimiento [3]. Asimismo, se ha encontrado que al menos un 40% de la población presenta desórdenes gástricos y otros problemas que dificultan la absorción de esta vitamina en sus organismos [4]. Por lo tanto, es necesario que estas personas aumenten la dosis de esta vitamina para que puedan llegar a su requerimiento diario y no padezcan problemas neurológicos, trastornos hematológicos, enfermedades cardiovasculares, entre otros [1]

De igual forma, se ha reportado que la población peruana también cuenta con un alto porcentaje de personas con déficit de esta vitamina. Tal es el caso de los veganos y vegetarianos, representando un 8% del total [3]. Asimismo, el 22% de los adultos mayores entre 65 y 75 años presentan esta falta de vitamina b12 [5], al igual que el 11% de los niños menores de 5 años de las regiones de Huancavelica y Ucayali [6].

Por otra parte, en cuanto a las importaciones de la vitamina b12 y sus derivados a nivel nacional, se tiene un total de 14 942 kg, lo cual genera un gasto anual de 11 203 000 US\$ [7]. Asimismo, los países de donde más se importa son China representando un 76% de las importaciones de vitamina b12 con un monto de 8 476 400 US\$ y Francia con un 16% del total que asciende a los 1 742 300 US\$ [7]. Igualmente, el precio al por mayor difiere según la industria para la que va a ser utilizada la vitamina y el laboratorio del cual es adquirida,

siendo 89676 US\$/kg el monto aproximado a pagar para las industrias farmacéuticas y cosméticas, mientras que la industria de suplementos alimenticios para animales compra la cobalamina a un precio de 460.3 US\$/kg [8].

En tal sentido, dada la demanda de cobalamina generada en el Perú, se revisaron diversos estudios para encontrar un método viable para la producción de vitamina b12, debido a que al ser una molécula compleja, genera que su síntesis química conste de más de 60 pasos ocasionando un proceso inviable [9]. Hoy en día, la producción industrial de dicha vitamina se realiza mediante fermentación microbiana por diversas bacterias, entre las más usadas tenemos a: *Pseudomonas denitrificans*, *Propionibacterium shermanii* y *Propionibacterium freudenreichii*, debido a su alta y natural productividad, rápido crecimiento [10] y a que son reconocidas como “Generally Recognized as Safe” (GRAS) por parte de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos [11]. En relación con ello, el presente trabajo tiene como alcance presentar el estudio de la viabilidad técnica y económica para el diseño del proceso de producción de vitamina b12 en Perú por fermentación microbiana. En tal sentido, se diseñarán y dimensionarán las siguientes secciones: preparación del cultivo, fermentación, etapas de separación (ultrafiltración y molienda) y purificación (adsorción y secado), para producir vitamina b12 de manera económica y segura. Para esto, será necesario considerar algunos factores, tales como: la capacidad de producción, la cinética del proceso de fermentación, el balance de masa y energía, el dimensionamiento de los equipos, el análisis económico del estudio con indicadores como el CAPEX, OPEX, VAN, TIR y análisis de sensibilidad, entre otros. Por último, debido a la falta de programas licenciados para el diseño de este tipo de procesos, los cálculos serán realizados con Excel a partir de datos extraídos de la literatura científica.

OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN

Objetivo general:

- Diseñar un proceso para la producción de vitamina b12 por *Propionibacterium freudenreichii* en Perú y evaluar su viabilidad económica.

Objetivos específicos:

- Determinar la capacidad productiva del proceso a partir de la demanda de la vitamina b12 para consumo humano en el Perú.
- Identificar las etapas unitarias upstream y downstream, a fin de proponer un bioproceso para la producción de la vitamina b12.
- Diseñar y dimensionar los equipos upstream, como: el biorreactor, los trenes de siembra, los tanques de mezcla y los esterilizadores, a partir de los parámetros cinéticos y los cálculos de balance de materia y energía.
- Diseñar y dimensionar los equipos downstream, en base a los resultados obtenidos del proceso upstream y la capacidad de diseño.
- Evaluar la viabilidad económica del proceso en términos de los indicadores económicos (CAPEX, OPEX, VAN y TIR) y realizar un análisis de sensibilidad.
- Realizar el cálculo del factor medioambiental (E-factor) para evaluar la eficiencia del proceso en términos de la cantidad de residuos y subproductos.
- Evaluar la seguridad del proyecto por medio de un análisis de efectos y criticidad del modo de falla de los equipos.

CAPÍTULO I

REVISIÓN CRÍTICA DE LA LITERATURA

A continuación, se examinan los diversos microorganismos productores propuestos para la fermentación. Luego, se discuten las dos formas de conducción de la fermentación para la bacteria *Propionibacterium freudenreichii*. Posteriormente, se comparan las diversas técnicas o métodos empleados para la fermentación; y, por último, se examinan las operaciones más adecuadas para la recuperación y purificación de la vitamina b12.

1.1. Microorganismos productores de vitamina b12

Los microorganismos productores de vitamina b12 se dividen en dos grupos según su respiración celular: los anaeróbicos (*Propionibacterium freudenreichii*, *Propionibacterium shermanii*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Bacillus megaterium*, *Salmonella typhimurium*, *Rhodopseudomonas protamicus* y *Escherichia coli*) y los aerobios (*Nocardia rugosa*, *Pseudomonas denitrificans*, *Nocardia gardneri*, *Acetobacter pasteurianus*, *Streptomyces olivaceus*, *Pseudomonas sp.* y *Rhizobium cobalaminogenum*) [12][13]. Sin embargo, los cultivos de bacterias que más han sido estudiados para la producción de esta vitamina han sido las *Pseudomonas denitrificans*, *Acetobacterium sp.*, *Propionibacterium freudenreichii* y *Propionibacterium shermanii* [14]. En la actualidad, con los avances biotecnológicos y la modificación genética, se están investigando las especies *Bacillus megaterium* y *Escherichia coli* para mejorar el rendimiento de este proceso mediante manipulación de ADN [15].

Las especies *Pseudomonas denitrificans*, *Propionibacterium freudenreichii* y *Propionibacterium shermanii* son las más utilizadas para este proceso, sobre todo en la industria, debido a su alta productividad natural y a su rápido crecimiento [16]. En tal sentido, el microorganismo *Pseudomonas denitrificans* cuenta con una alta productividad de 60 mg/L, si se utiliza como sustrato sacarosa, y de 214.3 mg/L, si se le añade el precursor vitamínico 5,6-dimetilbenzimidazol (DMBI) tal como se presenta en la tabla 1.1, esta fermentación dura

hasta 168 horas [10]. Por otra parte, las bacterias *Propionibacterium freudenreichii* y *Propionibacterium shermanii* son las que cuentan con el reconocimiento Generally Recognized as Safe (GRAS) de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) [17]. Ambas poseen una alta productividad de vitamina b12 (de 60.0 mg/L con *Propionibacterium shermanii* y de 206.0 mg/L con *Propionibacterium freudenreichii* en proceso semicontinuo) sin requerir de manipulación genética, usando como sustrato glucosa y 5,6-dimetilbenzimidazol (DMBI) como precursor vitamínico [18], este tipo de fermentación se da en 120 h [19]. Asimismo, es fundamental tener en cuenta un buen control de la concentración de los subproductos metabólicos inhibidores como: el ácido propiónico [14], el ácido succínico y ácido acético [20].

Tabla 1.1: Información importante para el cultivo de los microorganismos más utilizados en la industria para producir vitamina b12. Adaptada de [6] [21]

Vía	Especies de microorganismos	Principales sustratos	Reactor	Producción	
				[mg/L]	Fuente
aerobio	<i>Pseudomonas denitrificans</i>	Sacarosa, betaína	Batch	60.0	[18]
		Sacarosa, betaína, DMBI	Batch	204.3	[22]
		Sacarosa, betaína, DMBI	Semicontinuo	177.0	[22]
		Sacarosa, betaína, DMBI	Semicontinuo	200.8	[16]
anaerobio	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	Lactato	Batch	1.7	[23]
		Glucosa, DMBI	Semicontinuo	206.0	[18]
		Glucosa, DMBI	Semicontinuo	56.76	[13]
		Glucosa, DMBI	ISPR semicontinuo	43	[24]
		Glucosa, glicerol, DMBI	Semicontinuo	43.2	[24]
		<i>Propionibacterium shermanii</i>	Glucosa, DMBI	Semicontinuo	60.0

1.1.1. Fuentes de carbono para la producción de vitamina b12

Las fuentes de carbono para la bacteria *P. freudenreichii* pueden ser alcoholes como metanol, etanol e isopropanol; hidrocarburos como alcanos, decano y hexadecano y la más usada a nivel industrial la glucosa [25]. Existen dos sustratos posibles para la obtención de vitamina b12 por un lado el lactato con una producción de 1.7 mg/L [23], y por el otro, la glucosa con DMBI con un rendimiento de 206.0 mg/L [26] siendo esta última la opción más recomendable para producción comercial por su alto rendimiento que puede ser comparada con la productividad de la *Pseudomonas denitrificans*, utilizando como sustrato sacarosa, betaína y DMBI, pero con una especie más segura para la industria de alimentos. Por lo que en este estudio el sustrato empleado es la glucosa.

En tal sentido, la siguiente matriz de decisión (tabla 1.2) resume los criterios de consumo de oxígeno, condiciones de operación como la temperatura y presión, cinética y capacidad de producción, únicamente para los microorganismos *Pseudomonas denitrificans* y *Propionibacterium freudenreichii*, debido a que son los más empleados para este tipo de procesos dentro del resto de microorganismos. Donde 5 es la puntuación más alta para el microorganismo que más se ajusta a cada criterio, siendo *propionibacterium freudenreichii* con 24 puntos.

Tabla 1.2: Matriz de decisión del proceso para la selección del microorganismo. Adaptada de [25][23][26]

Microorganismo	Consumo de oxígeno	Condiciones de operación	Cinética	Capacidad de producción	Seguridad	Total
<i>Pseudomonas denitrificans</i>	1	5	3	5	3	17
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	4	5	5	5	5	24

Donde:

- Consumo de oxígeno: 1 mayor consumo de oxígeno - 5 nulo consumo de oxígeno
- Condiciones de operación: 1 temperatura y pH extremos - 5 temperatura moderada y pH neutro
- Cinética: 1 mayor tiempo de fermentación - 5 menor tiempo de fermentación
- Capacidad de producción: 1 menor producción - 5 mayor producción

- Seguridad: 1 menos aprobado para consumo humano - 5 más aprobado para consumo humano

1.2. Vías de conducción para la fermentación por *P. freudenreichii*

1.2.1. Fermentación anaeróbica

Existen dos vías para la producción de vitamina b12, aeróbico y anaeróbico (Tabla 1), estas tienen pasos similares, pero se diferencia que el Cobalto se inserta durante la etapa inicial de la biosíntesis de vitamina b12 en la vía anaeróbica, mientras que esta reacción ocurre después de varios pasos en la formación del anillo de corrina en la vía aerobia [27]. Bykhovskii, Zaitseva y Eliseev reportaron la fermentación sumergida y anaeróbica en una fase para la producción de vitamina b12 por *Propionibacterium freudenreichii* alcanzando rendimientos de 206.0 mg/L [14] [18]. Esta se lleva a cabo en un tanque agitado discontinuo y con un impulsor mecánico a una temperatura de 30°C y pH de 7 por un tiempo de 120 h. El precursor vitamínico que es el DMBI es agregado a las 84 h con la finalidad de aumentar el rendimiento de la producción microbiana de la cobalamina [22]. El medio de fermentación consiste en una solución buffer (dihidrógeno fosfato de potasio) para un mantener pH neutro y tiene como fuente de carbono la glucosa, como fuente de nitrógeno al sulfato de amonio, además del licor de maceración de maíz, y cloruro de cobalto que proporciona el ión cobalto que requiere la cobalamina [14]. Se le puede añadir cianuro de hidrógeno, el cual es peligroso, o cianuro de potasio para transformar toda la cobalamina en cianocobalamina [28], la forma más estable de la vitamina b12 que no se encuentra en la naturaleza.

1.2.2. Fermentación en dos fases anaeróbica y aeróbica

Si bien la vía más utilizada es la anaerobia, el *Propionibacterium freudenreichii* es un microorganismo aerotolerante porque al optar por un modelo anaeróbico/aeróbico el anillo de corrina de vitamina b12 se sintetiza por la vía anaeróbica mientras que la síntesis del ligando inferior requiere oxígeno [27]. Para esta fermentación en dos fases es fundamental una sal de cobalto para formar la cobalamina y el medio que consta de glucosa, licor de fermentación de

maíz y betaína. Las condiciones de pH y temperatura son las mismas que en la fermentación anterior, 7.5 y 30°C respectivamente. Al añadir el inóculo, luego de la esterilización, inician las fases de producción. Primero la anaeróbica que dura entre 2 a 4 días y se forma en su mayoría 5 -deoxyadenosylcobinamida sin oxígeno; y luego, se realiza la siguiente etapa aeróbica que dura 4 días donde hay aireación (O₂) y se produce pseudo-cobalamina donde se pueden obtener niveles de cobalamina de hasta vitamina b12 de 0,6 µg/ml [29]. A nivel industrial, estas dos fases se dan de forma continua utilizando dos reactores [25].

En tal sentido, la siguiente matriz de decisión (tabla 1.3) resume los criterios de consumo de oxígeno, condiciones de operación como la temperatura y presión, cinética, producción de vitamina b12 y complejidad del proceso detallados previamente. Donde 5 es la puntuación más alta que se le otorga a la vía de fermentación que más se ajusta a cada criterio, siendo la fermentación anaeróbica la seleccionada para este estudio.

Tabla 1.3: Matriz de decisión del proceso para la selección de la vías de conducción de la fermentación.

Vías para la fermentación	Consumo de oxígeno	Condiciones de operación	Cinética	Producción de vitamina b12	Complejidad del proceso	Total
Fermentación anaeróbica	5	5	5	5	5	25
Fermentación anaeróbica y aeróbica	2	5	3	1	4	15

Donde:

- Consumo de oxígeno: 1 mayor consumo de oxígeno - 5 nulo consumo de oxígeno
- Condiciones de operación: 1 temperatura y pH extremos - 5 temperatura moderada y pH neutro
- Cinética: 1 mayor tiempo de fermentación - 5 menor tiempo de fermentación
- Producción de vitamina b12: 1 menor producción - 5 mayor producción
- Complejidad de proceso: 1 mayor complejidad - 5 menor complejidad

1.3. Métodos empleados en la fermentación con *P. freudenreichii*

Uno de los subproductos generados durante la fermentación es el ácido propiónico. Este compuesto producido en gran cantidad ocasiona la inhibición de las bacterias. Es por ello que se debe de tener un control de dicho subproducto para el libre crecimiento de las células microbianas y la biosíntesis de vitamina b12 [30].

En tal sentido, uno de los métodos empleados para la producción de esta vitamina es la biosíntesis ex situ de vitamina b12 utilizando como tecnología el acoplamiento de separación por membrana. Aquí, el fermentador se conecta directamente con una membrana, la cual permite separar y recircular al biorreactor las moléculas pequeñas (agua, aminoácidos, ácido propiónico, glucosa) de las células *P. freudenreichii*, consiguiendo una suspensión celular concentrada a la que se le añade DMBI para obtener vitamina b12 [13]. Con este método se alcanza una concentración de 56.76 mg/L de vitamina b12 en 144 h [13].

Por otro lado, Wang et al. (2012), presentan el método ISPR (eliminación de producto in situ) para la producción simultánea de ácido propiónico y vitamina b12 con un biorreactor basado en EBAB (biorreactores de adsorción de lecho expandido), el cual recupera ácido propiónico por medio de un sistema de columnas y permite que el caldo de fermentación con las células microbianas mantengan un nivel de ácido propiónico adecuado para el crecimiento de estas y la biosíntesis de vitamina b12 [24]. La fermentación por este método permite obtener una concentración de vitamina b12 de 43,04 mg/L en 160 h [24].

Por último, el tipo de biorreactor más empleado es el batch, donde no hay una separación del ácido propiónico durante la fermentación. De acuerdo con el estudio realizado por Wang et al. (2015) afirman que el control de la concentración de ácido propiónico de 10 a 20 g/l en la etapa inicial (desde el inicio hasta las 60 h) y de 20 a 30 g/l en la etapa tardía de la fermentación (desde las 60 h hasta el final del proceso) puede mitigar la inhibición celular y mejorar la biosíntesis de vitamina b12 [24].

En tal sentido, la experimentación realizada por Wang et al. (2014), donde no se elimina el ácido propiónico durante la fermentación, presenta como resultado una cinética que mantiene la concentración de ácido propiónico en los intervalos establecidos por el anterior estudio; y a

pesar de obtener una concentración de vitamina b12 menor que los anteriores métodos (42.5 mg/L), el tiempo de fermentación (120 h) y la simplicidad del método hacen que la fermentación en un biorreactor batch sea la mejor opción a emplear [31]. De esta manera, las figuras 1.3.1, 1.3.2 y 1.3.3 presenta las gráficas de dichos métodos de fermentación.

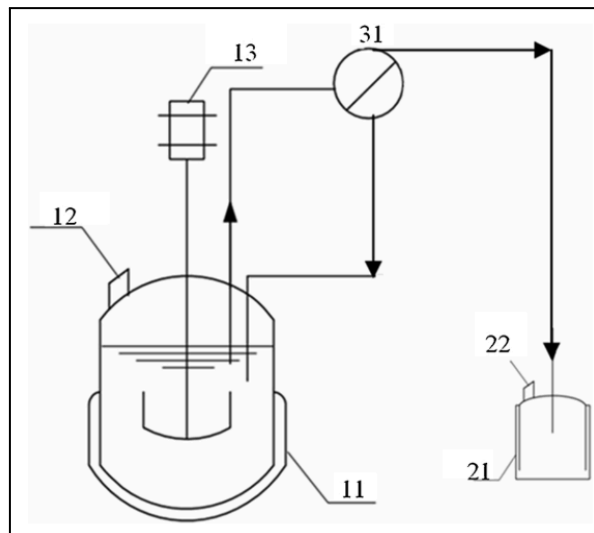


Figura 1.1. Método de biorreactor con separación por membrana [13].

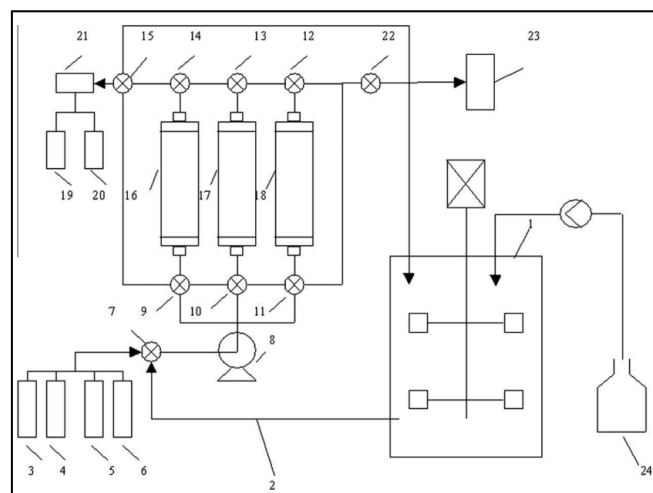


Figura 1.2. Método ISPR con biorreactor basado en EBAB [24].

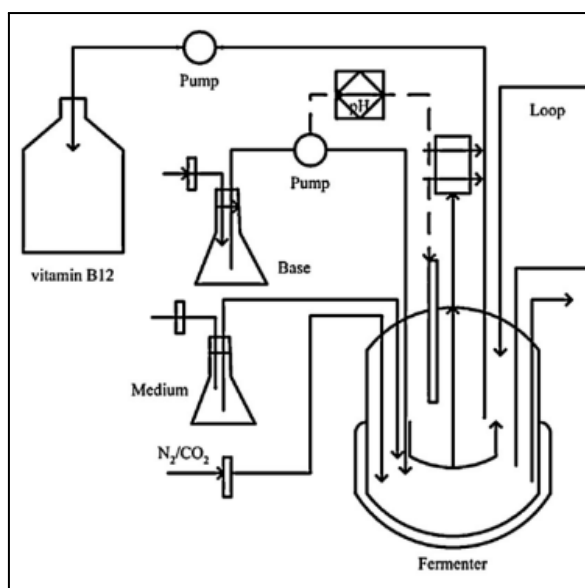


Figura 1.3. Método de biorreactor batch [31]

En tal sentido, la siguiente matriz de decisión (tabla 1.5) resume los criterios de condiciones de operación, complejidad en la biorreacción, cinética de formación del producto y capacidad de producción. Donde 5 es la puntuación más alta que se le da al biorreactor que mejor se ajusta a cada criterio, en el cual el biorreactor batch, recibe la mayor calificación por su simplicidad, pese a una menor capacidad de producción.

Tabla 1.4: Matriz de decisión del proceso para la selección de la configuración del biorreactor.

Biorreactor	Condiciones de operación	Complejidad en la biorreacción	Cinética de formación del producto	Capacidad de producción	Total
Biorreactor con separación con membrana	5	3	3	5	16
ISPR con reactor basado en EBA	5	2	4	4	15
Biorreactor batch	5	5	5	4	19

Donde:

- Condiciones de operación: 1 temperatura y pH extremos - 5 temperatura moderada y pH neutro

- Complejidad de proceso: 1 mayor complejidad - 5 menor complejidad
- Cinética: 1 mayor tiempo de fermentación - 5 menor tiempo de fermentación
- Capacidad de producción: 1 menor producción - 5 mayor producción

1.4. Recuperación y purificación de la vitamina b12

La recuperación y purificación de la vitamina b12 se compone de diversas etapas: centrifugación, molienda, adsorción, cristalización y secado [32]. En primer lugar, se separa el microorganismo del medio de cultivo mediante una centrifugación, una operación comúnmente empleada a gran escala [14], incluso existen pruebas a escala piloto que utilizan la centrífuga a 5000 rpm logrando una buena separación [32] [34]. Así, la baja temperatura de funcionamiento, la purificación y concentración lograda, son las principales ventajas de la centrífuga frente a otras tecnologías, ya que garantiza la estabilidad del producto [35]. Por otro lado, la producción de la vitamina b12 es intracelular por lo que necesita de una liberación del producto mediante una lisis celular por medio de operaciones térmicas, tratamiento con enzimas bacteriológicas, disrupción mecánica de las células, tratamiento con productos químicos, entre otros [33]. Dentro de estas operaciones, la más empleadas son la disrupción mecánica por molino de bolas [36] y la térmica que requiere mantener a los microorganismos a 90°C durante un periodo de 6h [33], elevando los costos operacionales. Posteriormente, se realiza otra separación empleando nuevamente una centrífuga, para remover los debrís celulares [28] del medio intracelular, en donde se encuentra el producto de interés [37]. En esta etapa el nivel de pureza es de 80%, apto para industria de alimentos para animales, mas no para uso humano farmacéutico que requiere una pureza mayor al 95%. Por ende, se añaden las etapas de adsorción y desorción en torres de empacados de intercambio iónico con resinas como IRC-50 o Duolite S861 y consecutivamente una elución con un compuesto fenólico como solvente de la cobalamina [36].

Por último la fase líquida que contiene la vitamina b12 se somete a tratamientos de cristalización pues este equipo es ampliamente usado en escala industrial por su versatilidad dado que se puede obtener una pureza de 99 %, manejar la operación para que se produzcan cristales uniformes y las temperaturas de operación son moderadas [38]; esta unidad opera al vacío a 0.15 atm y 49°C [36] que luego se deriva a una operación de secado, en donde se busca obtener un polvo rojo cristalino con una pureza del 98%, apta para el consumo humano [33]. En tal sentido, para esta última etapa se recomienda el empleo de un secador por

atomización, debido a que presenta un ahorro energético mejorado, tiene una mayor capacidad de operación y el tiempo de operación es menor ya que no posee una gran cantidad de pasos a desarrollar como en el filtro - secador [39] [40]. Asimismo, solo consume aire para la separación, el cual no representa un gasto económico, a diferencia del filtro que emplea agua para el lavado del producto y nitrógeno gaseoso para la esterilización del medio [41]. Por último, en el secador, la vitamina b12 se logra recuperar en su totalidad gracias a la geometría del equipo, a comparación del filtro, en donde muchas veces quedan trazas de torta en el filtro generando además un riesgo o potencial de contaminación cruzada para el siguiente lote [42].

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Vitamina b12

La vitamina b12 o cobalamina, es una vitamina hidrosoluble y un micronutriente esencial para el organismo. Esta se encuentra en los alimentos de origen animal y su producción comercial es bacteriana [43]. Además, funciona como coenzima para regular reacciones bioquímicas cruciales en las células, incluido el metabolismo de aminoácidos y ácidos grasos, la biotransformación de proteínas, la producción de energía, el correcto funcionamiento del sistema neurológico, la síntesis de hemoglobina, así como la síntesis y regulación del ADN (Anexo 1) [44].

2.1.1. Estructura y composición química

La estructura química de la vitamina b12 observada en la Figura 1, está conformada por una estructura tetrapirrol que presenta un núcleo corrina, dando lugar a un núcleo macrocíclico casi plano el cual posee un átomo central de cobalto [28]. Dicho ión, se encuentra compuesto por seis valencias: cuatro de las cuales están unidas a anillos pirrol reducidos, los cuales a su vez poseen tres tipos de sustituyentes como metilos, acetamidos y propionamidos; otra se encuentra unida al 5,6-dimetilbenzimidazol, el cual se encuentra enlazado al grupo propionamide de uno de los anillos pirrol; y la última está unida a diferentes radicales, los cuales indican la familia de cobalamina en la que se encuentra la molécula ya sea cianuro (cianocobalamina), hidroxilo (hidroxicobalamina), metilo (metilcobalamina) y desoxiadenosil (desoxiadenosilcobalamina) [45][46][47]. En tal sentido, la figura 2.1 muestra la estructura química de nuestra molécula.

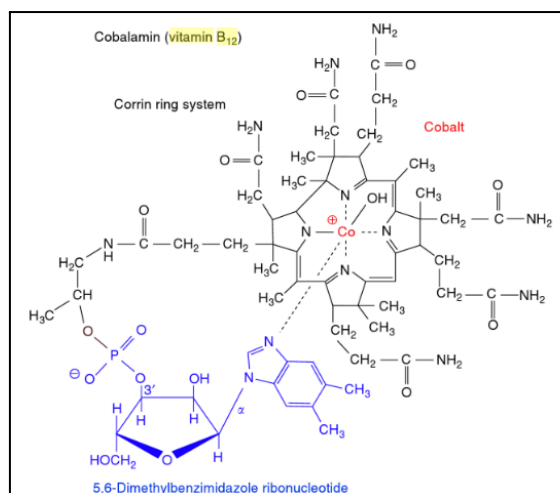


Figura 2.1. Estructura química de la cobalamina [48].

La fórmula molecular de la vitamina es $C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$, y se presenta en la forma de un sólido cristalino de color rojo oscuro, inodoro, higroscópico, estable en un rango de pH de 4 a 6, soluble en solventes altamente polares y no soluble en compuestos orgánicos [45]. Asimismo, su bioquímica es explicada por medio de la química mediada por el ion cobalto y su capacidad para formar enlaces cobalto-carbono. En síntesis, el cobalto posee la capacidad de cambiar su estado de oxidación a Co(I), Co(II) y Co(III), facilitando diversas reacciones en el organismo [48].

2.1.2. Dosaje y comercialización

Las industrias farmacéutica y alimentaria han visto la forma de presentar a la cobalamina como medicamento o añadirlo en suplementos alimenticios para llegar al requerimiento diario de esta vitamina en las personas. Es así como esta sustancia se suele encontrar en conjunto con otras vitaminas del complejo B o individualmente [49], y de acuerdo a la deficiencia presentada por el paciente, la vitamina b12 se administra en una dosis de 3 mg por día (para personas con buena absorción de vitamina b12) o de 1000 - 2000 mg por día (para personas con mala absorción o déficit de vitamina b12) [50].

Asimismo, se establecen ciertas especificaciones que se deben cumplir al momento de comercializar este producto (Anexo 2). En este sentido, según la Farmacopea Europea, la producción de vitamina b12 por fermentación debe de alcanzar una pureza del 80% para

consumo animal y del 96% para consumo humano [51]. Además, el producto obtenido ha de conservarse en recipientes sellados que impidan el paso de la luz y la humedad. La Tabla 2.1 reúne algunas de las especificaciones de esta vitamina.

Tabla 2.1: Especificaciones de la vitamina b12. Adaptada de [52]

Nombre comercial	Cianocobalamina
Fórmula química	$C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$
Forma y color	Polvo rojo oscuro
Sabor y olor	Insípido e Inodoro
pH	6
Densidad relativa	1.35 a los 20°C
Solubilidad	Soluble en agua o etanol Insoluble en acetona, cloroformo y éter
Punto de fusión	> 300 °C (se descompone antes de fundirse)
Condición de almacenamiento	Bien cerrado y seco
Temperatura de almacenamiento	2 - 8 °C

Por otra parte, existen 3 formas para comercializar esta vitamina:

- Spary Nasal: se emplea para el mantenimiento de las concentraciones de vitamina b12 tras la normalización con terapia intramuscular en pacientes con deficiencia, más no para tratar la deficiencia de vitamina b12 recién diagnosticada [53] [54].
- Formas inyectables: se usan para tratar las deficiencias de vitamina b12 por diversas causas, con o sin manifestaciones neurológicas. Estas se pueden administrar por vía intramuscular o subcutánea profunda pero nunca se ha de aplicar por vía intravenosa [55] [54].
- Formas orales: se utilizan en pacientes que necesiten suplementos por diversas razones. Sin embargo, no se recomienda en pacientes con malabsorción, debido a que estas formas se absorben principalmente en el tracto gastrointestinal [56] [54].

2.1.3. Estudio de mercado de la vitamina b12 y sus derivados

El aumento en la adopción de hábitos relacionados con la salud y el bienestar por parte de los consumidores, junto con el creciente enfoque en la prevención promovido por las recientes políticas de salud pública, ha llevado a un incremento en el uso de vitaminas y suplementos alimenticios [28]. En tal sentido, el mercado global de estos compuestos incrementó su tamaño, convirtiéndose en uno altamente competitivo.

En este contexto, la vitamina b12 y sus derivados (mecobalamina, empleada como suplemento para tratar deficiencias de vitamina b12; cobamina, presente en suplementos específicos; adenosilcobalamina, que desempeña un papel crucial en el metabolismo de los ácidos grasos y en la producción de energía celular; entre otros) están aumentando su empleo en varias industrias de consumo final, como suplementos dietéticos, bebidas funcionales, alimentos, cosméticos, entre otros, debido a sus múltiples beneficios y la creciente demanda de productos con etiquetas limpias [49] [57].

Dicho esto, los principales países consumidores de estos compuestos son: Estados Unidos, dominando el mercado americano debido a su alto consumo de estos productos en forma de polvo; Alemania, controlando el mercado europeo debido al alto consumo rutinario de los usuarios; y China, manejando el mercado de Asia y del Pacífico debido a que posee una gran población interesada en consumir una gran cantidad de suplementos vitamínicos naturales [57] [58].

Por otro lado, en cuanto al mercado de exportaciones, el país con un mayor porcentaje de exportación de la vitamina b12 y sus derivados es China, con un monto de \$165 M; seguido de Francia, que cubre un monto de \$50,6 M y los Países Bajos con un total de \$24.2 M, representando un 49.8%, 15.3% y 7.31%, respectivamente. Por otra parte, al respecto de las importaciones, los países que cuentan con un mayor porcentaje son: Estados Unidos, con un total de \$72.4 M; India, con \$35.3 M y Países Bajos con \$14.4 M; representando un 21.8%, 10.7% y 4.36% del total mundial importado, respectivamente [59].

Con respecto al mercado peruano, el total importado de esta vitamina y sus derivados fue 14942 kg, lo cual representa un gasto anual de 11 203 000 US\$. Asimismo, los países de donde más se importa son: China con un 76% de las importaciones y un monto de 8 476 400

US\$, Francia con un 16% del total que asciende a los 1 742 300 US\$, y Austria con un 5.8% y un total de 644 400 US\$ [7].

Finalmente, el precio de venta de esta vitamina por parte de las empresas productoras es muy variable y se encuentra dentro de un rango de 1000 a 100 \$/g aproximadamente. En tal sentido, se cuenta con las siguientes compañías: Alfa Aesar, ubicada en Estados Unidos y con una venta de vitamina b12 de 121 \$/g; TCI Chemical, localizada en China y con un precio de 800 \$/g; Sigma Aldrich, situada en Alemania y con un monto de 606 \$/g; Crysdot, encontrada en Estados Unidos y con un valor de vitamina b12 de 180 \$/g; Frontier Specialty Chemicals, ubicada en Estados Unidos y con un precio de venta de 105 \$/g; DC Chemicals, situada en Reino Unido y con un monto de 800 \$/g; entre otros [64].

2.2. Microorganismo productores

2.2.1. *Propionibacterium Freudenreichii*

La *Propionibacterium freudenreichii* es una actinobacteria, perteneciente al grupo de las bacterias propiónicas. Este microorganismo se divide en dos subespecies, la *Propionibacterium freudenreichii sp. shermanii* o también conocida como *Propionibacterium shermanii*, y la *Propionibacterium freudenreichii sp. freudenreichii* o también llamada *Propionibacterium freudenreichii*. Esta última se emplea tradicionalmente en la industria alimentaria como productor de vitaminas y probióticos comerciales, así como para la elaboración de bioconservante e iniciador de maduración de quesos [61]. Asimismo, esta bacteria es de crecimiento lento e inmóvil, posee una forma de bacilo y no es formadora de esporas [28]. En vista de ello, las *Propionibacterium freudenreichii* trabajan en un ambiente anaerobio pudiendo fermentar una variedad de sustratos, incluidos carbohidratos, azúcares, polioles (glicerol, eritritol y adonitol) y ácidos orgánicos (ácidos láctico y glucónico), y dando como principales productos al CO₂ y los ácidos propiónicos, acéticos y succínicos [62].

2.2.2. Crecimiento microbiano

De acuerdo con lo anterior, la evolución en el tiempo de la bacteria estudiada sigue un comportamiento típico. Este crecimiento es denotado en cuatro etapas: la fase de adaptación, la fase exponencial, la fase estacionaria y la fase de muerte. Es deseable que la primera fase tenga una duración muy corta dentro del biorreactor, inoculando bacterias que se encuentren en la fase exponencial preparadas anteriormente en el tren de siembra [28]. En la etapa de crecimiento exponencial, es requerible tener un control sobre el medio, ya que algunos de los subproductos generados, como el ácido propiónico, pueden afectar el crecimiento y desarrollo bacteriano debido a que puede generar la acidificación del medio [63]. Adicionalmente, la fase estacionaria se caracteriza por el agotamiento de nutrientes y la disminución de espacio, lo que ocasiona que la multiplicación microbiana cese y su velocidad de crecimiento disminuya. A continuación, la Tabla 2.2 presenta un breve resumen del crecimiento celular en un sistema batch, mostrando el valor aproximado de la velocidad específica de crecimiento.

Tabla 2.2: Resumen del crecimiento celular en un cultivo discontinuo. Adaptada de [64]

Fase	Descripción	Velocidad específica de crecimiento
Adaptación	Las células se adaptan al nuevo ambiente. No existe o existe muy poco crecimiento	$u \approx 0$ $t = 0 - 20$ h
Crecimiento exponencial	El crecimiento alcanza su máxima velocidad	$u = u_{\max}$ $t = 20 - 80$ h
Estacionaria	Cesa el crecimiento	$u = 0$ $t = 80 - 120$ h
Muerte	Las células pierden su viabilidad y se rompen	$u < 0$ t no es considerado

2.2.3. Modelamiento matemático para el crecimiento microbiano

Es importante señalar que se tendrán en cuenta las fases del crecimiento exponencial y estacionaria, ya que la fase de adaptación resulta ser muy pequeña y la fase de muerte no es

considerada. Dicho esto, la velocidad de crecimiento celular se describe mediante la siguiente ecuación [64].

$$r X = \mu X \quad (1)$$

Donde, rX es la velocidad volumétrica de producción de biomasa (kg/m³.s), X es la concentración de células (kg/m³) y μ es la velocidad específica de crecimiento (s⁻¹). En tal sentido, la ecuación anteriormente modelada para un sistema cerrado, donde el único proceso que afecta a la concentración celular es el crecimiento, obedece la siguiente expresión:

$$r X = \frac{dX}{dt} \quad (2)$$

Integrando las ecuaciones 1 y 2 y se obtiene lo siguiente:

$$\mu X = \frac{dX}{dt} \quad (3)$$

Ahora, la velocidad específica de crecimiento, también depende de la concentración del sustrato dentro del biorreactor. Esta relación es expresada mediante la ecuación de Monod [64].

$$\mu = \frac{\mu_{max} \times S}{K_s + S} \quad (4)$$

Donde, S es la concentración del sustrato, μ_{max} es la velocidad específica máxima de crecimiento y K_s es la constante del sustrato. De esta forma, teniendo los datos de dichos parámetros se genera la curva mostrada en la figura 2.2.

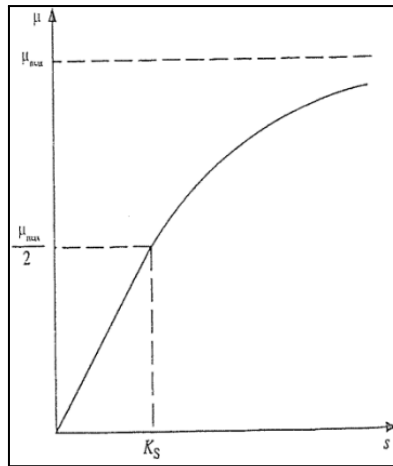


Figura 2.2. Gráfica de velocidad específica de crecimiento vs concentración de sustrato. [64]

Por otra parte, dentro de la estequiometría de las reacciones biológicas se encuentran los rendimientos de la biomasa con respecto al sustrato, del producto con respecto al sustrato y a la biomasa, y del subproducto principal (ácido propiónico) con respecto al sustrato y a la biomasa. Datos que se obtienen a partir de las expresiones planteadas a continuación [65].

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (5)$$

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} \quad (6)$$

$$Y_{P/X} = \frac{\Delta P}{\Delta X} \quad (7)$$

$$Y_{AP/S} = \frac{\Delta AP}{\Delta S} \quad (8)$$

$$Y_{AP/X} = \frac{\Delta AP}{\Delta X} \quad (9)$$

Una vez determinadas las expresiones de rendimiento, se plantea la ecuación que describe la variación del sustrato con respecto al tiempo de fermentación, empleando las ecuaciones 3 y 5.

$$\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{X/S}} \times \frac{dX}{dt} \quad (10)$$

Finalmente, como última expresión a considerar, es la ecuación que describe la formación del producto a lo largo del tiempo de fermentación. En tal sentido, es necesario considerar que

los productos microbianos se pueden clasificar en tres categorías principales, tal como se aprecia en la figura 2.3: los productos que se producen simultáneamente con el crecimiento microbiano, los productos que tienen lugar durante la fase estacionaria y los productos que se desarrollan durante la fase de crecimiento [65].

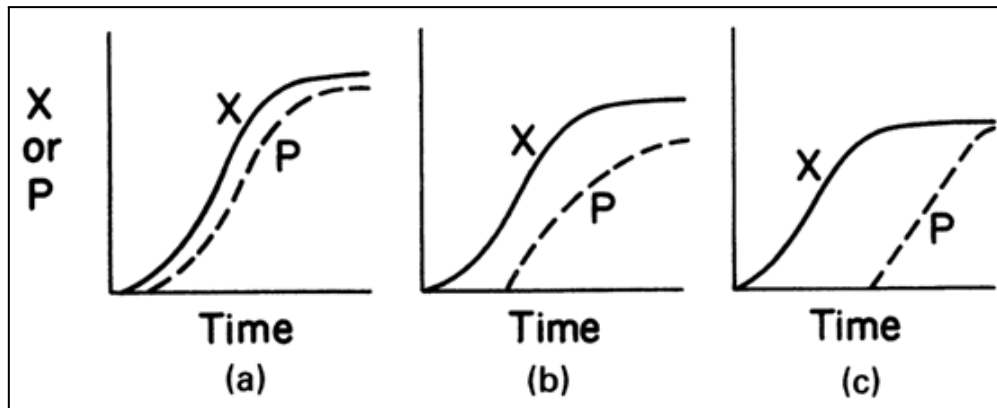


Figura 2.3. Patrones cinéticos de crecimiento y formación de productos en fermentaciones discontinuas: (a) formación de productos asociados al crecimiento, (b) formación de productos asociados al crecimiento mixto y (c) formación de productos no asociados al crecimiento. [65]

Así pues, se sabe que la vitamina b12 se forma durante el crecimiento celular, lo cual se conoce como crecimiento mixto. Por lo tanto, la tasa específica de formación del producto viene dada por la ecuación de Luedeking-Piret (Ec. 11).

$$q_p = \alpha\mu_g + \beta \quad (11)$$

Donde, q_p es la velocidad específica de producción del metabolito (vitamina b12), α y β son constantes halladas a partir de la gráfica de μ_g versus q_p , y μ_g es la tasa específica de formación del producto.

2.3. Materias primas para la síntesis de vitamina b12

Con respecto a las materias primas que componen el medio de cultivo para la síntesis de vitamina b12, la tabla 2.3 detalla cada una de ellas junto con su respectiva función durante la fermentación.

Tabla 2.3: Descripción de las materias primas que componen el medio de cultivo.

Materia prima	Función en la fermentación	Formulación o composición	Referencia
Glucosa	Fuente de carbono en la síntesis de vitamina b12, sirviendo como alimento para las bacterias.	$C_6H_{12}O_6$	[66]
Licor de maceración de maíz (CSL)	Fuente de nutrientes relativamente económicos para formar el medio de cultivo, forma parte de la solución fosfatada.	50% de agua 50% de sólidos: proteínas solubles, nitrógeno proteico, aminoácidos libres, carbohidratos, minerales, ácidos orgánicos y azúcares reductores.	[63] [28]
Sulfato de amonio	Fuente de nitrógeno para las bacterias.	$(NH_4)_2SO_4$	[68]
Dihidrógeno fosfato de potasio	Buen regulador de la acidez (sustancia buffer) y un perfecto agente quelante.	KH_2PO_4	[69]
Cloruro de cobalto	Sustancia que cede un ión cobalto necesario para la producción de la cobalamina.	$CoCl_2$	[28]

Precursor vitamínico 5, 6 dimetilbenzimidazol (DMBI)	Promueve la formación de vitamina b12, uniéndose a la cobinamida y dando como resultado la cobalamina.	$C_9H_{10}N_2$	[29]
---	--	----------------	------

2.4. Fermentación

A lo largo de la historia, la fermentación ha sido un método de preservación de alimentos. En la actualidad, diariamente seguimos consumiendo alimentos provenientes de esta técnica que está encontrando nuevos campos como el de los biocombustibles.

Este es un proceso metabólico donde los microorganismos transforman carbohidratos como azúcares para generar nuevos productos con energía en presencia o ausencia de oxígeno, conocidos como fermentación aeróbica y anaeróbica [70]. Este proceso bioquímico es comúnmente utilizado en industrias como la alimentaria para la producción de quesos, yogures y bebidas alcohólicas como cerveza y vino. Otro uso común, es en la farmacéutica para la producción de antibióticos, proteínas, vitaminas y vacunas.

En esta investigación, se tienen dos etapas previas de pre fermentación para dar pie al corazón de la producción de la vitamina b12 que desarrolla una fermentación en ausencia de aire tal como se discutió en la sección de revisión crítica, utilizando el microorganismo *Propionibacterium Freudenreichii* que es apto para consumo humano con un adecuado rendimiento, empleando como carbohidrato la glucosa en el medio de cultivo para su desarrollo microbiano, que tras la fermentación se obtiene el producto intracelular, es decir dentro de la bacteria empleada dando fin así a la etapa de fermentación.

2.5. Etapas importantes posteriores a la fermentación

2.5.1. Adsorción

La operación de adsorción en lecho fijo es una de las más usadas a escala industrial para el trabajo con material biológico. Aquí, el transporte de las especies desde la fase móvil a la fase estacionaria, tiene lugar a través de una capa de transferencia de masa en la superficie de la partícula, de manera que los solutos se difunden a través de los poros hasta un sitio de unión [35].

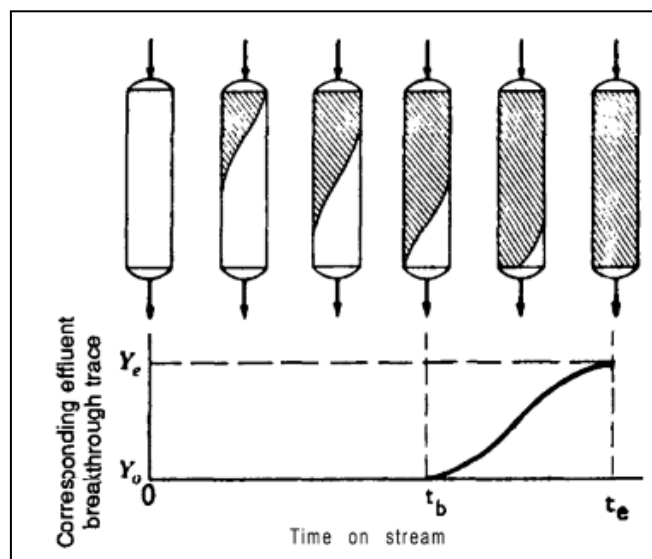


Figura 2.4. Progreso de un frente de transferencia de masa estable a través de un lecho de adsorción y de la concentración del efluente [71]

Para el diseño de este equipo, se formulan las relaciones de equilibrio, la capacidad de adsorción del sólido, la rapidez de adsorción, y las condiciones iniciales y de frontera del sistema. En tal sentido, por medio de modelos se podrá estimar la concentración de soluto al final de la adsorción, el tiempo del proceso, la cantidad de adsorbente y la longitud de la columna.

Teniendo en cuenta la bibliografía revisada, el método que más se ajusta a esta operación es la Teoría Cinética, que consiste en la adsorción isotérmica de un soluto que fluye a través de un lecho fijo empacado con partículas difusoras. Asimismo, si se considera que todos los

mecanismos controlantes de la adsorción son significativos (película, poro, cinética) y que la isoterma describe el modelo de tipo Langmuir, se utilizará el modelo de las tres resistencias para el desarrollo del balance de masa, energía y dimensionamiento del equipo [72].

2.5.2. Cristalizador - Evaporador

Esta unidad separa el soluto de una solución formando cristales de cristales con un alto grado de pureza, para esto se forman pequeños cristales (nucleación) que posteriormente crecen ambos regidos por la sobresaturación como fuerza impulsora [72]. Esta saturación se puede dar por: enfriamiento, enfriamiento evaporativo, evaporación térmica, o evaporación térmica al vacío, siendo esta última la utilizada en este proceso donde se transfiere calor al sistema para evaporar el solvente (metanol) y generar la formación de cristales con una presión de 0.15 atm [53].

El diseño requiere de una determinación de las condiciones apropiadas de cristalización, estos datos son experimentación empírica, pues los diagramas de fase y la cinética para sistemas específicos no suele estar disponible [65]. La elección del cristalizador se centra en su volumen, pues para volúmenes pequeños se utilizan cristalizadores lotes y para volúmenes superiores a las 50 ton/día cristalizadores continuos, el ciclo de cristalización de estos equipos dura entre 2 y 8 horas [72].

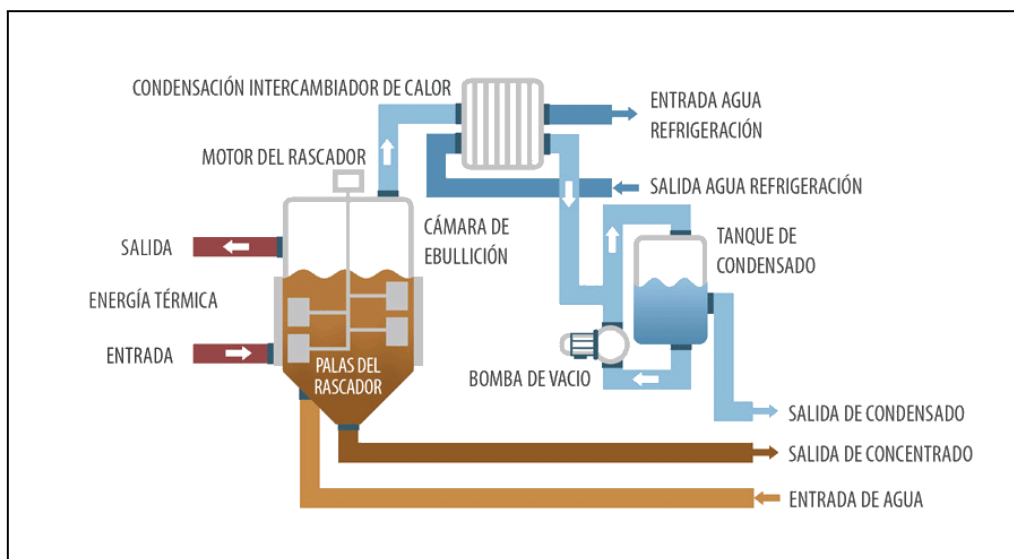


Figura 2.5. Sistema de cristalización. [73]

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Este capítulo presenta las estrategias y procedimientos a seguir para el correcto desarrollo del trabajo. En la Figura 3.1 se ilustra la disposición general del desarrollo del proyecto mediante un diagrama de flujo.

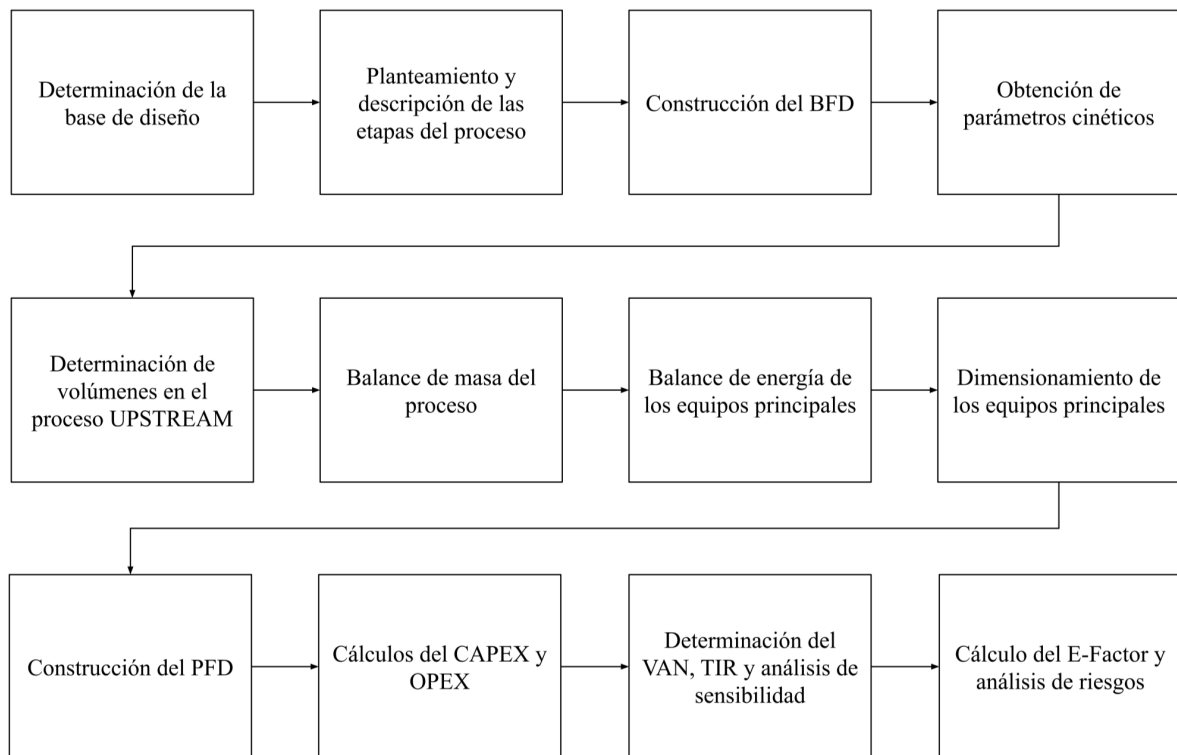


Figura 3.1. Diagrama de flujo de la metodología del trabajo de investigación.

3.1. Determinación de la base de diseño

La capacidad productiva del proceso se determina en base a la demanda de vitamina b12 en el Perú referenciados en datos estadísticos de las importaciones de esta vitamina (14 942 kg en el año 2021) [74]. En tal sentido, como se menciona en el marco referencial, existen dos principales industrias consumidoras de esta sustancia, la veterinaria como aditivo alimentario y la del consumo humano en industrias farmacéuticas, cosméticas y alimenticias. Así pues,

teniendo como referencia el mercado de esta vitamina en Argentina [28], se toma como aproximación un tercio de la importación total y dicho valor se asigna para consumo humano, dando un total de 4980.67 kg al año. Sin embargo, para la presente investigación se tomó el 1.5 %, dado que con este valor se obtiene un volumen del biorreactor de $33 m^3$, un valor grande de abarcar. Por lo tanto, si se deseara cubrir una mayor demanda requería de un área más extensa y una mayor inversión por la exigencia de un bioreactor más grande u otro que trabaje en paralelo. Asimismo, dado a que no se cuenta con data propia experimental o simulada no se puede optimizar este valor. En síntesis, la cantidad de vitamina b12 mencionada es para un análisis más manejable y detallado de manera práctica, dado que este estudio es un inicio para futuras investigaciones. De igual forma, esta cantidad se ajusta a nuestro proceso de fermentación, ya que de aumentar la producción se necesitaría reevaluar la viabilidad económica de instalar más biorreactores y tanques de fermentación, lo cual vendría a ser una propuesta para futuros trabajos de investigación.

3.2. Planteamiento y descripción de las etapas del proceso

Para producir vitamina b12 con alta pureza, se han de seguir una serie de etapas. En tal sentido, el proceso comienza con una reacción biológica, para la cual se debe prever el medio y el alimento necesario para que las bacterias desarrollen su función adecuadamente y se encuentren en óptimas condiciones para ser usadas. Finalmente, cuando el proceso de fermentación haya cesado, será necesario separar el producto del resto de compuestos encontrados al final de las reacciones. Para esto, es importante desarrollar una serie de operaciones de separación, concentración y purificación de manera que el producto se obtenga a las condiciones deseadas (pureza 96%, estado sólido seco y libre de contaminantes) [21]. A continuación, de acuerdo con la bibliografía revisada, se describen las etapas del proceso.

3.2.1. Preparación del medio de cultivo y el inóculo

El proceso para la producción de vitamina b12, inicia con la preparación del inóculo, en donde la cepa liofilizada *Propionibacterium freudenreichii* CICC10019 pasa por una serie de

reactores de siembra para adaptar, preparar y disponer a los microorganismos para la fermentación. Estos equipos irán incrementando su volumen de manera que la cepa crezca y alcance la concentración celular necesaria para ingresar al biorreactor principal. Asimismo, es importante tener el control de algunos parámetros, tales como: temperatura, pH, coeficientes de transferencia de materia, tiempo de mezcla, agitación y muchas otras, para evitar el deterioro o daño de los microorganismos. Una vez terminado el proceso en los prefermentadores, el caldo gastado, la biomasa y los subproductos formados (ácido propiónico, acético y succínico) son trasladados al biorreactor, en donde se llevará a cabo la formación de la vitamina b12.

Antes de finalizar el proceso en el segundo prefermentador, se lleva a cabo la preparación del medio de cultivo para el biorreactor, el cual inicia con la preparación de la solución de glucosa, compuesta por glucosa monohidratada y el agua desionizada, y la solución fosfatada, compuesta por el licor de maceración de maíz, el fosfato monopotásico, cloruro de cobalto, nitrato de amonio y agua desionizada [21]. Dichas soluciones son llevadas a esterilizadores, en donde por medio de un aumento de la temperatura (desde la temperatura ambiente hasta aproximadamente los 115 °C) junto con un incremento de la presión (de 1 atm a 3 atm) [34], será posible su esterilización. Finalmente, se reduce la temperatura y la presión de ambas soluciones, de manera que estén aptas para ingresar en el fermentador principal [14].

3.2.2. Producción de vitamina b12 por fermentación anaerobia

Esta etapa se lleva a cabo por vía anaerobia en un reactor discontinuo de tanque agitado con chaqueta durante un total de 120 h [31]. El cultivo se inocula en el medio de fermentación a 30°C [38]. Conforme el proceso de fermentación se va efectuando, comienzan a formarse subproductos (ácido propiónico, ácido acético y ácido succínico) que generan un medio acidificado. Para evitar esto, se cuenta con nitrato de amonio (NH_4NO_3) de modo que neutralice el medio de cultivo. Asimismo, a las 48 h de fermentación se adiciona el precursor vitamínico 5,6-dimetil-benzimidazol (DMBI) para mejorar la producción de la vitamina [75]; de manera que, al finalizar el proceso de fermentación se obtenga una gran concentración de vitamina b12 dentro de las células microbianas.

3.2.3. Operaciones de separación

- Centrifugación 1

Una vez finalizado el proceso de fermentación, el caldo gastado, la biomasa y los subproductos formados son trasladados a la primera operación de separación, la centrifugación [44]. Dicha operación permitirá separar el medio líquido (caldo y subproductos) del sólido (biomasa), de manera que se pueda recuperar la mayor parte de la biomasa libre de caldo para luego enviarla a la etapa de lisis celular [14].

- Molienda

La biomasa microbiana es transportada a un molino de bolas, en donde se produce la ruptura celular con el objetivo de romper las paredes y membranas celulares, para así liberar el material citoplasmático celular donde se encuentra la vitamina b12 [28]. Dado que en la operación se manejan velocidades elevadas, el número de colisiones entre perlas aumenta y la temperatura en el interior se incrementa. Es por ello, que el molino ha de contar con una camisa de enfriamiento, la cual genera que el medio en el interior de la cámara salga a la misma temperatura de ingreso [76].

- Centrifugación 2

Una vez finalizada la lisis celular, la biomasa es transportada hacia una segunda centrifugación para separar el líquido citoplasmático, el material genético y la propia vitamina b12 del residuo sólido conformado por las paredes y membranas celulares [77]. Así pues, una vez finalizada la operación, el sobrenadante es desechado mientras que el líquido alcanzado es enviado a la columna de adsorción.

3.2.4. Operaciones de purificación

- Adsorción/ Desorción

Esta operación consta de dos sub etapas intercaladas: la adsorción y desorción a 30 °C y pH 5 [28]. Durante la adsorción, la parte acuosa de la segunda ultrafiltración, aún con restos del medio de cultivo, y trazas de paredes y membranas celulares, ingresa a la columna de lecho fijo empaquetada con la resina Duolite S861 compuesta por partículas de 0.4 mm de diámetro y porosidad intraparticular de 0.4 hasta saturarse [14]. En esta torre únicamente se adsorbe la vitamina b12 prácticamente en su totalidad y sale el medio intracelular residual [55]. Una vez finalizada esta sub etapa, comienza la operación de desorción, para la cual ingresa a la torre una solución de metanol al 40% que permite recuperar la vitamina absorbida [45].

- Cristalización

En cuanto al sistema de cristalización, este se encuentra compuesto por un tanque en donde se lleva a cabo la operación, un condensador para que el vapor generado en la operación cambie de fase a líquido y un tanque de almacenamiento en donde se conservará la solución de metanol en estado líquido.

En tal sentido, la operación comienza con la llegada de la solución de metanol con vitamina b12 al tanque de cristalización. Aquí, la solución es llevada a una temperatura de 49°C y una presión de 0.15 atm para efectuar la cristalización [45]. En esta etapa la separación se da teniendo en cuenta que por cada 100 kg de vitamina b12 hay 2 kg de impurezas y que a su vez un kilogramo de esta impureza está compuesto por 0.129 kg de metanol y 0.875 kg de agua [38].

Esta operación logra retirar un gran porcentaje de la solución de metanol en forma de vapor, el cual es dirigido al condensador para obtener una solución en estado líquido y a una temperatura de 30 °C. Luego, dicho líquido es depositado en un tanque de almacenamiento, para que al finalizar toda la operación, el sistema sea despresurizado y retorne a la presión atmosférica. Finalmente, la solución de metanol ubicada en el tanque de almacenamiento es recirculada a la columna de adsorción para desorber el siguiente lote de vitamina b12;

mientras que, los cristales de esta vitamina junto con la solución de metanol que no llegó a evaporar, fueron dirigidos al secador por atomización [14].

- Secado por atomización

La solución de metanol junto con los cristales de vitamina b12 llegan al secador, para ser separados prácticamente por completo. La solución de metanol encontrada en el aire en fase gaseosa, se condensa para ser reutilizada en la etapa de desorción del siguiente lote de vitamina b12; mientras que, la vitamina seca pasa a ser almacenada para su posterior distribución. Para este equipo es necesario el uso de aire caliente, el cual ingresa con una temperatura de 140 °C y sale a 85°C aproximadamente. El tiempo de esta operación por lo general tarda unas 5 horas y se obtiene la vitamina b12 en forma de polvo, para luego proceder a su etapa de empacado [77].

3.3. Construcción del diagrama de bloques (BFD)

Con respecto al diagrama de bloques del proceso, este se divide en 4 etapas: preparación del medio de cultivo y el inóculo, fermentación, separación y purificación; las cuales son detalladas en la figura 3.2.

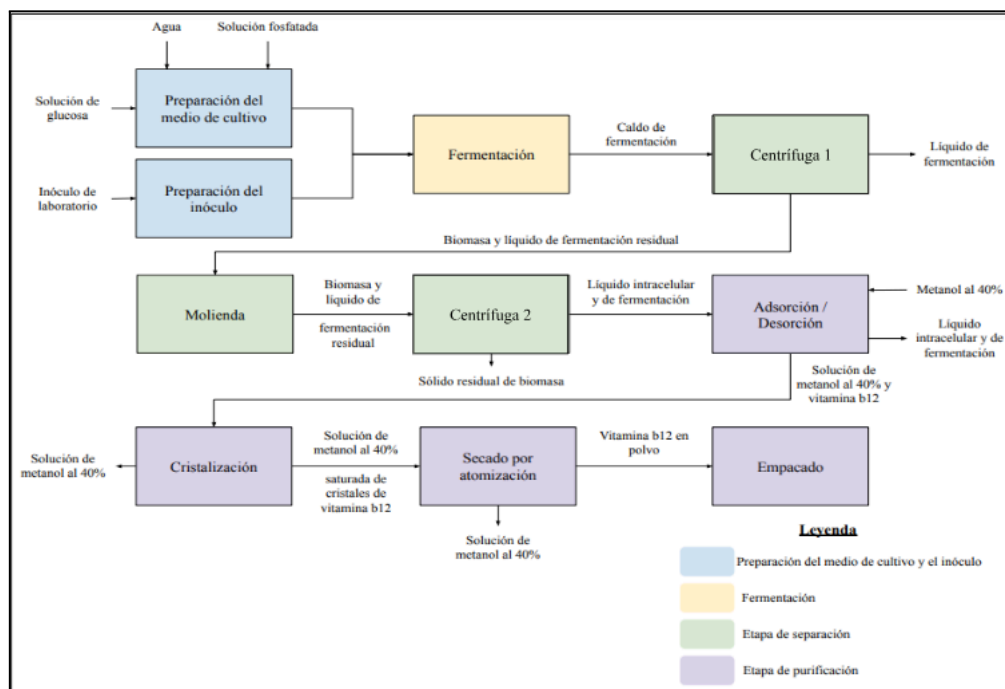


Figura 3.2. Diagrama de bloques preliminar del proceso.

3.4. Obtención de parámetros cinéticos

El modelo matemático empleado para el proceso de producción de vitamina b12 es el modelo de Monod. Partiendo de las ecuaciones de dicho modelo y de datos bibliográficos, se podrán hallar los parámetros cinéticos como las concentraciones iniciales y finales de productos y reactivos, la velocidad específica de crecimiento, los rendimientos de la fermentación, entre otros.

Dado que el microorganismo, el sustrato, el medio de cultivo y las condiciones de fermentación del estudio de Wang, Jiao y Liu (2014) [31] son las mismas que el presente informe, se tomarán los datos brindados por esta investigación para el desarrollo de este inciso. Es así como el Anexo 3 muestra los datos de la cinética de fermentación por lotes de *P. freudenreichii* [31], en donde se evidencia que la fase de crecimiento empieza a las 20 horas y finaliza a las 80 horas. En tal sentido, considerando la Ec. 12, se halla el valor de la velocidad de crecimiento celular.

$$\begin{aligned}\mu X &= \frac{dX}{dt} & (12) \\ \mu &= \frac{\ln(X) - \ln(X_0)}{t - t_0} \\ \mu &= \frac{\ln(6.9) - \ln(0.6)}{80 - 20} \\ \mu &= 0.0407 \text{ (h}^{-1}\text{)}\end{aligned}$$

Finalmente, los rendimientos de la biomasa con respecto al sustrato, del producto con respecto al sustrato y a la biomasa, y del subproducto principal (ácido propiónico) con respecto a la biomasa y al sustrato, se hallan siguiendo las Ec. 5, 6, 7, 8 y 9, y los resultados son registrados en la tabla 3.1.

Tabla 3.1: Rendimientos de la fermentación por lotes de *P. freudenreichii*. Adaptada de [31]

Rendimientos	Valor
$Y_{x/s}$ (g/g)	0.123
$Y_{b12/x}$ (mg/g)	0.708
$Y_{b12/s}$ (mg/g)	5.644

$Y_{AP/x}$ (g/g)	0.502
$Y_{AP/s}$ (g/g)	3.997

3.5. Determinación de volúmenes en el proceso UPSTREAM

Para determinar el volumen del biorreactor principal, será importante considerar la demanda anual, los parámetros cinéticos del modelo de crecimiento microbiano y el tiempo de fermentación de un lote. En tal sentido, la Ec. 13, obtenida del estudio de Soares, Henares y Roncador (2019), permitirá hallar el volumen de este equipo [38]:

$$V_{\text{biorreactor}} [\text{m}^3/\text{ciclo}] = \frac{\text{Demanda a cubrir al año [kg vitamina b12/año]} \times \text{Tiempo de fermentación de un lote [h/lote]}}{\text{Concentración de vitamina b12 [mg vitamina b12/L]}}$$

(13)

Luego, se procederá a calcular los volúmenes de los prefermentadores, partiendo del cálculo anterior junto con el valor de la concentración de la biomasa al inicio de la fermentación y la concentración al término de la etapa exponencial (Anexo 3), la cual es la misma en cada equipo del tren de siembra.

3.6. Construcción del PFD

Para construir el PFD será necesario considerar todo el proceso: la etapa upstream (preparación y del medio de cultivo y el inóculo, y la fermentación anaeróbica) y la etapa downstream (ultrafiltros, molienda, adsorción/desorción, cristalización y secado por atomización). Por último, se emplearán equipos auxiliares teniendo en cuenta los puntos de mezcla y bifurcación, y las variaciones de presión y temperatura.

3.7. Balance de materia del proceso

Para realizar el balance de masa de los equipos correspondientes al proceso, se comenzará planteando la Ec. 14, la cual será modificada de acuerdo a las consideraciones de cada equipo [65]:

$$F_{io} - F_i + G_i = \frac{dN_i}{dt} \quad (14)$$

Donde:

F_{io} : flujo molar inicial del componente i

F_i : flujo molar final del componente i

G_i : radio de generación de la reacción

$\frac{dN_i}{dt}$: radio de la acumulación del componente i del sistema

En tal sentido, primero nos enfocaremos en el balance de masa del biorreactor y los prefermentadores. Para esto, será importante tener en cuenta la composición de las corrientes de entrada, las cuales son obtenidas del estudio realizado por Wang, Xu, Du, Zhang, Wang y Su (2020) [13], las consideraciones para el desarrollo del proceso y la estequiometría de la reacción biológica; para luego, definir la composición de las corrientes de salida y la cantidad de producto obtenido.

Con respecto al balance de masa del resto de equipos (intercambiadores de calor, ultrafiltros, molino, adsorbedor, cristizador, secador, entre otros), se seguirá la secuencia de pasos detallados en la figura 3.3.

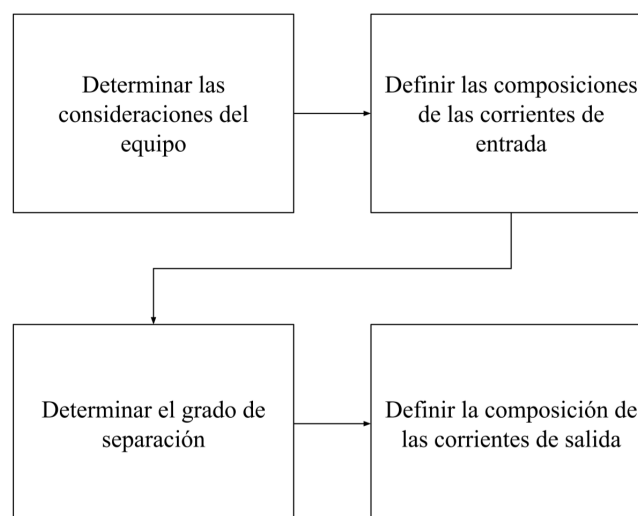


Figura 3.3. Diagrama de flujo para el desarrollo del balance de masas en cada equipo.

3.8. Balance de energía de los equipos principales

Dentro del proceso, existen ciertas operaciones que requieren alcanzar altas temperaturas, que por lo general se adquieren al trabajar con corrientes de fluido caliente o energía eléctrica para llevar a cabo este intercambio térmico. Asimismo, otros equipos necesitan de energía eléctrica para aumentar o disminuir la presión, o usarla en forma de potencia para funcionar un agitador. De igual forma, el balance energético sirve para controlar la temperatura de algunos fluidos (por medio de chaquetas de enfriamiento), de manera que el proceso no se vea afectado.

Por lo tanto, para realizar un adecuado balance de energía es necesario tener en claro las consideraciones de los equipos, los flujos energéticos de entrada y salida, las variaciones de la temperatura y el cuidado respectivo de las materias a trabajar para evitar cualquier degradación del producto. En tal sentido, la Ecuación 15, se toma como punto de partida para calcular el flujo de calor o el flujo de energía en forma de trabajo que ha de entrar o salir de los equipos principales del proceso.

$$\dot{Q} + \dot{W} + -\Delta(\dot{H} + E_p + E_k) = \Delta\dot{E} \quad (15)$$

Considerando que cada etapa trabaja en un estado estacionario y que las energías potenciales y cinéticas prácticamente no varían, se desprecian del balance de energía obteniendo la Ecuación 16:

$$\dot{Q} + \dot{W} = \Delta\dot{H} \quad (16)$$

Desarrollando la expresión anterior, se obtiene la Ecuación 17:

$$\sum_{i=1}^n m_{i\text{ entrada}} H_{i\text{ entrada}} - \sum_{i=1}^n m_{i\text{ salida}} H_{i\text{ salida}} = Q - W \quad (17)$$

Donde, la entalpía (H) se expresa en la Ecuación 18:

$$H = \int_{T_1}^{T_2} C_p dT \quad (18)$$

Ahora, cuando no existe trabajo ni cambio en el estado físico, tal como ocurre en los intercambiadores de calor, la Ecuación 17 se plantea como la Ecuación 19.

$$Q = UA (\Delta TML) = m C_p (\Delta T) \quad (19)$$

Por el contrario, si existe un trabajo pero no hay energía en forma de calor que ingrese o salga del sistema, se toma la Ecuación 20:

$$\sum_{i=1}^n m_{i\text{ entrada}} H_{i\text{ entrada}} - \sum_{i=1}^n m_{i\text{ salida}} H_{i\text{ salida}} = -W \quad (20)$$

3.9. Dimensionamiento de los equipos principales

3.9.1. Biorreactor y prefermentadores

Para iniciar el dimensionamiento de estos equipos, se ha de tener en cuenta que tanto el biorreactor como los prefermentadores poseen agitación y están cubiertos por una chaqueta para controlar la temperatura del cultivo. En tal sentido, considerando el volumen de estos equipos y otros parámetros más obtenidos de bibliografía, se procederá a hallar la geometría de los equipos y agitadores y el área de la chaqueta de enfriamiento. Es así como, la Tabla 3.2 sintetiza los parámetros necesarios para efectuar el dimensionamiento de estos equipos.

Tabla 3.2: Parámetros necesarios para el dimensionamiento de los prefermentadores y el biorreactor.

	Parámetro	Definición
Calculados	Q	Calor total a disipar en la fermentación

	V	Volumen de fermentación
	U_d	Coefficiente de transferencia de calor
	$T_{agua e}$	Temperatura de agua de enfriamiento a la entrada
Bibliografía	$T_{agua s}$	Temperatura de agua de enfriamiento a la salida
	$T_{caldo i}$	Temperatura del caldo al inicio del proceso
	$T_{caldo f}$	Temperatura del caldo al final del proceso
	$N_{deflectores}$	Número de deflectores
	At	Área de transferencia de calor de la chaqueta
	ΔTML	Delta de temperatura media logarítmica
	V	Volumen del equipo
	D_T	Diámetro del equipo
A calcular	A_T	Área del equipo
	H	Altura del equipo
	D_i	Diámetro del agitador
	WB	Ancho de la paleta
	LB	Longitud de la paleta
	HL	Altura del líquido
	Ci	Distancia entre la base y el agitador
	WBF	Ancho de baffles

3.9.2. Intercambiadores de calor

Para los esterilizadores y equipos de enfriamiento, se consideró la geometría de un tanque de almacenamiento con un serpentín en su interior por donde circulará el fluido caliente o el

fluido frío. Así pues, la tabla 3.3 muestra los parámetros necesarios para efectuar el dimensionamiento de estos equipos.

Tabla 3.3: Parámetros necesarios para el dimensionamiento de los intercambiadores de calor.

	Parámetro	Definición
Calculados	Q	Calor total de calentamiento o enfriamiento
	V	Volumen de la solución a calentar o enfriar
Bibliografía	U_d	Coefficiente de transferencia de calor
	$T_{agua e}$	Temperatura de agua de enfriamiento o calentamiento a la entrada
	$T_{agua s}$	Temperatura de agua de enfriamiento o calentamiento a la salida
	$T_{sol i}$	Temperatura de la solución al inicio de la operación
	$T_{sol f}$	Temperatura de la solución al final de la operación
A calcular	At	Área de transferencia de calor
	ΔTML	Delta de temperatura media logarítmica
	V	Volumen del equipo
	D_T	Diámetro del equipo
	A_T	Área del equipo
	H	Altura del equipo
	V_{fluido}	Volumen del agua de enfriamiento o calentamiento
	L	Longitud del serpentín
	D	Diámetro del serpentín

3.9.3. Molino de bolas

Para dimensionar el molino de bolas se hará uso de catálogos que manejen un volumen de trabajo igual al presentado en este informe. Así pues, en la tabla 3.4 se exponen los parámetros necesarios para determinar el modelo de molino y sus especificaciones brindadas por catálogo.

Tabla 3.4: Parámetros necesarios para el dimensionamiento del molino de bolas.

	Parámetro	Definición
Calculados	F_{caldo}	Flujo de caldo de fermentación
	V	Volumen del molino
Bibliografía	$F_{agua\ enf}$	Flujo de agua de enfriamiento
	P	Potencia del molino
	D_{perlas}	Diámetro de perlas
	v	Velocidad de punta
	C	Carga de volumen de perlar

3.9.4. Columnas de adsorción

Con respecto al dimensionamiento de las columnas de adsorción, se seguirá el método de LUB, el cual será detallado en la sección de resultados. En tal sentido, la tabla 3.5 evidencia los parámetros calculados, sacados de bibliografía y los hallados para el dimensionamiento de la columna.

Tabla 3.5: Parámetros necesarios para el dimensionamiento de los intercambiadores de calor.

	Parámetro	Definición
Calculados	m_{b12}	Masa de vitamina b12 en el fluido de salida del ultrafiltro 2
	m_T	Masa del fluido de salida del ultrafiltro 2

	ρ_T	Densidad del fluido de salida del ultrafiltro 2
	F_{esc}	Flujo del fluido de salida del ultrafiltro 2
	t_{rupt}	Tiempo de ruptura
	F_{lab}	Flujo de fluido a escala laboratorio
	$C_{o lab}$	Concentración de vitamina b12 en el fluido de entrada a escala laboratorio
Bibliografía	t_{ideal}	Tiempo ideal a escala laboratorio
	$V_{s lab}$	Volumen de absorbedor a escala laboratorio
	ρ	Densidad del líquido
	$m_{s lab}$	Masa de resina a escala laboratorio
	A_{esc}	Área de la columna
	H_{lab}	Altura de la columna de laboratorio
	A_{lab}	Área de columna de laboratorio
	U_{lab}	Velocidad de fluido que ingresa a la columna de laboratorio
	C_o	Concentración de vitamina b12 en el fluido de entrada
	$m_{A ideal}$	Masa acumulada ideal
	$q_{A max}$	Cantidad de soluto adsorbida
A calcular	$m_{S esc}$	Masa de resina a escala industrial
	LES_{esc}	Longitud de columna utilizada
	U_{esc}	Velocidad de fluido que ingresa a la columna
	LES_{lab}	Longitud de columna utilizada a escala laboratorio
	LUB_{lab}	Longitud de columna no utilizada a escala

	laboratorio
LUB_{esc}	Longitud de columna no utilizada
H_{esc}	Altura de la columna

3.9.5. Cristalizador

Para el dimensionamiento del cristalizador se considera el volumen del mismo, En tal sentido, la Tabla 3.6 muestra los parámetros necesarios para realizar el dimensionamiento del cristalizador.

Tabla 3.6: Parámetros necesarios para el dimensionamiento del cristalizador.

	Parámetro	Definición
Calculados	V	Volumen del cristalizador
Bibliografía	P_a	Presión al vacío
	V	Potencia Del agitador
A calcular	D_T	Diámetro del cristalizador
	H_L	Altura del cristalizador

3.9.6. Secado por atomización

Para dimensionar el secador se partió de los datos de la potencia requerida para calentar el aire y el flujo de evaporación del agua. Asimismo, se tomaron en cuenta los parámetros obtenidos de catálogo y algunos datos calculados. En tal sentido, la tabla 3.7 evidencia los parámetros necesarios para este dimensionamiento.

Tabla 3.7: Parámetros necesarios para el dimensionamiento de los intercambiadores de calor.

	Parámetro	Definición
Calculados	Q	Calor total de calentamiento o enfriamiento
	U_d	Coefficiente de transferencia de calor
	$T_{air e}$	Temperatura de aire a la entrada
Bibliografía	$T_{air s}$	Temperatura de aire a la salida
	$T_{sol e}$	Temperatura de la solución a la entrada
	$T_{sol s}$	Temperatura de la solución a la salida
	v	Velocidad del atomizador
	D	Diámetro del disco atomizador
	H	Altura del cuerpo del secador
	H_{atom}	Altura de elevación del atomizador
	A_t	Área de transferencia de calor
A calcular	ΔTML	Delta de temperatura media logarítmica

3.9.7. Equipos de mezcla

En cuanto a los equipos de mezcla, se consideró la geometría de un tanque de almacenamiento con un agitador en su interior para homogeneizar las soluciones. Así pues, la tabla 3.8 muestra los parámetros necesarios para efectuar el dimensionamiento de estos equipos.

Tabla 3.8: Parámetros necesarios para el dimensionamiento de los equipos de mezcla.

	Parámetro	Definición
Calculados	V	Volumen de la solución
	V	Volumen del equipo

	D_T	Diámetro del equipo
	A_T	Área del equipo
	H	Altura del equipo
A calcular	D_i	Diámetro del agitador
	WB	Ancho de la paleta
	LB	Longitud de la paleta
	HL	Altura del líquido
	Ci	Distancia entre la base y el agitador
	n	Número de deflectores
	WBF	Ancho de baffles

3.9.8. Tanques de almacenamiento

Para la dimensión de los tanques de almacenamiento, será necesario hallar el volumen, diámetro, área y altura del equipo. En tal sentido, la tabla 3.9 contempla los parámetros necesarios para el dimensionamiento.

Tabla 3.9: Parámetros necesarios para el dimensionamiento de los tanques de almacenamiento.

	Parámetro	Definición
Calculados	V	Volumen de solución de almacenamiento
	V	Volumen del equipo
A calcular	D_T	Diámetro del equipo
	A_T	Área del equipo
	H	Altura del equipo

3.10. Planificación del proceso (Scheduling)

Para realizar el scheduling del proceso se enumeró la secuencia de operaciones considerando los tiempos de carga, operación, descarga y limpieza de cada equipo. A partir de los balances de masa, energía y el dimensionamiento, se puede determinar el tiempo de operación de cada equipo y junto con un estimado del tiempo de descarga y limpieza se desarrolla la planificación del proceso.

3.11. Evaluación económica del proceso

3.11.1. CAPEX

Para desarrollar el cálculo del CAPEX, se considerarán los *Inside Battery Limits* (ISBL), los *Off Site Battery Limits* (OSBL), los costos de ingeniería y construcción, y los cargos de contingencia. Con respecto al ISBL, se tiene el costo de compra e instalación de los equipos, el cual se calcula por medio de correlaciones descritas en el Anexo 9 y empleando la ecuación 24 [78].

$$C_e = a + b S^n \quad (24)$$

Donde, C_e es el costo del equipo comprado en base a la Costa del Golfo de EE. UU, a y b son constantes de costo, S es el parámetro de tamaño y n es el exponente para cada tipo de equipo.

Luego, se hallan los costos por tuberías, montaje de equipos, instrumentación, trabajo civil, revestimientos, entre otros; y finalmente se calcula el costo total de los ISBL. Para esto se emplea la ecuación 25 [78].

$$C = \sum_{i=1}^{i=M} C_{e,i,CS} [(1 + f_p)f_m + (f_{er} + f_{el} + f_i + f_c + f_s + f_l)] \quad (25)$$

Donde, C es el costo total del ISBL, $C_{e,i,A}$ es el costo del equipo comprado del equipo i en aleación, M es el número total de equipos, f_p es el factor de instalación para tubería, f_{er} es el factor de instalación para montaje de equipos, f_{el} es el factor de instalación para obra eléctrica, f_i es el factor de instalación para instrumentación y control de procesos, f_c es el factor de instalación para obra civil, f_s es el factor de instalación para estructuras y edificios, f_l es el factor de instalación para revestimiento, aislamiento o pintura y el f_m es el factor de costo de materiales.

Por último, para determinar los OSBL, los costos de ingeniería y construcción, y los cargos de contingencia; y por medio de la ecuación 26 se calcula el costo total de capital fijo [78].

$$C_{FC} = C (1 + OS)(1 + D\&E + X) \quad (26)$$

Donde, C_{FC} es el costo total del capital fijo, OS es el costo total del OSBL, D&E es el costo de ingeniería y construcción y X es el costo por cargos de contingencia. Esto se realiza para finalmente hallar el capital de trabajo y el CAPEX.

3.11.2. OPEX

Los costos de operación serán determinados por medio del cálculo de los costos variables de producción (materias primas, utilidades, consumibles y efluentes) y los costos fijos (mano de obra, supervisión, mantenimiento, impuestos, renta de terrenos, etc). En tal sentido, los costos variables (Anexo 10) serán hallados partiendo de los balances de materia y energía del proceso; mientras que los costos fijos, serán calculados por medio de consideraciones preestablecidas en el Anexo 11 [80].

3.11.3. Flujo de caja

Con respecto al cálculo del flujo de caja, se consideraron los siguientes parámetros: el impuesto a la renta, el ratio de deuda, los costos fijos y variables provenientes del cálculo del OPEX, los ingresos por el precio de venta de la vitamina b12 y el costo total de capital fijo hallado para la determinación del CAPEX. Teniendo en cuenta esto, se logró hallar el costo

de producción en efectivo, la ganancia bruta, la depreciación, el ingreso imponible, los impuestos pagados y finalmente el flujo de caja.

3.11.4. Indicadores de rentabilidad

En cuanto a los índices de rentabilidad, Valor actual neto (VAN) y tasa interna de retorno (TIR), se emplea una hoja de cálculo en donde se construye un flujo de caja con proyección de 20 años desde el inicio de la inversión (Anexo 13). Asimismo, se toma que el valor de la tasa de descuento para este proyecto es 12% [78].

3.11.5. Análisis de sensibilidad

Para el desarrollo del análisis de sensibilidad, se consideró evaluar únicamente la variación del VAN con respecto al precio de venta de la vitamina b12, los gastos por materias primas y utilidades, y el ISBL y OSBL.

3.12. E-Factor

El indicador medioambiental E-Factor cuantifica la cantidad de residuos generados por un proceso, esta métrica promueve la reducción de estos residuos. Idealmente se desea que el valor sea lo más bajo posible pues indica que los residuos están siendo tratados. A continuación, la ecuación 27, permitirá hallar el valor del E-factor.

$$E - factor = \frac{\text{masa de residuos totales (kg)}}{\text{masa de producto (kg)}} \quad (27)$$

3.13. Análisis de seguridad

Por último, se realizó el análisis de seguridad de todo el proceso, evaluando el modo de falla de cada equipo, las causas y consecuencias de esta falla y el planteamiento de posibles soluciones ante tales problemáticas.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1. Determinación de volúmenes en el proceso UPSTREAM

El volumen del biorreactor principal se halló tomando en cuenta las siguientes consideraciones:

- Se tomará 1.5% del total de la demanda anual para el diseño del proceso.
- El tiempo de fermentación de un lote es de 144 h, siendo 120 h dedicadas a la fermentación y 24 h de limpieza y esterilización de los equipos [80].

En tal sentido, sabiendo el valor de la concentración final de vitamina b12 (42 mg/L) y con las consideraciones planteadas, se usó la Ec. 13 y se halló el volumen del biorreactor.

Donde:

- b12: Vitamina b12

$$V_{\text{biorreactor}} = \frac{1.5\% \text{ de la demanda a cubrir al año} \times \text{Tiempo de fermentación de un lote}}{\text{Concentración de vitamina b12}}$$
$$V_{\text{biorreactor}} = \frac{75.86 \text{ kg b12}}{1 \text{ año}} \times \frac{10^6 \text{ mg b12}}{1 \text{ kg b12}} \times \frac{1 \text{ L}}{42.5 \text{ mg b12}} \times \frac{1 \text{ m}^3}{1000 \text{ L}} \times \frac{1 \text{ año}}{365 \text{ días}} \times \frac{1 \text{ día}}{24 \text{ h}} \times \frac{144 \text{ h}}{1 \text{ ciclo}}$$
$$V_{\text{biorreactor}} = 31.969 \frac{\text{m}^3}{\text{ciclo}}$$

Posteriormente, se calcularon los volúmenes de los prefermentadores desde el más grande hasta el más pequeño, estableciendo, en primera instancia, el tiempo de fermentación en ellos. En tal sentido, dada la cinética de este proceso planteada en el Anexo 3, se tiene que la fase de crecimiento bacteriano acaba aproximadamente en el tiempo de 80 horas. Por lo tanto, dicho tiempo definirá la fermentación en cada prefermentador, debido a que la función de

estos equipos es permitir el crecimiento y la multiplicación de la biomasa. Asimismo, tomando como base el tiempo de limpieza y esterilización del fermentador y sabiendo que los equipos pertenecientes al tren de siembra poseen un volumen más pequeño, el tiempo establecido para estos equipos será de 16 horas [81]. Es así como el tiempo de fermentación de un lote para un prefermentador será de 96 horas.

Una vez establecido el tiempo, se procede a hallar el volumen de estos equipos partiendo del valor del volumen del biorreactor, y la concentración de la biomasa al inicio de la fermentación (X_o) y al término de la etapa exponencial (X_{ef}), 0.15 g/L y 6.9 g/L respectivamente. Para esto, se emplean las ecuaciones 28, 29, 30 y 31.

Equipo 2:

$$m_{f \text{ biomasa}_{\text{Equipo 2}}} = V_{\text{biorreactor}} \times X_o \quad (28)$$

$$m_{f 2} = 4795.35 \text{ g}$$

$$V_{\text{Equipo 2}} = \frac{m_{f \text{ biomasa}_{\text{Equipo 2}}}}{X_{ef}} \quad (29)$$

$$V_{\text{Equipo 2}} = 694.98 \text{ L}$$

Equipo 1:

$$m_{f \text{ biomasa}_{\text{Equipo 1}}} = V_{\text{Equipo 2}} \times X_o \quad (30)$$

$$m_{f \text{ biomasa}_{\text{Equipo 1}}} = 104.25 \text{ g}$$

$$V_{\text{Equipo 1}} = \frac{m_{f \text{ biomasa}_{\text{Equipo 1}}}}{X_{ef}} \quad (31)$$

$$V_{\text{Equipo 1}} = 15.11 \text{ L}$$

Dados los resultados, si se procediera a calcular un prefermentador más, el valor del volumen de este equipo sería 0.33 L, cantidad que se trabaja en el laboratorio. Por lo tanto, el proceso únicamente requerirá 2 prefermentadores.

Dicho esto, la figura 4.1 detalla el proceso descrito en forma de diagrama, de manera que se pueda apreciar con mayor claridad los cálculos realizados.

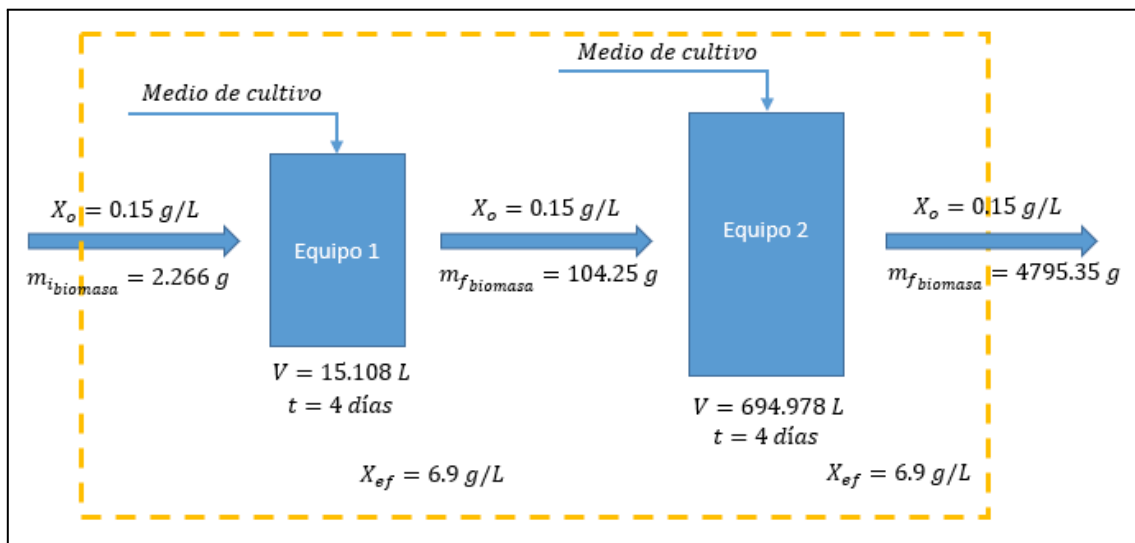


Figura 4.1. Determinación del volumen de los equipos pertenecientes al tren de siembra.

4.2. Construcción del PFD

En la presente sección, la figura 4.2 presenta el diagrama PFD para la producción de vitamina b12, el cual muestra el proceso a detalle. En tal sentido, a fin de apreciar cada etapa, la figura 4.3 muestra el proceso aguas arriba (upstream), en donde se prepara el medio de cultivo y el inóculo, y se lleva a cabo la fermentación; mientras que, las figuras 4.4 y 4.5 exhiben el proceso aguas abajo (downstream), en donde se visualizan las diferentes operaciones de separación y purificación para obtener la vitamina b12.

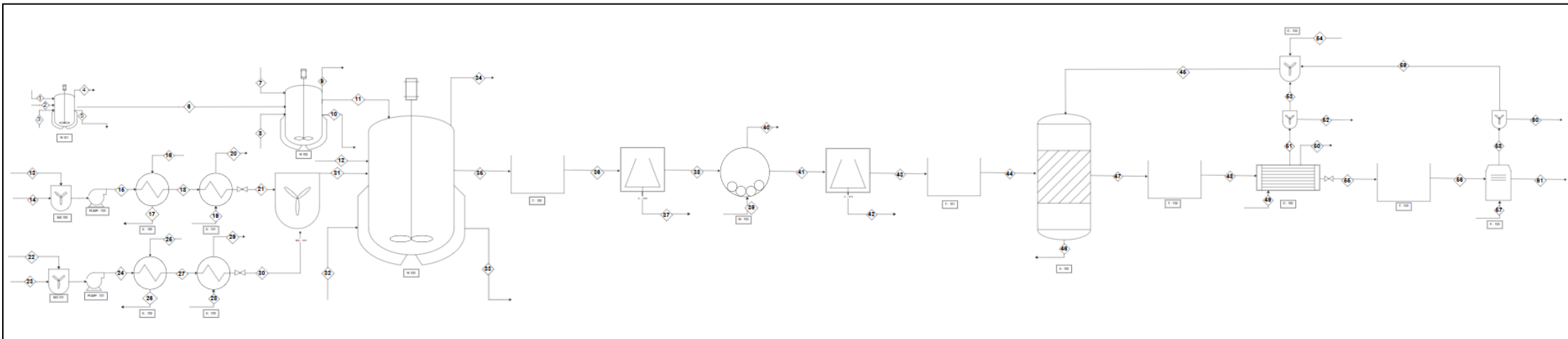


Figura 4.2. PFD producción de vitamina b12.

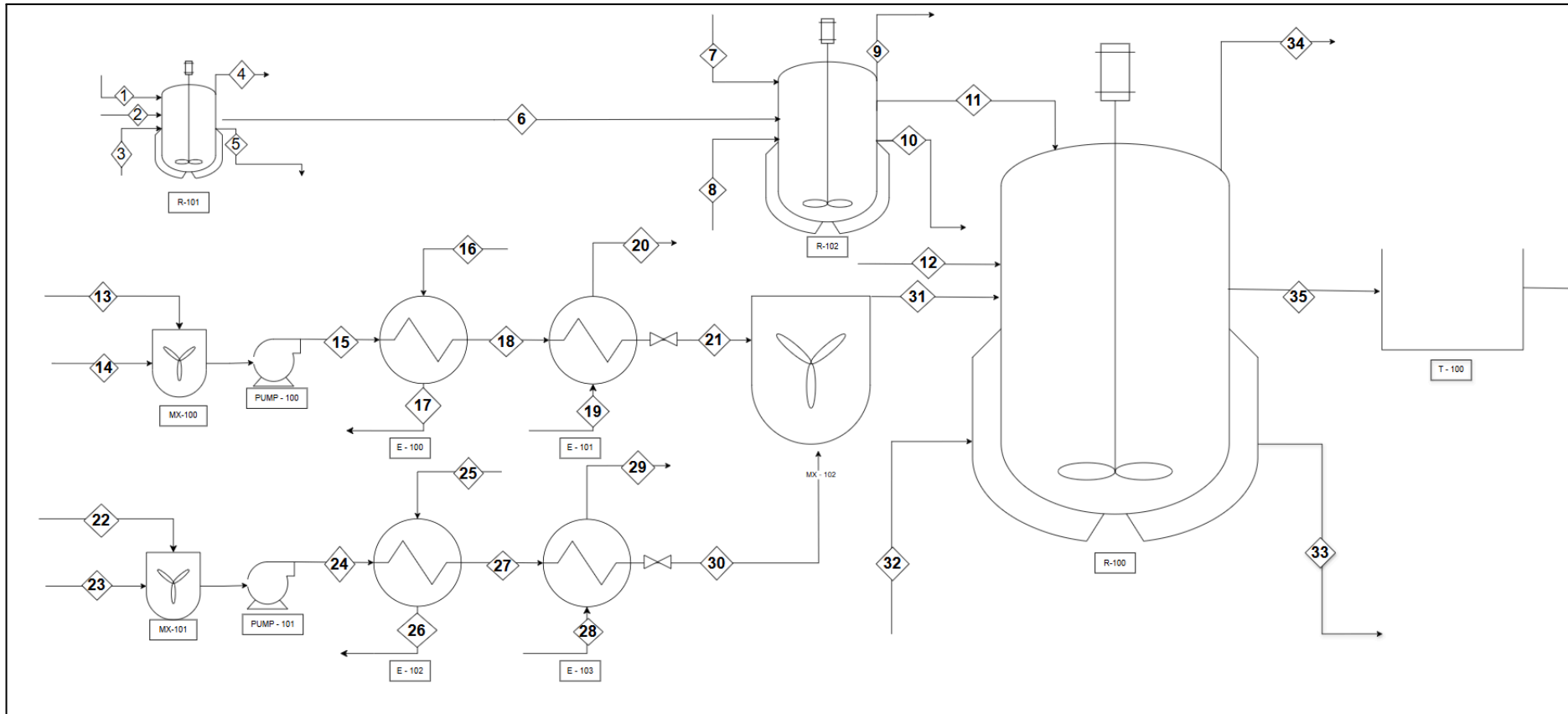


Figura 4.3. PFD Etapa Upstream - producción de vitamina b12.

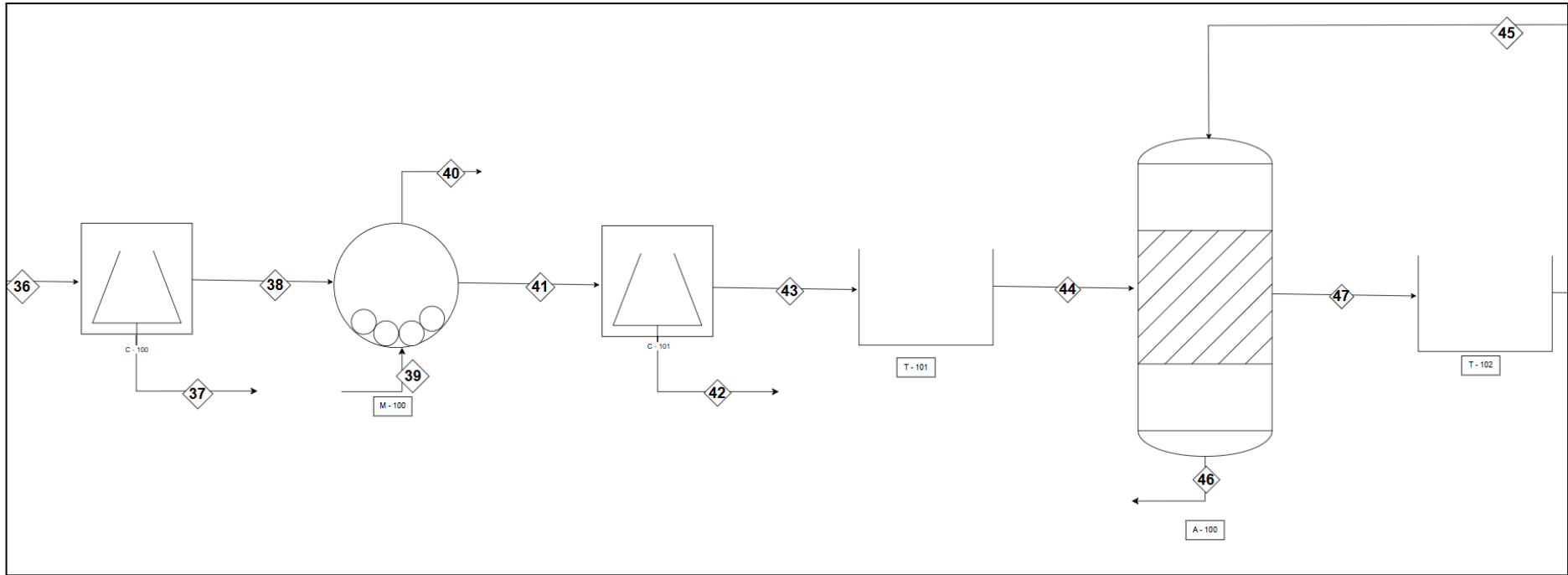


Figura 4.4. PFD Etapa downstream separación - producción de vitamina b12.

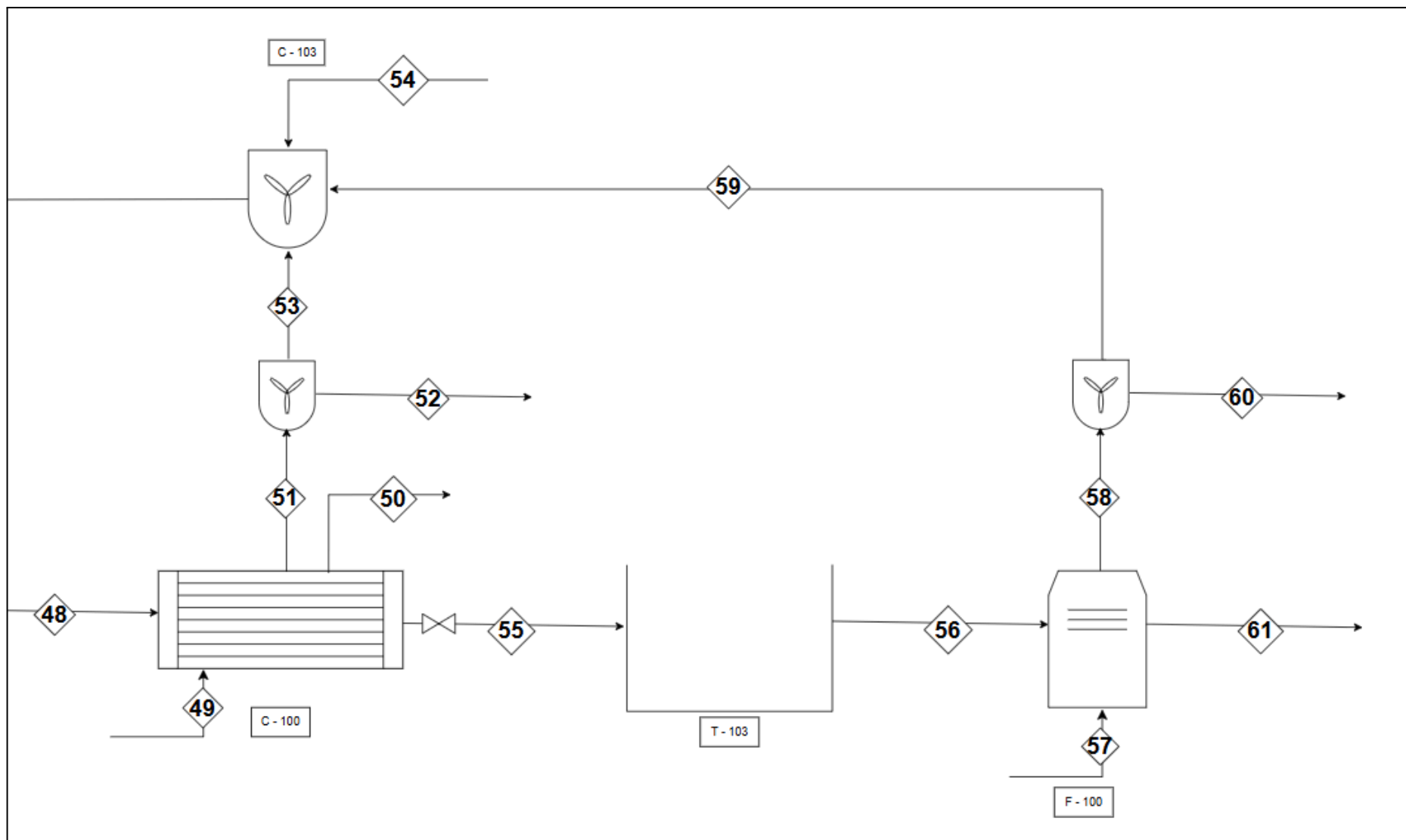


Figura 4.5. PFD Etapa downstream purificación - producción de vitamina b12.

Asimismo, la tabla 4.1 presenta datos generales de los equipos, como: el régimen de trabajo, los parámetros de operación, la función, los compuestos que ingresan y salen de cada equipo, entre otros. Cabe recalcar, que estos datos serán necesarios para los cálculos de las siguientes secciones.

Tabla 4.1: Datos generales de los equipos del proceso.

Equipo	Símbolo	Función	Condiciones de trabajo			Compuestos	
			Régimen	Estado	Parámetros	Entrada	Salida
Preparación del inóculo							
Prefermentador 1	R-100	Permitir el crecimiento y la multiplicación de la cepa	Batch	No estacionario	30°C, 1 atm	Medio de cultivo Biomasa Agua de enfriamiento	Medio de cultivo gastado Biomasa Ácido propiónico Ácido acético Ácido succínico Dióxido de carbono Agua de enfriamiento
Prefermentador 2	R-101						
Preparación del medio de cultivo							
Tanque de mezcla 1	MX-100	Mezclar la glucosa monohidratada y agua	Continuo	Estacionario	Condiciones ambientales	Agua Glucosa monohidratada	Agua Licor de maceración de maíz Fosfato monopotásico Cloruro de cobalto Nitrito de amonio
Tanque de mezcla 2	MX-101	Mezclar el agua desionizada, el licor de maceración de maíz, el fosfato monopotásico, el cloruro de cobalto y el nitrato de amonio					
Tanque de mezcla 3	MX-102	Mezclar la solución de glucosa con la solución fosfatada					
Bomba 1	PUMP- 100	Aumentar la presión	Continuo	Estacionario	Temperatura ambiente, 3 atm	Solución de glucosa	Solución fosfatada
Bomba 2	PUMP-101						

Intercambiador de calor 1	E-100	Incrementar la temperatura	Batch	No estacionario	115 °C, 3 atm	Solución de glucosa Agua de calentamiento	
Intercambiador de calor 3	E-102					Solución fosfatada Agua de calentamiento	
Intercambiador de calor 2	E-101	Disminuir la temperatura			Temperatura ambiente, 3 atm	Solución de glucosa Agua de calentamiento	
Intercambiador de calor 4	E-103					Solución fosfatada	
Fermentación							
Biorreactor	R-102	Realizar la fermentación	Batch	No estacionario	30°C, 1 atm	Medio de cultivo (solución de glucosa y fosfatada) Biomasa 5,6-dimetil-benzimidazol (DMBI) Agua de enfriamiento	Medio de cultivo gastado Biomasa (con vitamina b12) Ácido propiónico Ácido acético Ácido succínico Dióxido de carbono Agua de enfriamiento
Tanque de almacenamiento 1	T-100	Almacenar el medio de cultivo, el producto y los subproductos	Batch	No estacionario	Condiciones ambientales	Medio de cultivo gastado Biomasa (con vitamina b12) Ácido propiónico Ácido acético Ácido succínico	
Etapa de separación							
Centrífuga 1	CN-100	Separar el medio de cultivo y subproductos de la biomasa	Continuo	Estacionario	Condiciones ambientales, 40000 rpm	Medio de cultivo gastado Biomasa (con vitamina b12) Ácido propiónico Ácido acético Ácido succínico	
Centrífuga 2	CN-101	Separar el material líquido citoplasmático, material genético y vitamina b12 del residuo sólido celular (paredes y membrana celular)				Residuo sólido celular (paredes y membranas celulares) Material citoplasmático y genético Vitamina b12	
Molino de bolas	M-100	Realizar la lisis celular	Continuo	Estacionario	Temperatura ambiente, 1 atm	Biomasa (con vitamina b12) Agua de enfriamiento	

Tanque de almacenamiento 2	T-101	Almacenar el material citoplasmático y genético, y la vitamina b12	Batch	No estacionario	Condiciones ambientales	Material citoplasmático y genético Vitamina b12
Etapa de purificación						
Columna de adsorción y desorción	A-100	Separar la vitamina b12 del medio intracelular	Batch	No estacionario	30 °C, pH 5, 1 atm	Medio intracelular Vitamina b12 Solución de metanol al 40%
Tanque de almacenamiento 3	T-102	Almacenar la vitamina b12 y la solución de metanol al 40%	Batch	No estacionario	Condiciones ambientales	Vitamina b12 Solución de metanol al 40%
Tanque de almacenamiento 4	T-103	Almacenar la vitamina b12 y la solución de metanol al 40%	Batch	No estacionario	Condiciones ambientales	Vitamina b12 Solución de metanol al 40%
Tanque de mezcla 4	MX-103	Mezclar la solución de metanol que sale del cristalizador y secador, junto con una nueva solución	Continuo	Estacionario	Condiciones ambientales	Solución de metanol al 40%
Cristalizador	C-100	Formar cristales de vitamina b12 y retirar un gran porcentaje de solución de metanol	Batch	No estacionario	49°C, 0.15 atm	Vitamina b12 Solución de metanol al 40%
Secador por atomización	F-100	Separar los cristales de vitamina b12 de la solución de metanol	Continuo	Estacionario	Aire caliente de 140°C a 85°C, 6 bar	Vitamina b12 Solución de metanol al 40% Aire caliente

Teniendo en cuenta la información de la tabla anterior, se procedieron a realizar los cálculos de balance de masa en la sección posterior. Sin embargo, a fin de visualizar con mayor claridad las corrientes de entrada y salida, las tablas 4.2 y 4.3 se presentan con los valores másicos de cada corriente.

Tabla 4.2: Tabla de balance de masa etapa upstream.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34			
H2O	13,472	0,210	3,230		3,230	13,761	619,625	165,788		165,788	636,829			14251,349	14251,349	2572,364	2572,364	14251,349	65612,523	65612,523	14251,349		14251,349	14251,349	2651,407	2651,407	14251,349	67625,639	67625,639	14251,349	28502,697	19841,098	19841,098				
Glucosa	0,907	0,008				0,174	41,699				7,992		1918,140		1918,140			1918,140			1918,140												1918,140				
CSL	0,620	0,005				0,624	28,494				29,118											1310,729	1310,729				1310,729			1310,729							
KH2PO4	0,070	0,001				0,070	3,197				3,267											147,057	147,057				147,057			147,057							
(NH4)NO3	0,041	0,001				0,042	1,876				1,918											86,316	86,316				86,316			86,316							
CoCl2	0,002	0,000				0,002	0,088				0,090											4,060	4,060				4,060			4,060							
Ácido propiónico						0,423					19,883																										
Ácido acético						0,073					3,408																										
Ácido succínico						0,047					2,201																										
Biomasa		0,002				0,104					4,795																										
b12																																					
Metanol																																					
CO2				0,017					0,800																											37,109	
DMB												0,029																									
Aire																																					

Tabla 4.3: Tabla de balance de masa etapa downstream.

	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	
H2O	29521,556	29521,556	28045,479	1476,078	4274,213	4274,213	1476,080	147,608	1328,472	1328,472	4059,733	1328,472	4059,733	4059,733	820297,000	820297,000	3653,760	36,538	3617,222	40.6	405,973	405,973		405,952	401,893	4,060	0,021	
Glucosa	0,000																											
CSL	1339,847	1339,847	1272,855	66,992			66,990	6,699	60,291	60,291		60,291																
KH2PO4	150,324	150,324	142,808	7,516			7,520	0,752	6,768	6,768		6,768																
(NH4)NO3	88,234	88,234	83,823	4,412			4,410	0,441	3,969	3,969		3,969																
CoCl2	2,791	2,791	2,652	0,140			0,140	0,014	0,126	0,126		0,126																
Ácido propiónico	959,070	959,070	911,117	47,954			47,950	4,795	43,155	43,155		43,155																
Ácido acético	201,405	201,405	191,334	10,070			10,070	1,007	9,063	9,063		9,063																
Ácido succínico	137,467	137,467	130,593	6,873			6,870	0,687	6,183	6,183		6,183																
Biomasa	240,727	240,727	2,407	238,319			236,975	66,118	170,856	170,857		170,857																
b12							1,345	0,135	1,211	1,211		0,024	1,187	1,187							1,187	1,187		0,024	0,024		1,163	
Metanol											2706,489	0,000	2706,489	2706,489			2435,840	24,358	2411,482	27.1	270,649	270,649		270,646	267,940	2,706	0,003	
CO2																												
DMB	0,000	0,000	0,000	0,000																								
Aire																									12869,334	12869,334	0,000	

4.3. Balance de materia del proceso

Para realizar el balance de masa en cada equipo, se desarrolló el balance general, determinando las corrientes globales de entrada y salida del proceso. Es así como por medio del diagrama PFD (Figura 4.2) y las tablas 4.2 y 4.3, se puede identificar y definir la cantidad de compuesto en cada corriente del proceso, planteando así dicho balance, el cual se aprecia en la tabla 4.4.

Tabla 4.4: Balance de masa general del proceso.

Componente	Entrada (kg)	Salida (kg)
Agua	29136.002	29521.56
Agua de calentamiento	5223.77	5223.77
Agua de enfriamiento	133238.16	133238.16
Glucosa monohidratada	1960.75	0
Licor de maceración de maíz	1339.85	1339.85
Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄)	150.325	150.325
Cloruro de cobalto (CoCl ₂)	4.15	2.79
Nitrato de amonio ((NH ₄)NO ₃)	88.23	88.23
5.4 dimetil-benzimidazol (DMBI)	0.029	0
Dióxido de carbono (CO ₂)	0	37.926
Biomasa sin vitamina b12	0.0023	239.368
Ácido Propiónico	0	959.07
Ácido Acético	0	201.405
Ácido Succínico	0	137.47
Vitamina b12	0	1.3587
Solución de metanol al 40%	6766.246	6766.246
Aire	12869.334	12869.334
TOTAL	190776.9	190776.9

De acuerdo con los valores mostrados en la tabla anterior, se confirma que el balance de masa del proceso se cumple adecuadamente. Además, se observa que ciertos compuestos serán consumidos en su totalidad mientras que otros serán generados, esto se debe a las reacciones procedentes de los fermentadores y del biorreactor.

Una vez visualizado el balance de masa general, en los incisos posteriores se procederá a explicar detalladamente los cálculos de balance de masa realizados en cada equipo para la obtención de dichos valores. Sin embargo, es importante resaltar que los pasos generales a seguir para el desarrollo de los balances, se encuentran en la figura 3.3. Asimismo, dado que el primer paso es determinar las consideraciones del equipo a diseñar, se tomará como primera consideración el reconocimiento del régimen de trabajo y el estado de los equipos, los cuales se detallan en la tabla 4.1. Teniendo en cuenta esto, se reconocen los compuestos que entran y salen de cada equipo, para posteriormente desarrollar los cálculos partiendo de la literatura revisada.

4.3.1. Proceso Upstream

- Preparación del inóculo

Para iniciar con el balance de masa en los fermentadores, se considera lo siguiente:

- El volumen de los fermentadores, hallados en el primer inciso del presente capítulo, son 15,11 L y 604,98 L respectivamente.
- Los cálculos realizados en el inciso 3.4, los cuales son hallados a partir del modelo de Monod que describe la cinética del crecimiento microbiano del presente proceso
- Las concentraciones iniciales y finales del sustrato, la biomasa y los subproductos para el proceso de pre fermentación son tomadas del Anexo 3, teniendo en cuenta que el tiempo de fermentación es 80 h.
- La composición de la corriente de medio de cultivo es: 6% glucosa, 4.1% licor de maceración de maíz, 0.46% fosfato monopotásico, 0.27% nitrato de amonio, 0.0127% cloruro de cobalto y 89.16% agua [13][28].

- La composición de la corriente del inóculo es: 99% medio de cultivo y 1% biomasa para el fermentador 1 [28]. Sin embargo, la composición de la corriente del inóculo para el fermentador 2 será la misma que la corriente de salida del fermentador 1.
- La composición del medio de cultivo presente en la corriente del inóculo para el fermentador 1 es: 3.5% glucosa, 2.1% licor de maceración de maíz, 0.4% fosfato monopotásico, 0.5% nitrato de amonio, 0.005% cloruro de cobalto y 93% agua [13].
- El licor de maceración de maíz, el fosfato monopotásico, el nitrato de amonio y el cloruro de cobalto no intervienen en la reacción.
- La solubilidad del dióxido de carbono en agua a 30°C es 0.1257 kg CO₂ / 100 kg H₂O [28].

Teniendo en cuenta estas consideraciones, se realizan los cálculos de balance de masa en el fermentador 1 y 2 los cuales se encuentran descritos en el Anexo 4, y de esta forma se halla la cantidad de cada compuesto a la salida de cada equipo del tren de siembra, lo cual se aprecia en la tabla 4.5 y 4.6.

Tabla 4.5: Balance de masa de los componentes en el fermentador 1.

Corriente	Entrada/ Salida	Componente	Fracción másica (%)	Masa (kg)
Corriente del medio de cultivo	Entrada	Glucosa monohidratada	6	0.9066
		Licor de maceración de maíz	4.1	0.62
		Fosfato monopotásico	0.46	0.0695
		Nitrato de amonio	0.27	0.041
		Cloruro de cobalto	0.0127	0.0019
		Agua	89.16	13.47
Corriente del inóculo	Entrada	Glucosa monohidratada	3.5	0.0079
		Licor de maceración de maíz	2.08	0.0047
		Fosfato monopotásico	0.396	0.000897
		Nitrato de amonio	0.495	0.0011
		Cloruro de cobalto	0.00495	0.00001

		Agua	92.56	0.21
		Biomasa	1	0.0023
Corriente del agua de enfriamiento	Entrada	Agua de enfriamiento	100	3.23
Corriente del agua de enfriamiento	Salida	Agua de enfriamiento	100	3.23
Corriente de CO ₂	Salida	Dióxido de carbono	100	0.017
Corriente con solución concentrada	Salida	Glucosa monohidratada	1.13	0.174
		Licor de maceración de maíz	4.07	0.624
		Fosfato monopotásico	0.46	0.07
		Nitrato de amonio	0.27	0.042
		Cloruro de cobalto	0.01	0.002
		Agua	89.82	13.761
		Biomasa	0.68	0.104
		Ácido propiónico	2.76	0.423
		Ácido acético	0.47	0.073
		Ácido succínico	0.31	0.047

Tabla 4.6: Balance de masa de los componentes en el fermentador 2.

Corriente	Entrada/ Salida	Componente	Fracción másica (%)	Masa (kg)
Corriente del medio de cultivo	Entrada	Glucosa monohidratada	6	41.699
		Licor de maceración de maíz	4.1	28.49
		Fosfato monopotásico	0.46	3.197
		Nitrato de amonio	0.27	1.876
		Cloruro de cobalto	0.0127	0.088
		Agua	89.16	619.63
		Glucosa monohidratada	1.13	0.174
		Licor de maceración de maíz	4.07	0.624

Corriente del inóculo	Entrada	Fosfato monopotásico	0.46	0.07
		Nitrato de amonio	0.27	0.042
		Cloruro de cobalto	0.01	0.002
		Agua	89.82	13.761
		Biomasa	0.68	0.104
		Ácido propiónico	2.76	0.423
		Ácido acético	0.47	0.073
		Ácido succínico	0.31	0.047
Corriente del agua de enfriamiento	Entrada	Agua de enfriamiento	100	165.788
Corriente del agua de enfriamiento	Salida	Agua de enfriamiento	100	165.788
Corriente de CO ₂	Salida	Dióxido de carbono	100	0.8
Corriente con solución concentrada	Salida	Glucosa monohidratada	1.13	7.992
		Licor de maceración de maíz	4.1	29.12
		Fosfato monopotásico	0.46	3.27
		Nitrato de amonio	0.27	1.92
		Cloruro de cobalto	0.013	0.09
		Agua	89.757	636.83
		Biomasa	0.676	4.795
		Ácido propiónico	2.8	19.88
Ácido acético	0.48	3.41		
Ácido succínico	0.31	2.2		

- Biorreactor

Para iniciar con el balance de masa en el biorreactor, se consideraron los siguientes datos:

- El volumen del biorreactor es hallado en el primer inciso del presente capítulo (31969 L).

- Los cálculos realizados en el inciso 3.4, los cuales son hallados a partir del modelo de Monod que describe la cinética del crecimiento microbiano del presente proceso.
- Las concentraciones iniciales y finales del sustrato, la biomasa, el producto (vitamina b12) y los subproductos son tomadas del Anexo 3.
- La concentración de precursor a añadir a las 48 h es de 0.9 mg/L [31].
- El sustrato y el precursor vitamínico se consumen por completo en la fermentación [45].
- La relación entre el cloruro de cobalto que reacciona y la vitamina b12 es de 1:1, porque cada cobalamina formada presenta un átomo de cobalto [45].
- La composición de la corriente de medio de cultivo es: 6% glucosa, 4.1% licor de maceración de maíz, 0.46% fosfato monopotásico, 0.27% nitrato de amonio, 0.0127% cloruro de cobalto y 89.16% agua [13][28].
- La composición de la corriente del inóculo para el prefermentador 2 será la misma que la corriente de salida del prefermentador 2.
- El licor de maceración de maíz, el fosfato monopotásico y el nitrato de amonio no intervienen en la reacción.
- La solubilidad del dióxido de carbono en agua a 30°C es 0.1257 kg CO₂ / 100 kg H₂O [28].

Teniendo en cuenta estas consideraciones, se realizan los cálculos de balance de masa en el biorreactor los cuales se encuentran descritos en el Anexo 4, y de esta forma se halla la cantidad de cada compuesto a la salida del biorreactor, lo cual se aprecia en la tabla 4.7.

Tabla 4.7: Balance de masa de los componentes en el biorreactor.

Corriente	Entrada/ Salida	Componente	Fracción másica (%)	Masa (kg)
Corriente del medio de cultivo	Entrada	Glucosa monohidratada	6	1918.14
		Licor de maceración de maíz	4.1	1310.73
		Fosfato monopotásico	0.46	147.06
		Nitrato de amonio	0.27	86.32
		Cloruro de cobalto	0.0127	4.06
		Agua	89.16	28502.697
		Glucosa monohidratada	1.13	7.992

		Licor de maceración de maíz	4.1	29.12
		Fosfato monopotásico	0.46	3.27
Corriente del inóculo	Entrada	Nitrato de amonio	0.27	1.92
		Cloruro de cobalto	0.013	0.09
		Agua	89.757	636.83
		Biomasa	0.676	4.795
		Ácido Propiónico	2.8	19.88
		Ácido acético	0.48	3.41
		Ácido Succínico	0.31	2.2
Corriente del precursor vitamínico	Entrada	5,6 dimetil-benzimidazol	100	0.029
Corriente del agua de enfriamiento	Entrada	Agua de enfriamiento	100	19841.098
Corriente del agua de enfriamiento	Salida	Agua de enfriamiento	100	19841.098
Corriente de CO ₂	Salida	Dióxido de carbono	100	36.84
		Glucosa monohidratada	0	0
		Licor de maceración de maíz	4.1	1339.85
		Fosfato monopotásico	0.46	150.32
		Nitrato de amonio	0.27	88.23
		Cloruro de cobalto	0.01	2.79
Corriente con solución concentrada	Salida	5,6 dimetil-benzimidazol	0	0
		Agua	90.44	29521.56
		Biomasa (con vitamina b12)	0.74	240.73
		Ácido propiónico	2.94	959.07
		Ácido acético	0.62	201.41
		Ácido succínico	0.42	137.47

Tal y como se observa, el proceso desarrollado en los prefermentadores y en el biorreactor requiere de una cantidad elevada de agua, esto se debe a que el medio líquido para que las bacterias crezcan y se multipliquen debe estar compuesto casi por completo de agua [49].

Por otra parte, se aprecia que tanto el sustrato como el precursor vitamínico (DMBI) son consumidos en su totalidad por las bacterias, para asegurar su crecimiento y desarrollo, y la formación del producto de interés. Asimismo, se puede evidenciar que los subproductos formados en los 3 equipos son ácidos que podrían generar un problema al momento de llevar a cabo la fermentación. Sin embargo, la acidificación del medio se ve resuelta debido a la presencia del fosfato monopotásico, que a pesar de la pequeña cantidad encontrada en estos equipos, permite que el medio se mantenga en un pH adecuado para que las bacterias se desarrollen sin dificultad [38].

En contraste, uno de los residuos generados en el proceso de fermentación es el dióxido de carbono (CO_2). Este compuesto se genera debido a que el sustrato empleado es metabolizado a piruvato por el proceso de glicólisis, para luego oxidarse y formar dicho residuo [28].

Por último, cabe resaltar, que el valor del agua de enfriamiento será calculado en la sección del balance de energía. Sin embargo, se vio propicio colocar dicho dato en las tablas 4.5, 4.6 y 4.7, a fin de tener un balance de masa completo en los prefermentadores y biorreactor.

- Preparación del medio de cultivo

Para el balance de masa en la etapa de preparación del medio de cultivo, es importante tener en cuenta que esta sección está compuesta por varias etapas: preparación de la solución de glucosa, preparación de la solución fosfatada, la esterilización de ambas soluciones y el mezclado de estas soluciones. En tal sentido, dado que no ocurre reacción alguna y que no hay separación de ningún compuesto, el balance de masa consistirá en la mezcla de compuestos y el pase de estos por los intercambiadores de calor. Cabe resaltar, que los cálculos realizados para hallar la cantidad de medio de cultivo a la entrada del biorreactor serán el punto de partida para el balance de masa de esta sección del proceso y que la mitad de la cantidad de agua que ingresa al biorreactor será empleada para la preparación de la solución de glucosa y la otra mitad para la preparación de la solución fosfatada. Por último, la

tabla 4.8 muestra los resultados del balance de masa en los equipos de mezcla y los esterilizadores.

Tabla 4.8: Balance de masa de los componentes en los equipos de mezcla y esterilizadores.

Equipo	Corriente	Entrada/ Salida	Componente	Fracción másica (%)	Masa (kg)
Tanque de mezcla 1 (MX-100)	Corriente de agua	Entrada	Agua	100	14251.35
	Corriente de glucosa monohidratada	Entrada	Glucosa monohidratada	100	1918.14
	Corriente de solución de glucosa	Salida	Solución de glucosa	100	16169.49
Tanque de mezcla 2 (MX-101)	Corriente de agua	Entrada	Agua	100	14251.35
	Corriente del medio fosfatado	Entrada	Licor de maceración	84.66	1310.73
			Fosfato monopotásico	9.5	147.06
			Nitrato de amonio	5.58	86.3
			Cloruro de cobalto	0.26	4.06
Corriente de la solución fosfatada	Salida	Solución fosfatada	100	15799.51	
Intercambia dor de calor 1 (E-100)	Corriente de solución de glucosa	Entrada	Solución de glucosa	100	16169.49
	Corriente de agua de calentamiento	Entrada	Agua de calentamiento	100	2572.36
	Corriente de agua de calentamiento	Salida	Agua de calentamiento	100	2572.36
	Corriente de solución de glucosa	Salida	Solución de glucosa	100	16169.49
	Corriente de solución fosfatada	Entrada	Solución fosfatada	100	15799.51

Intercambiador de calor 3 (E-102)	Corriente de agua de calentamiento	Entrada	Agua de calentamiento	100	2651.407
	Corriente de agua de calentamiento	Salida	Agua de calentamiento	100	2651.407
	Corriente de solución fosfatada	Salida	Solución fosfatada	100	15799.51
Intercambiador de calor 2 (E-101)	Corriente de solución de glucosa	Entrada	Solución de glucosa	100	16169.49
	Corriente de agua de enfriamiento	Entrada	Agua de enfriamiento	100	65612.52
	Corriente de agua de enfriamiento	Salida	Agua de enfriamiento	100	65612.52
	Corriente de solución de glucosa	Salida	Solución de glucosa	100	16169.49
Intercambiador de calor 4 (E-103)	Corriente de solución fosfatada	Entrada	Solución fosfatada	100	15799.51
	Corriente de agua de enfriamiento	Entrada	Agua de enfriamiento	100	67625.64
	Corriente de agua de enfriamiento	Salida	Agua de enfriamiento	100	67625.64
	Corriente de solución fosfatada	Salida	Solución fosfatada	100	15799.51
Tanque de mezcla 3 (MX-102)	Corriente de solución de glucosa	Entrada	Solución de glucosa	100	16169.49
	Corriente de solución fosfatada	Entrada	Solución fosfatada	100	15799.51
	Corriente de medio de cultivo	Salida	Solución de glucosa	50.58	16169.49
			Solución fosfatada	49.42	15799.51

4.3.2. Proceso Downstream

Para desarrollar el balance de masa en el proceso Downstream, se desarrolló en primera instancia el balance en la etapa de separación (centrífuga 1, molino de bolas y centrífuga 2), para finalmente realizar el balance de masa en los equipos de la etapa de purificación (columna de adsorción, cristizador y secador), empleando así la combinación más adecuada de equipos.

- Centrífugas

Para comenzar, se realizó el balance de masa en la primera centrífuga, teniendo como consideración que la composición a la entrada de este equipo viene a ser la misma que la corriente a la salida del biorreactor, no ocurre reacción alguna y se estima una eliminación del 90% de líquido y el 5% de sólidos para la corriente del concentrado [28]. Teniendo en cuenta dicha separación, la tabla 4.9 evidencia los resultados del balance de masa para este equipo.

Tabla 4.9: Balance de masa de los componentes en la primera centrífuga.

Corriente	Entrada/ Salida	Componente	Fracción másica (%)	Masa (kg/lote)
Corriente de caldo gastado con producto y subproductos	Entrada	Caldo gastado	95.3	31102.75
		Biomasa (con vitamina b12)	0.74	240.73
		Ácido propiónico	2.94	959.07
		Ácido acético	0.62	201.41
		Ácido succínico	0.42	137.47
Corriente de permeado	Salida	Caldo gastado	96	29547.62
		Biomasa	0.0078	2.41
		Ácido propiónico	3	911,117
		Ácido acético	0.6	191.334
		Ácido succínico	0.4	130.593
Corriente con solución	Salida	Caldo gastado	83,7	1555.14
		Biomasa (con vitamina b12)	12,8	238.32

concentrada	Ácido propiónico	2,6	47.95
	Ácido acético	0.5	10.07
	Ácido succínico	0.4	6.87

Para el balance de masa en la segunda centrífuga, nuevamente se estimó la misma eliminación de líquidos y sólidos para la corriente del concentrado que para la centrífuga 1 [28]. Cabe resaltar que antes de realizar esta operación, la corriente de concentrado a la salida de la primera centrífuga pasó por la operación de molienda, descrita en el siguiente inciso. Dicho esto, la tabla 4.10 muestra los resultados del balance de masa para la centrífuga 2.

Tabla 4.10: Balance de masa de los componentes en la segunda centrífuga.

Corriente	Entrada/ Salida	Componente	Fracción másica (%)	Masa (kg/lote)
Corriente a la salida del molino de bolas	Entrada	Caldo gastado	83.7	1555.14
		Biomasa líquida sin vitamina b12	10.2	189.31
		Biomasa sólida	2.6	47.664
		Vitamina b12	0.1	1.345
		Ácido propiónico	2.6	47.95
		Ácido acético	0.5	10.07
		Ácido succínico	0.4	6.87
Corriente de permeado	Salida	Caldo gastado	85.9	1399.63
		Biomasa líquida sin vitamina b12	10.5	170.38
		Biomasa sólida	0.03	0.477
		Vitamina b12	0.1	1.211
		Ácido propiónico	2.6	43.155
		Ácido acético	0.6	9.063
Corriente con solución concentrada	Salida	Caldo gastado	68.1	155.514
		Biomasa líquida sin vitamina b12	8.3	18.931
		Biomasa sólida	20.7	47.187
		Vitamina b12	0.1	0.135

Ácido propiónico	2.1	4.795
Ácido acético	0.4	1.007
Ácido succínico	0.3	0.687

De acuerdo a lo mostrado en la tabla 4.10, se puede apreciar que la recuperación del producto al finalizar las etapas de separación es de un 90%. En tal sentido, se afirma que la separación realizada en las centrífugas es la adecuada para un proceso farmacéutico [28].

- Molino de bolas

En el caso del molino de bolas, se consideró que la composición de la corriente de entrada al molino viene a ser la misma que la corriente con solución concentrada proveniente de la centrífuga 1. Cabe resaltar, que para definir la composición de la corriente a la salida del molino, el compuesto “biomasa” se dividió en 3 compuestos: biomasa sólida (membrana y pared celular), biomasa líquida (medio intracelular) y vitamina b12 (producto de la fermentación); considerando que la célula bacteriana está compuesta por un 12% de sólido y un 88% de líquido (medio intracelular y vitamina b12) [82]. Dicho esto, a continuación se muestra la tabla 4.11 con los resultados de los balances de masa respectivos para este equipo.

Tabla 4.11: Balance de masa de los componentes en el molino de bolas.

Corriente	Entrada/ Salida	Componente	Fracción másica (%)	Masa (kg/lote)
Corriente a la entrada del molino de bolas	Entrada	Caldo gastado	89.1	1555.14
		Biomasa	7	238.32
		Ácido propiónico	2.8	47.95
		Ácido acético	0.6	10.07
		Ácido succínico	0.4	6.87
Corriente a la salida del molino de bolas	Salida	Caldo gastado	83.7	1555.14
		Biomasa líquida sin vitamina b12	10.2	189.31
		Biomasa sólida	2.6	47.664
		Vitamina b12	0.1	1.345

Ácido propiónico	2.6	47.95
Ácido acético	0.5	10.07
Ácido succínico	0.4	6.87

- Columna de adsorción

Para el balance de masa en este equipo se tendrá en cuenta las dos sub etapas intercaladas de adsorción y desorción [28]. En tal sentido, esta operación cuenta con 2 corrientes de entrada: una por donde ingresa la corriente de salida de líquidos de la centrífuga 2 y otra la solución de metanol al 40% aplicado para la desorción. Dicho esto, para la adsorción se considera el uso de la resina Duolite S861, la cual es muy selectiva para nuestra vitamina frente al resto de compuestos, de manera que permitirá adsorber el 98% de vitamina b12 y todo el medio de cultivo restante junto con el medio intracelular será eliminado [44]. Posteriormente, para hallar la cantidad de solución de metanol a emplear en la desorción, se utilizaron los cálculos realizados en el Anexo 5. Con todos estos datos, se realizó el balance de masa respectivo, el cual se evidencia en la tabla 4.12.

Tabla 4.12: Balance de masa de los componentes en adsorbedor.

Corriente	Entrada/ Salida	Componente	Fracción másica (%)	Masa (kg/lote)
Corriente a la salida de la centrífuga 2	Entrada	Caldo gastado	85.9	1399.63
		Biomasa líquida sin vitamina b12	10.5	170.38
		Biomasa sólida	0.03	0.477
		Vitamina b12	0.1	1.211
		Ácido propiónico	2.6	43.155
		Ácido acético	0.6	9.063
		Ácido succínico	0.4	6.183
Corriente de solución de metanol al 40%	Entrada	Metanol	40	2706.489
		Agua	60	4059.733
		Caldo gastado	85.9	1399.63
		Biomasa líquida sin vitamina b12	10.5	170.38

Corriente de medio de cultivo e intracelular residual	Salida	Biomasa sólida	0.029	0.477
		Vitamina b12	0.001	0.024
		Ácido propiónico	2.6	43.155
		Ácido acético	0.6	9.063
		Ácido succínico	0.4	6.183
Corriente solución de metanol al 40% con vitamina b12	Salida	Metanol	39.99	2706.489
		Agua	59.99	4059.733
		Vitamina b12	0.02	1.187

- Cristalizador

Aquí, la mayor parte de la solución de metanol fue evaporada y se formaron los cristales de vitamina b12, quedando una solución concentrada de esta vitamina. En tal sentido, se consideró que el 90% de la solución de metanol se evaporó y el resto pasó al siguiente equipo [28]. Así pues, la tabla 4.13 muestra los resultados del balance de materia en cada corriente perteneciente a este equipo.

Tabla 4.13: Balance de masa de los componentes en el cristalizador.

Corriente	Entrada/ Salida	Componente	Fracción másica (%)	Masa (kg/lote)
Corriente a la salida del adsorbedor	Entrada	Metanol	39.99	2706.489
		Agua	59.99	4059.733
		Vitamina b12	0.02	1.187
Corriente de agua de enfriamiento	Entrada	Agua	100	80810.45
Corriente de agua de enfriamiento	Salida	Agua	100	80810.45
Corriente de solución de metanol	Salida	Metanol	40	2435.84
		Agua	60	3653.76
Corriente de concentrado	Salida	Metanol	85.9	270.649
		Agua	0.6	405.973

Vitamina b12	0.4	1.187
--------------	-----	-------

Dado que el sistema de cristalización está conformado por el tanque de cristalización, el condensador y el tanque de almacenamiento, el balance de masa desarrollado fue tomando en consideración a este sistema como una sola operación.

Por último, cabe resaltar, que el valor del agua de enfriamiento para este sistema será calculado en la sección del balance de energía. Sin embargo, se vio propicio colocar dicho dato en la tabla 4.13, a fin de tener un balance de masa completo en el sistema de cristalización.

- Secado por atomización

Por último, para realizar el balance de masa en el secador, se consideró el estudio de Soares, Henares y Roncador (2019), en el que informan que por cada 100 kg de vitamina b12 producida hay 2 kg de impureza (solución de metanol) y que por cada 1 kg de impureza se tiene 0.129 kg de metanol y 0.875 kg de agua [44]. Asimismo, por medio del estudio de Estevinho et al. (2016), se sabe que la recuperación de la vitamina es de un 98% y que su pureza es de 98% [83]. Cabe resaltar, que la cantidad de aire a emplear en el equipo, fue hallada por medio del balance de energía, cálculos que se presentan en los siguientes incisos. De esta forma, la tabla 4.14 presenta el balance de masa en esta última operación.

Tabla 4.14: Balance de masa de los componentes en el secador.

Corriente	Entrada/ Salida	Componente	Fracción másica (%)	Masa (kg/lote)
Corriente a la salida del adsorbedor	Entrada	Metanol	39.99	2706.489
		Agua	59.99	4059.733
		Vitamina b12	0.02	1.187
Corriente de aire seco	Entrada	Aire	100	12869.334
Corriente de sólido	Salida	Metanol	0.25	0.003
		Agua	1.75	0.021
		Vitamina b12	98	1.163
		Metanol	1.998	270.646

Corriente de aire húmedo	Salida	Agua	2.997	405.952
		Vitamina b12	0.00018	0.024
		Aire	95	12869.334

De acuerdo a lo mostrado en las tablas 4.12, 4.13 y 4.14, se puede apreciar que la recuperación del producto al finalizar la etapa de purificación es de un 96%. En este contexto, se confirma que la purificación realizada mediante estos equipos (columna de adsorción, cristizador y secado por atomización) cumple con los requisitos necesarios para un proceso farmacéutico [28].

- Reciclo

Dada la cantidad de solución de metanol que se separa de la corriente de concentrado para la operación de cristalización y la cantidad de esta misma que se elimina en el aire a la salida del secador, se vio propicio reutilizar dicha solución para la desorción del siguiente lote de vitamina b12. En tal sentido, se ejecutaron 2 corrientes de reciclo, en donde se considera que se pierde el 1% de la solución de metanol que sale de ambos equipos en cada lote. Estas soluciones se dirigen a un tanque de mezcla, donde se combinan junto con una solución de metanol nueva. De esta forma, la tabla 4.15 presenta el balance de masa en el tanque de mezcla.

Tabla 4.15: Balance de masa de los componentes en el secador.

Corriente	Entrada/ Salida	Componente	Fracción másica (%)	Masa (kg/lote)
Corriente a la salida del cristizador	Entrada	Metanol	40	2435.84
		Agua	60	3653.76
Corriente a la salida del secador	Entrada	Metanol	39.9995	270.646
		Vitamina b12	0.0035	0.024
		Agua	59.9969	405.952
Corriente nueva de solución de metanol	Entrada	Metanol	40	0.001
		Agua	60	0.023
Corriente ingreso al adsorbedor	Salida	Metanol	39.9995	2706.489
		Agua	0.0035	4059.733
		Vitamina b12	59.9969	0.024

Por último, habiendo evaluado el balance de masa en cada etapa del proceso, se determinó que los equipos que generan la mayor cantidad de residuos, son las centrífugas. Esto se debe, a que en dichos equipos se elimina gran parte del medio gastado (medio de cultivo gastado y residuos bacterianos) producto de la fermentación en el biorreactor, sin pasar por algún tratamiento previo para ser reutilizado en el proceso.

4.4. Balance de energía de los equipos principales

4.4.1. Intercambiadores de calor

Para comenzar, por medio de la ecuación 14, se hallaron los calores que requieren los equipos de calentamiento para elevar la temperatura de la solución de glucosa y la solución fosfatada a 115°C. Para esto, se utilizó vapor de agua como fluido a calentar. En tal sentido, la tabla 4.16 muestra los parámetros necesarios para realizar el balance de energía en los equipos de calentamiento.

Tabla 4.16: Parámetros para el cálculo en los equipos de calentamiento.

Equipo	Parámetros	Solución		Vapor de agua		Referencias
		Entrada	Salida	Entrada	Salida	
Equipo de calentamiento 1 (Solución de glucosa)	Temperatura (°C)	25	115	150	133.6	[28]
	Presión (atm)	3	3	3	3	[28]
	Flujo másico (kg/h)	2694.915		Por calcular		[Cálculo]
	Entalpía específica (kJ/kg)	-14769.5	-14442.8	-13195.54	-15414.62	[84]
	Q (kJ/h)	951388.79		951388.79		[Cálculo]
Equipo de calentamiento 2 (Solución fosfatada)	Temperatura (°C)	25	115	150	133.6	[38]
	Presión (atm)	3	3	3	3	[38]
	Flujo másico (kg/h)	2633.25		Por calcular		[Cálculo]
	Entalpía específica (kJ/kg)	-15866.02	-15493.64	-13195.54	-15414.62	[85]
	Q (kJ/h)	951388.79		951388.79		[Cálculo]

Teniendo en cuenta estos parámetros y utilizando la ecuación 14, se halló el flujo másico de vapor de agua para calentar la solución de glucosa y la solución fosfatada, las cuales resultaron ser 2572.364 kg/h y 2651.41 kg/h respectivamente.

A continuación, por medio de la ecuación 14, se hallaron los calores a disipar por las soluciones en los equipos de enfriamiento para disminuir la temperatura hasta 30°C. Para esto, se utilizó agua como fluido a enfriar. Dicho esto, la tabla 4.17 muestra los parámetros necesarios para realizar el balance de energía en los equipos de enfriamiento.

Tabla 4.17: Parámetros para el cálculo en los equipos de enfriamiento.

Equipo	Parámetros	Solución		Vapor de agua		Referencias
		Entrada	Salida	Entrada	Salida	
Equipo de enfriamiento 1 (Solución de glucosa)	Temperatura (°C)	115	30	20	40	[28]
	Presión (atm)	3	3	1	1	[28]
	Flujo másico (kg/h)	2694.915		Por calcular		[Cálculo]
	Entalpía específica (kJ/kg)	-14442.8	-14777	-	-	[84]
	Calor específico (kJ/kg.°C)	-	-	4.113	4.107	[85]
	Q (kJ/h)	951388.79		951388.79		[Cálculo]
Equipo de enfriamiento 2 (Solución fosfatada)	Temperatura (°C)	115	30	20	40	[38]
	Presión (atm)	3	3	1	1	[28]
	Flujo másico (kg/h)	2633.25		Por calcular		[Cálculo]
	Entalpía específica (kJ/kg)	- 15493.64	- 15845.47	-	-	[85]
	Calor específico (kJ/kg.°C)	-	-	4.113	4.107	[84]
	Q (kJ/h)	951388.79		951388.79		[Cálculo]

Tomando estos parámetros y utilizando la ecuación 19, se halló el flujo másico de agua para enfriar la solución de glucosa y la solución fosfatada, las cuales resultaron ser 8201.566 kg/h y 8453.21 kg/h respectivamente.

4.4.2. Biorreactor y prefermentadores

El balance de energía en las etapas de fermentación comenzó reconociendo que este proceso libera energía y por tanto se necesita de una chaqueta de enfriamiento para que la temperatura se mantenga a 30°C. En tal sentido, se realizó dicho balance para hallar el calor de acumulación y la masa de agua de enfriamiento para mantener la temperatura de fermentación en 30 °C. Así pues, para comenzar con los cálculos, se tomó la siguiente ecuación [28].

$$Q_{reac} + Q_{agit} - Q_{per} - Q_{evap} = Q_{acc} \quad (32)$$

Donde:

- Q_{reac} : Calor de reacción
- Q_{agit} : Calor por agitación
- Q_{per} : Calor perdido
- Q_{evap} : Calor por evaporación (que para este estudio no se cuenta)
- Q_{acc} : Calor acumulado

Luego, se calcularon cada uno de estos calores (Anexo 6) y se sumaron para hallar el calor de acumulación, tal como se aprecia en la tabla 4.18.

Tabla 4.18: Calores generados en las etapas de fermentación.

Parámetros	Prefermentador 1	Prefermentador 2	Biorreactor
Q_{reac} [kJ/h]	466.97	21478.36	1218466.304
Q_{agit} [kJ/h]	6.598	2786.11	1684411
Q_{per} [kJ/h]	4.309	48.37	626.86
Q_{acc} [kJ/h]	469.26	24216.11	2902251.077

Una vez hallado el calor de acumulación, se calculó la masa de agua de enfriamiento por medio de los siguientes parámetros extraídos de bibliografía [38] y vistos en la tabla 4.19.

Tabla 4.19: Parámetros para hallar la masa de agua de enfriamiento.

Parámetros	Prefermentador 1	Prefermentador 2	Biorreactor
Q_{acc} (kJ/h)	469.26	24216.11	2902251.077
C_p (kJ/kg.°C)	4.18	4.18	4.18
ΔT (°C)	35	35	35
m_{agua} [kg]	3.2	165.52	19837.67

4.4.3. Centrifugación

El balance energético del sistema de centrifugación se realiza a los dos equipos, el primero en la separación de la biomasa del líquido y el segundo para separar el se trabajaron con las entalpías de dichos fluidos y sus respectivas masas mediante la siguiente ecuación:

$$Q = \sum(m_{salida} h_{salida}) - \sum(m_{entrada} h_{entrada}) \quad (33)$$

Donde:

- Q : Calor (kj)
- h : Entalpía específica (kj/kg)
- m : Masa (kg)

- Primera Centrifugación

Los valores hallados de los parámetros para la primera centrifuga, se encuentran descritos en la tabla 4.20.

Tabla 4.20: Balance de energía de la primera centrifugación.

	Entrada	Salida
Consideraciones	estacionario	
Presión (atm)	1	1
Temperatura	20	20

Entalpía (kJ/kg)	$h_1 = 1511.8$	$h_2 = 1511.8$
Potencia (kW)	1119.7	0.106
Potencia total (kW)	15	

- Segunda Centrifugación

Los valores hallados de los parámetros para la segunda centrífuga, se encuentran descritos en la tabla 4.21.

Tabla 4.21: Balance de energía de la segunda ultrafiltración.

	Entrada	Salida
Consideraciones	estacionario	
Presión (atm)	1	1
Temperatura	20	20
Entalpía (kJ/kg)	$h_1 = 1511.8$	$h_2 = 1511.8$
Potencia (kW)	1119.7	0.106
Potencia total (kW)	5	

4.4.4. Molino de bolas

En cuanto al balance energético para el molino de bolas, se consideró que el flujo energético generado por la fractura de partículas es despreciable y que, dada la cantidad de colisiones entre las bolas, el fluido en el interior del molino tiende a calentarse, por lo que es necesario emplear una camisa de enfriamiento. En tal sentido, se empleó la siguiente ecuación:

$$Q_f + P = Q_d + Q_{loss} \quad (34)$$

Donde:

- Q_f : Energía proveniente del caldo de alimentación
- P : Potencia
- Q_d : Flujo de salida
- Q_{loss} : Energía disipada por el molino

Así pues, dado que la energía del fluido tanto a la entrada como a la salida son los mismos, estos términos se eliminan de la ecuación, y por medio de los parámetros presentados en la tabla 4.22 sacados de catálogo [121] se realiza el cálculo de balance de energía para hallar la temperatura de salida del agua de enfriamiento.

Tabla 4.22: Datos para el balance energético.

Datos	Valor
Potencia (kW)	27
Calor específico del agua (kJ/kg.°C)	4.18
Flujo del agua de enfriamiento (kg/h)	1150
Temperatura de entrada del agua de enfriamiento (°C)	20
Temperatura de salida del agua de enfriamiento (°C)	40.22

4.4.5. Adsorbedor

Para realizar el balance de energía del adsorbedor, se empleó la ecuación de Ergun para hallar la pérdida de presión dentro de la columna.

$$\frac{\Delta P}{L} = \frac{150 \times \mu_L \times v_F \times (1 - \epsilon_B)}{d_p^2 \times \epsilon_B^3} + \frac{1.75 \times \rho_L \times v_F^2 \times (1 - \epsilon_B)}{d_p \times \epsilon_B^3} \quad (35)$$

Donde:

- L : longitud de la columna (m)
- μ_L : viscosidad del líquido (kg/m.s)
- ρ_L : densidad del líquido (kg/m³)
- ϵ_B : porosidad del lecho (adimensional)

- d_p : diámetro de partícula (m)
- v_f : velocidad del fluido (m/min)
- ΔP : Pérdida de presión dentro de la columna (Pa)

En tal sentido, la tabla 4.23 muestra los valores de cada parámetro los cuales fueron obtenidos de bibliografía, a excepción de la longitud de la columna, la cual fue hallada por el Método de LUB explicado en la sección de dimensionamiento de la columna de adsorción.

Tabla 4.23: Parámetros para hallar la pérdida de presión

Datos	Valor	Referencias
Longitud de la columna (m)	1.347	[Cálculo]
Viscosidad del líquido (kg/m.s)	0.01	[86]
Densidad del líquido (kg/m ³)	1000	[84]
Porosidad del lecho (adimensional)	0.4	[87]
Diámetro de partícula (m)	0.0004	[87]
Velocidad del fluido (m/min)	0.001389	[28]
Pérdida de presión dentro de la columna (Pa)	164568.7	[Cálculo]

Una vez hallada la pérdida de presión, se calculó la potencia de la bomba que permitirá mover el fluido a través de la columna. Dato que se aprecia en la tabla 4.24.

$$W_{bomba} = F_V \times \Delta P_L \quad (36)$$

Tabla 4.24: Parámetros para el cálculo de potencia de la bomba.

Datos	Valor
Pérdida de presión dentro de la columna (Pa)	164568.7
Flujo volumétrico a escala industrial (m ³ /s)	0.000174
Potencia de la bomba (W)	28.57

4.4.6. Cristalizador

Esta operación trabaja a presiones de vacío de 0.15 atm y necesita mantener una temperatura de 49°C, para esto se utiliza agua de calentamiento. Empleando la ecuación. 14 y los valores de entalpía del agua y del metanol obtenidos del simulador de procesos PROMAX, se logró determinar la potencia total empleada por el equipo, la cual es igual al calor requerido por esta etapa obtenido del intercambio de calor con el agua (tablas 4.25, 4.26 y 4.27). Por último, la tabla 4.27, presenta los valores empleados en el balance de energía del condensador para hallar la cantidad de agua de enfriamiento que ha de ingresar al sistema de cristalización.

Tabla 4.25: Balance de energía en el tanque de cristalización.

	Entrada	Salida vapor	Salida sólido
Temperatura (°C)	30	49	49
Presión (atm)	1	0.15	0.15
Entalpía del agua (kJ/kg)	-1143	2384	205.1
Entalpía del metanol (kJ/kg)	125.8	1131	63.8
Potencia total (kW)		775.07	

Tabla 4.26: Balance de energía del agua de calentamiento para el tanque de cristalización.

	Entrada	Salida
Fluido		Agua
Temperatura (°C)	150	120
Presión (atm)	1	1
Cp (kJ/kg°C)	1.98	2.005
Masa de agua (kg/s)		12.92

Tabla 4.27: Balance de energía del agua de enfriamiento para el condensador.

	Entrada	Salida
Fluido	Agua	
Temperatura (°C)	5	40
Presión (atm)	1	1
Cp (kJ/kg°C)	4.18	4.18
Masa de agua (kg/s)		3.74

4.4.7. Secador

Para el balance de energía en el secador, se tomó la siguiente expresión y se emplearon los resultados obtenidos en el Anexo 7 para el cálculo de los calores de entrada y salida [83], siendo estos registrados en la tabla 4.28.

$$Q_{feed} + Q_{in} = Q_{loss} + Q_{out} \quad (37)$$

Tabla 4.28: Flujos de energía en el equipo de secado.

Calores	Valor
Q_{feed} (kJ/s)	25.07
Q_{in} (kJ/s)	113.41
Q_{out} (kJ/s)	72.49
Q_{loss} (kJ/s)	66

Asimismo, se calculó la energía eléctrica requerida para calentar el aire a 140°C por medio del Anexo 7, siendo el resultado 93.16 kJ/s.

4.5. Síntesis de energía

Habiendo realizado el balance de energía en cada uno de los equipos principales, se ejecuta una síntesis de todos estos cálculos desarrollados anteriormente, y se identifican los resultados energéticos provenientes de la energía eléctrica que es necesaria para nuestro proceso. En tal sentido, la tabla 4.29 presenta el resumen de dichos valores, a fin de conocer la energía total requerida para la producción de la vitamina.

Tabla 4.29: Síntesis energética para el proceso

Equipo	Energía (KW)	Energía (KW-h)
Mixer 1	232.014	464.028
Mixer 2	232.014	464.028
Mixer 3	701.838	1403.676
Mixer 4	54.777	109.55
Intercambiador de calor (calentamiento - solución glucosa)	264.275	1585.648
Intercambiador de calor (calentamiento - solución fosfatada)	272.395	1634.372
Prefermentador 1	0.00183	0.176
Prefermentador 2	0.7739	74.294
Biorreactor	467.892	67376.465
Centrífuga 1	20	140
Centrífuga 2	5	35
Molino de bolas	27	108
Columna de adsorción	0.0286	0.657
Cristalizador	775.07	129 41.46
Secador por atomización	93.16	465.8
Total	3147	73991.2

De esta forma, en la tabla 4.29, podemos observar que el equipo de mayor consumo energético es el biorreactor con un consumo de 67376.47 KW-h, esto debido al tiempo de agitación que demanda la fermentación (6 días). Por otro lado, los equipos que también consumen buena parte de la energía para este proceso son los intercambiadores de calor en la sección de esterilización del medio de cultivo. Esto se debe al volumen de medio de cultivo que manejan dichos equipos. En conclusión, se necesita un total de 73991.2 KW-h para ejecutar un lote del proceso.

Por último, el valor del consumo energético total de nuestro proceso se encuentra dentro del rango establecido para las plantas de producción biotecnológica, las cuales suelen presentar consumos energéticos altos que van desde los 2 hasta los 50 millones de kWh al año [134].

4.5. Dimensionamiento de equipos

4.5.1. Intercambiadores de calor

En primer lugar, tal como se muestra en la figura 4.3, antes del ingreso a los intercambiadores de calor se requiere una bomba centrífuga para aumentar la presión de 1 a 3 atmósferas en las corrientes de solución de glucosa y medio fosfatado. Estas bombas fueron dimensionadas como se muestra en la tabla 4.30:

Tabla 4.30: Dimensionamiento de las bombas pre esterilización.

	Entrada	Salida	Fuente
Temperatura (°C)		25	[Cálculo]
Presión (atm)	1	3	[28]
Flujo másico H2O (kg/s)		0.49	[Cálculo]
Densidad (kg/m ³)		997.1	[85]
Caudal (m ³ /s)		0.0005	[Cálculo]
Viscosidad (kg/m·s)		0.0008905	[85]
Longitud de tubería (m)		1	[Cálculo]
Diámetro de la tubería			
	$D = \sqrt{\frac{4Q}{\pi \cdot v}}$	(38)	0.026 m [3]
Número de Reynolds			

$Re = \frac{Dv\rho}{\mu}$	(39)	707.52	[88]
Factor de Fricción			
$f = \frac{64}{Re}$	(40)	0.09	[88]
Pérdida de carga mayores			
$h_{L, mayores} = \frac{L}{D} \frac{V_{prom}^2}{2g}$	(41)	0.14 m	[88]
Pérdida de carga menores			
$h_{L, menores} = K * \frac{V^2}{2g}$ * $k_L = 0.8$	(42)	0.03 m	[88]
Pérdida de carga total			
$h_L = h_{L, mayores} + h_{L, menores}$	(43)	0.17 m	[88]
Potencia de bombeo			
$W_{bomba} = mgh_L$	(44)	0.68 W	[88]
Ecuación de Bernoulli			
$\frac{P_1}{\rho g} + \alpha_1 \frac{V_1^2}{2g} + z_1 + h_{bomba} = \frac{P_2}{\rho g} + \alpha_2 \frac{V_2^2}{2g} + z_2 + h_L$	(45)		
* $\alpha = 2$ Flujo totalmente laminar		$h_{bomba} = 20.99$ m	[88]
Bomba seleccionada. Adaptado de [84]			
- Fabricante: Bombas Hasa			
- Tipo de bomba: Electrobombas centrífugas para proceso químico			
- Serie: HSQ			
- Bomba: Bomba 531			
- RPM: 1450			

Dado que el caudal es similar en ambas bombas, así como las presiones y temperatura, se utilizará el mismo modelo de bomba tanto para la corriente de solución fosfatada como para la de glucosa.

Para el dimensionamiento de los equipos de calentamiento y enfriamiento, se siguió lo desarrollado en el Anexo 8. En tal sentido, la tabla 4.31 muestra los parámetros empleados y los resultados obtenidos.

Tabla 4.31: Parámetros y resultados del dimensionamiento de los intercambiadores de calor.

Parámetro	Equipos de calentamiento		Equipos de enfriamiento	
	Solución de glucosa	Solución fosfatada	Solución de glucosa	Solución fosfatada
Volumen de la solución a calentar o enfriar (m3)	15.77	15.7995	15.77	15.7995
Volumen del equipo (m3)	18	18	18	18
Diámetro del equipo (m)	2.2545	2.2545	2.2545	2.2545
Área del equipo (m2)	3.992	3.992	3.992	3.992
Altura del equipo (m)	4.51	4.51	4.51	4.51
Área de transferencia de calor (m2)	3.94	4.0645	5.805	5.98
Volumen del fluido de calentamiento por hora (m3)	0.418	0.4419	8.202	8.453
Longitud del serpentín (m)	0.1061	0.1087	1.413	1.413
Diámetro del serpentín (m)	1.18	1.19	1.3079	1.348

4.5.2. Prefermentadores y biorreactor

En cuanto al dimensionamiento de los equipos de fermentación, nuevamente se consideró una geometría de tanque, pero con un agitador en su interior y una chaqueta de enfriamiento alrededor del equipo para mantener la temperatura adecuada para el desarrollo de las bacterias (30°C). Asimismo, considerando que la turbina a trabajar es una de tipo Rushton [28], los cálculos para el dimensionamiento partieron del volumen del caldo de fermentación y siguieron su curso de acuerdo a lo desarrollado en el Anexo 6 (para el cálculo de la potencia de agitación y área de transferencia de calor). En tal sentido, la tabla 4.32 muestra los parámetros empleados y los resultados obtenidos.

Tabla 4.32: Parámetros y resultados del dimensionamiento de los prefermentadores y biorreactor.

Parámetro	Prefermentador 1	Prefermentador 2	Biorreactor
-----------	------------------	------------------	-------------

Volumen de fermentación (m3)	0.0151	0.695	31.969
Volumen del equipo (m3)	0.02	0.75	35
Diámetro del equipo (m)	0.294	0.985	3.545
Área del equipo (m2)	0.339	3.81	49.36
Altura del equipo (m)	0.294	0.985	3.545
Área de transferencia de calor (m2)	0.339	3.81	49.36
Tipo de agitador		Turbina Rushton	
Velocidad de giro (rpm)		210	
Potencia del agitador (kW)	0.0018	0.774	467.89
Diámetro del agitador (m)	0.097	0.325	1.17
Ancho de la paleta (m)	0.0194	0.065	0.234
Longitud de la paleta (m)	0.024	0.081	0.292
Distancia entre la base y el agitador (m)	0.088	0.296	1.064
Ancho de baffles (m)	0.0294	0.0985	0.3545
Número de baffles		4	

4.5.3. Equipos de mezcla

El dimensionamiento de los equipos de mezcla es similar al de los fermentadores, con la única diferencia de que el calor generado por la agitación es despreciable, por lo que no cuenta con una chaqueta de enfriamiento alrededor del equipo. De igual forma, los cálculos para el dimensionamiento parten del volumen del caldo de fermentación (para el caso de los primeros 3 equipos de mezcla) y del volumen de la solución de metanol que se necesita para desorber la vitamina b12 de la resina del absorbedor (para el equipo de mezcla 4) y las relaciones geométricas entre el equipo y una turbina Rushton (Anexo 6) [28]. Dicho esto, la tabla 4.33 presenta los parámetros empleados y los resultados obtenidos.

Tabla 4.33: Parámetros y resultados del dimensionamiento de los equipos de mezcla.

Parámetro	Mixer 1	Mixer 2	Mixer 3	Mixer 4
Volumen de mezcla (m ³)	15.774	17.7995	31.573	7.44
Volumen del equipo (m ³)	18	18	35	8
Diámetro del equipo (m)	2.84	2.84	3.545	2.16
Área del equipo (m ²)	31.67	31.67	49.35	18.32
Altura del equipo (m)	2.84	2.84	3.545	2.16
Tipo de agitador	Turbina Rushton			
Velocidad de giro (rpm)	210			
Potencia del agitador (kW)	232.014	232.014	701.838	54.777
Diámetro del agitador (m)	0.9374	0.9374	1.17	0.715
Ancho de la paleta (m)	0.187	0.187	0.23399	0.143
Longitud de la paleta (m)	0.234	0.234	0.292	0.18
Distancia entre la base y el agitador (m)	0.937	0.937	1.16997	0.715
Ancho de bafles (m)	0.284	0.284	0.3545	0.217
Número de bafles	4			

4.5.4. Tanques de almacenamiento

Para el dimensionamiento de los tanques de almacenamiento, se tomó como punto de partida el volumen de la solución, para luego hallar el área, el diámetro y la altura del equipo considerando que la relación D y H es de $D/H = 0.5$ [38]. En tal sentido, la tabla 4.34 presenta los parámetros empleados y los resultados obtenidos.

Tabla 4.34: Parámetros y resultados del dimensionamiento de los tanques de almacenamiento.

Parámetro	Tanque 1	Tanque 2	Tanque 3	Tanque 4
Volumen de mezcla (m3)	32.4486	11.728	8.183	0.745
Volumen del equipo (m3)	35	15	10	1
Área del equipo (m2)	39.057	22.167	16.97	3.66
Altura del equipo (m)	4.46	3.36	2.94	1.366
Diámetro del equipo (m)	2.23	1.68	1.47	0.683

4.5.5. Centrífugas

El dimensionamiento de las centrífugas requiere de una adecuada capacidad y se verificó en la compañía thermo fisher, centrífugas para bioprocesos de uso industrial para proteínas, considerando que en bibliografía del libro o Doran mencionaba que que requería de centrífugas con un RCF mayor a 10000x de la gravedad. En tal sentido, las tablas 4.35 y 4.36 muestran los resultados de los cálculos:

Tabla 4.35: Dimensionamiento de la primera centrífuga.

Parámetro	Especificaciones	Referencia
Serie	Sorvall CC40 Series	[91]
Capacidad (m3)	1.47	Calculado
Tiempo de operación	6	Determinado
Velocidad máxima (rpm)	40,000rpm	[91]

Tabla 4.36: Dimensionamiento de la segunda centrífuga.

Parámetro	Especificaciones	Referencia
Serie	Sorvall CC40 Series	[91]
Capacidad (m3)	0.73	Calculado
Tiempo de operación	4	Determinado
Velocidad máxima (rpm)	40,000rpm	[91]

4.5.6. Molino de bolas

Para seleccionar los parámetros de dimensionamiento este equipo, se identificó que el molino más adecuado a emplear es el Dyno mill - KD25, debido a que, según el estudio realizado por Chisti y Moo - Young (1986) en donde comparan los rendimientos de un Dyno-Mill, un Netzsch LME 20 mill y un homogeneizador Manton-Gaulin para la liberación de la materia intracelular de las bacterias; dan como resultado que el Dyno-Mill ofrece una liberación significativamente mejor [89]. En tal sentido, para el dimensionamiento se emplearon diversos catálogos, los cuales presentan un ajuste que cumple con el flujo empleado para esta operación y brindan mayores detalles acerca del equipo en cuestión. Dicho esto, a continuación la tabla 4.37 muestra los parámetros de dimensionamiento necesarios para este equipo.

Tabla 4.37: Parámetros del dimensionamiento del molino de bolas.

Parámetro	Valores	Referencia
Flujo másico de agua (kg/h)	1150	[90]
Potencia (kW)	27	[90]
Flujo másico del fluido (kg/h)	500	[90]
Tiempo de operación (h)	3.7	[Cálculo]
Diámetro de perlas (m)	0.4	[92] [93]
Velocidad de punta (m/s)	10	[92] [93]
Carga de volumen de perlas (%)	82	[93]
Volumen de contenedor de molienda (L)	25	[90]

4.5.7. Columna de adsorción

Para realizar el dimensionamiento de la columna de adsorción se emplea el método LUB [35], el cual se utiliza ampliamente para el diseño de lechos adsorbentes. Este modelo considera que la transferencia de masa es rápida y está dividida en dos secciones, la sección de equilibrio o saturación LES y la sección LUB longitud de lecho sin utilizar.

Adicionalmente, para desarrollar este modelo se requiere tener como base la curva de ruptura que se obtiene de las condiciones experimentales específicas, y la isoterma de adsorción [94]

Para iniciar con los cálculos, se desarrolló la ecuación del balance de materia y se halló masa acumulada hasta el tiempo de saturación.

$$\text{Velocidad de acumulación} = \text{Velocidad de entrada} + \text{Velocidad de salida} \quad (46)$$

$$\frac{dm_A}{dt} = F \times C_o - F \times C \quad (47)$$

$$\frac{dm_A}{dt} = F \times C_o \times \int_0^t \left(1 - \frac{C}{C_o}\right) \times dt \quad (48)$$

Donde:

- F: Flujo volumétrico de alimentación
- C_o : Concentración del soluto en la solución de alimentación a la entrada de la columna
- C: Concentración del soluto en la solución de alimentación a la salida de la columna
- m_A : Masa de soluto adsorbida

La ecuación anterior se desarrolla y surge la siguiente.

$$m_A^{sat} = F \times C_o \times t_{ruptura} \quad (49)$$

Donde:

- m_A^{sat} : Masa de soluto adsorbida hasta la saturación
- $t_{ruptura}$: tiempo de ruptura

En tal sentido, por medio de esta ecuación y los valores de los parámetros presentados en la tabla 4.38, se halló la masa de soluto que queremos remover de forma ideal a escala industrial.

Tabla 4.38: Parámetros para calcular la masa de soluto adsorbida en el tiempo de saturación. Adaptada de [95].

Parámetros	Valores	Referencias
Concentración de soluto a la entrada de la columna	0.74	[Cálculo]
Flujo volumétrico de la alimentación a escala (m ³ /h)	0.625	[28]
Tiempo de ruptura (h)	20	[28]
Masa de soluto adsorbida hasta la saturación (kg)	9.25	[Cálculo]

A continuación, se calculó la capacidad de adsorción de la resina hasta la saturación. Cabe recalcar, que el valor de este parámetro hallado a escala laboratorio es igual que el de a escala industrial. Por lo tanto, se emplearán los datos obtenidos de la experimentación a escala laboratorio de Ramos et al. (2004) para hallarlo [87]. En este sentido, por medio de la siguiente ecuación 67 y la tabla 4.39, se logra calcular este parámetro.

$$q_A^{sat} = \frac{m_A^{sat}}{m_s} = \frac{F \times C_o \times t_{ideal}}{m_s} \quad (50)$$

Donde:

- q_A^{sat} : Capacidad de adsorción de la resina
- m_s : Masa de la resina
- t_{ideal} : Tiempo de adsorción ideal

Tabla 4.39: Parámetros experimentales para el cálculo de la capacidad de adsorción de la resina.

Parámetros	Valor
Flujo volumétrico de la alimentación (m ³ /h)	0.00072
Concentración de soluto a la entrada de la columna	0.156
Tiempo de adsorción ideal (h)	24
Masa de resina (kg)	0.0345

Una vez hallado dicho parámetro y sabiendo el valor de la masa de soluto adsorbida hasta la saturación a escala industrial, se halló la masa de la resina a emplear en esta operación, usando la ecuación 67; la cual resulta ser 47.43 kg.

Posteriormente, se calcularon las longitudes de la columna a escala industrial con sólido completamente saturado (LES) y sin saturar (LUB), empleando las siguientes ecuaciones y parámetros presentados en la tabla 4.40.

$$LES = \frac{m_s}{\rho_{lecho} \times A_c} \quad (51)$$

Donde:

- ρ_{lecho} : Densidad de la resina
- A_c : Área de la columna

$$\frac{LUB_1}{LUB_2} = \frac{U_{s1}}{U_{s2}} \quad (52)$$

Donde:

- LUB_1 : Longitud de la columna con sólido sin saturar a escala industrial
- LUB_2 : Longitud de la columna con sólido sin saturar a escala laboratorio
- U_{s1} : Velocidad del fluido a través del lecho a escala industrial
- U_{s2} : Velocidad del fluido a través del lecho a escala laboratorio

Tabla 4.40: Parámetros para calcular las longitudes de la columna a escala industrial con sólido completamente saturado (LES) y sin saturar (LUB). Adaptada de [87]

Parámetros	Valores	Referencias
Densidad de la resina (kg/m ³)	710	[87]
Área de la columna (m ²)	0.125	[28]

Longitudes de la columna a escala industrial con sólido completamente saturado (LES) (m)	1.336	[Cálculo]
Longitud de la columna con sólido sin saturar a escala laboratorio (m)	0.155	[87]
Velocidad del fluido a través del lecho a escala industrial (m/h)	5	[Cálculo]
Velocidad del fluido a través del lecho a escala laboratorio (m/h)	2.29	[87]
Longitud de la columna con sólido sin saturar a escala industrial (LUB) (m)	0.011	[Cálculo]

De esta forma, se halló la altura de la columna, sumando los valores del LUB y el LES, la cual resulta ser 1.347 m.

Finalmente, a fin de hallar el tiempo de desorción de la vitamina b12, se tomó como base el dato del caudal másico del estudio de Bertholet et al. (2019), y junto a la cantidad de solución de metanol a emplear, se halló el tiempo de desorción, tal como se observa en la tabla 4.41 [28].

Tabla 4.41: Parámetros para el cálculo del tiempo de desorción.

Parámetros	Valor
Flujo másico de la solución (kg/min)	49.1
Masa de solvente para la desorción (kg)	6766.22
Tiempo de desorción (min)	138

Por último, en la tabla 4.42 se reordenan los parámetros importantes de dimensionamiento estimados y cálculos.

Tabla 4.42: Parámetros del dimensionamiento de la columna de adsorción.

Parámetros	Valores	Referencia
Tiempo de ruptura (h)	20	[28]
Masa de resina (kg)	118.6	[Calculado]

Área de la columna (m ²)	0.125	[28]
Cantidad de soluto adsorbida	0.07797	[Calculado]
Longitud de columna utilizada (m)	1.337	[Calculado]
Longitud de columna no utilizada (m)	0.0107	[Calculado]
Altura de la columna (m)	1.347	[Calculado]

4.5.8. Cristalizador

Para el dimensionamiento de esta unidad se encontró un sistema de cristalización que abarcara los equipos mencionados en las secciones anteriores (tanque de cristalización, condensador y tanque de almacenamiento) y se ajuste a las condiciones de la operación (0.15 atm y 49°C), considerando el factor de seguridad de 0.75 entre el volumen del líquido y el volumen del recipiente. En la tabla 4.43 se muestra el cristalizador adaptado para este proceso.

Tabla 4.43: Parámetros del dimensionamiento del cristalizador.

Parámetro		Referencia
Volumen del líquido (L)	7489	calculado
Tiempo de operación (h)	6	[38]
Presión de vacío (atm)	0.15	[38]
Fabricante	Geling (Shanghai) Environmental Technology	[96]
Modelo	GLFJ-10000	[96]
Vapor de calentamiento (Mpa)	0.1	[38]
Potencia del mixer (kW)	4	[96]

4.5.9. Secador

Por último, para dimensionar el secador se emplearon diversos catálogos, al igual que el molino de bolas, teniendo en cuenta el área de transferencia de calor sacado por cálculo (Anexo 7) y el flujo de alimentación con el que se trabaja. En vista de ello, el tipo de secador a emplear es un atomizador centrífugo de alta velocidad [95], el cual presenta los siguientes parámetros de dimensionamiento vistos en la tabla 4.44.

Tabla 4.44: Parámetros del dimensionamiento del secador. Adaptado de [91]

Parámetros	Valores
Velocidad del atomizador (rpm)	18000
Diámetro del disco atomizador (mm)	150
Altura del cuerpo del secador (m)	7.5
Altura de elevación del atomizador (m)	10.5
Área de transferencia de calor (m ²)	0.409
Potencia eléctrica (kW)	99

4.6. Planificación del proceso (Scheduling)

Para realizar el scheduling del proceso, se enumeró la secuencia de operaciones considerando los tiempos de carga, operación, descarga, limpieza y esterilización de cada equipo. A partir de los balances de masa, energía y el dimensionamiento, y junto con un estimado del tiempo de descarga y limpieza [73], se determinó el tiempo de operación de cada equipo y se desarrolló la planificación para el proceso upstream. En tal sentido, la tabla 4.45 ordena los tiempos de los equipos en la etapa upstream y la figura 4.6 presenta el scheduling de este proceso, evidenciando la continuidad de los lotes.

Tabla 4.45: Tiempos para los equipos del proceso Upstream.

Equipo	Símbolo	Tiempo (h)	Color
Prefermentador 1	R - 101	96	Light Blue
Prefermentador 2	R - 102	96	
Mezclador 1	MX - 100	2	Yellow
Mezclador 2	MX - 101	2	
Equipo de calentamiento 1 (solución de glucosa)	E - 100	6	Green
Equipo de enfriamiento 1 (solución de glucosa)	E - 101	8	Red
Equipo de calentamiento 2 (solución fosfatada)	E - 102	6	Green
Equipo de enfriamiento 2 (solución fosfatada)	E - 103	8	Red
Mezclador 3	MX - 102	2	Yellow
Biorreactor	R - 100	144	Light Blue

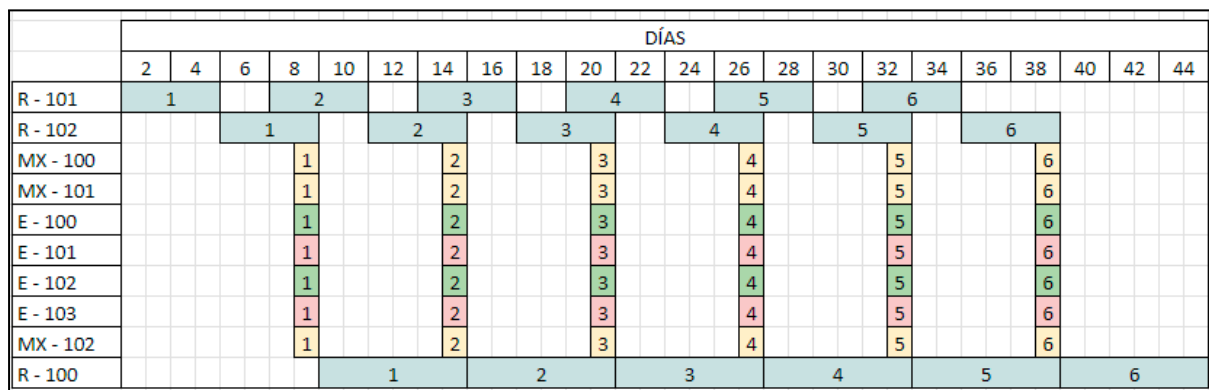


Figura 4.6. Scheduling proceso Upstream.

Como se puede observar en la figura 4.6, se tiene que para la producción del primer lote, se necesitan 14 días, esto es debido a que los tiempos de fermentación son extensos y requieren de días para realizarse (4 días para cada prefermentación y 6 días para la fermentación). Sin embargo, también se puede apreciar, que la producción del segundo lote comienza cuando acaba la primera prefermentación. Esto permite que la obtención del siguiente lote se de en el día 20 (6 días después de la obtención del primero), y que a partir de aquí los lotes siguientes

serán obtenidos 6 días después del anterior. Con ello, se pudo identificar que el cuello de botella que conlleva un mayor tiempo en el proceso upstream es el biorreactor debido a que el tiempo de reacción más su tiempo de limpieza equivale a 6 días. Por lo tanto, el proceso de fermentación sería importante de evaluar para futuros estudios, de manera que se consiga realizarlo en un menor tiempo.

Posteriormente se realizó el scheduling del proceso downstream, iniciando por la enumeración de la secuencia de equipos y terminando por el establecimiento de los tiempos de operación. Cabe resaltar, que los tiempos de limpieza y esterilización de los equipos son considerados dentro del tiempo de espera para la llegada del siguiente lote. Dicho esto, la tabla 4.46 ordena los tiempos de los equipos en la etapa downstream y la figura 4.7 muestra el scheduling de este proceso.

Tabla 4.46: Tiempos para los equipos del proceso Downstream.

Equipo	Símbolo	Tiempo (h)	Color
Centrífuga 1	CEN - 100	7	Light Purple
Molino de bolas	M - 100	4	Orange
Centrífuga 2	CEN - 101	7	Light Purple
Columna de adsorción	A - 100	23	Light Purple
Cristalizador	C - 100	6	Blue
Secador por atomización	F - 100	5	Yellow

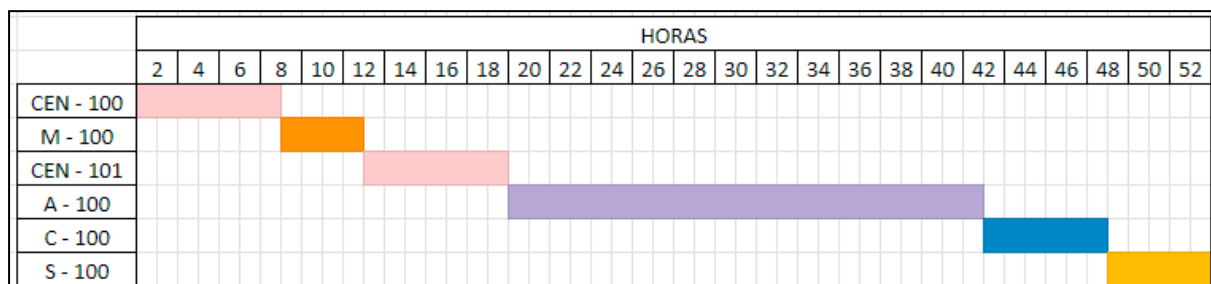


Figura 4.7. Scheduling proceso Downstream.

De acuerdo a lo visto en la figura 4.7, se tiene que el proceso downstream demora 2 días con 4 horas en realizarse, un tiempo muy corto a lo visto en el proceso upstream. En tal sentido,

se puede afirmar que el proceso downstream tiene un tiempo de 3 días y 20 horas para volver a ser empleado, tiempo en el cual se realiza la limpieza y esterilización de los equipos. Por lo tanto, teniendo los tiempos definidos, se puede confirmar que el tiempo en el que se obtiene el primer lote es de 16 días con 4 horas. Sin embargo, los siguientes lotes serán obtenidos 6 días después del primero.

4.7. Evaluación económica del proceso

4.7.1. CAPEX

Para comenzar el cálculo de la inversión de capital, primero se halló el costo de compra e instalación de los equipos del proceso. Para calcular dicho costo, se emplearon las correlaciones del libro “Chemical Engineering Design” (Anexo 9) [78] en la gran mayoría de equipos, mientras que en el resto, se buscó su precio en catálogos. En tal sentido, la tabla 4.47 presenta el costo de cada equipo.

Tabla 4.47: Costo de compra e instalación de los equipos.

Equipo	Cantidad	Unidad	Capacidad	Costo unitario (\$)	Referencia
MX - 100	1	L/s	2.19078	2171.125	[78]
MX - 101	1	L/s	2.19078	2171.125	[78]
MX - 102	1	L/s	4.385	2683.361	[78]
MX - 103	1	L/s	1.03	1753.916	[78]
E - 100	1	m2	1.183	4857.5	[78]
E - 102	1	m2	1.219	4948.25	[78]
E - 101	1	m2	1.211	4928	[78]
E - 103	1	m2	1.224	4960	[78]
P - 100	1	kW	1	1000	[78]
P - 101	1	kW	1	1000	[78]

R - 100	1	-	-	4500	[97]
R - 101	1	m3	0.65	84525.76	[78]
R - 102	1	m3	35	620147.42	[78]
T - 100	1	m3	35	25073.812	[78]
T - 101	1	m3	15	16450.84	[78]
T - 102	1	m3	10	13818.996	[78]
T - 103	1	-	-	2100	[98]
CEN - 100	1	kW	15	67937.89	[78]
CEN - 101	1	kW	5	45278.38	[78]
M - 100	1	ton/h	0.7	186823.72	[78]
A - 100	2	-	-	6400	[99]
A - 100 (Bomba)	2	kW	1	2000	[78]
C - 100	1	m	7	72611.25	[78]
F - 100	1	kg/h	136.41	989829	[78]
TOTAL				2170763.178	

Sabiendo que el costo de los equipos es \$2 170 763.178, se halló el costo total de los ISBL, el cual resultó ser \$6 144 929.613. Para este cálculo se usaron los factores de la tabla 4.48 y la ecuación brindada por el libro “Chemical Engineering Design” [78].

$$C = \sum_{i=1}^{i=M} C_{e,i,CS} [(1 + f_p) + (f_{er} + f_{el} + f_i + f_c + f_s + f_l)/f_m] \quad (53)$$

Tabla 4.48: Factores para el cálculo de los ISBL. Adaptada de [78].

Componente	Factor	Valores (\$M)
Tubería (fp)	0.6	1.302
Montaje de equipos (fer)	0.5	1.085
Eléctrico (fel)	0.2	0.434
Instrumentación y control (fi)	0.3	0.651
Trabajo civil (fc)	0.3	0.651
Estructuras y edificios (fs)	0.2	0.434
Revestimiento y pintura (fl)	0.1	0.217
Material “exótico” (fm)	1.3	-
ISBL		6.145

Luego, se determinaron los OSBL, los costos de ingeniería y construcción, y los cargos de contingencia, a partir de los ISBL y considerando sus factores colocados en la tabla 4.49 [78].

Tabla 4.49: Factores para el cálculo de los OSBL, costos de ingeniería y construcción y cargos de contingencia.

Componente	Factor	Valores (\$M)
Offsites (OS)	0.4	2.458
Design and engineering (D&E)	0.25	1.536
Contingency (X)	0.1	0.614

Posteriormente, se calculó el costo total de capital fijo, sumando de los ISBL, OSBL, costos de ingeniería y construcción, y los cargos de contingencia, el cual dio como resultado un monto de \$10 753626,82.

A continuación, se halló el capital de trabajo sabiendo que este equivale al 15% del CAPEX [79], para finalmente sumar este valor y el anteriormente hallado y así obtener el valor del CAPEX. En tal sentido, la tabla 4.50 muestra los resultados de dichos valores.

Tabla 4.50: Resultado del capital de trabajo y el CAPEX.

Componente	Valores (\$M)
Capital de trabajo	2.688
CAPEX	13,44

4.7.2. OPEX

Para el desarrollo del cálculo de los costos de operación, se determinaron los costos variables de producción, los cuales se encuentran descritos en el Anexo 10. En tal sentido, la tabla 4.51 reúne los costos por materias primas, utilidades, consumibles y disposición de efluentes.

Tabla 4.51: Costos variables.

Costo variable	Precio (\$/lote)	Total (\$/año)
Materias primas	11484.08	585687.99
Utilidades	12359.37	630327.7
Consumibles	364.922	18611.001
Disposición de efluentes	49.014	2548.719
TOTAL	24257.38	1237175.41

Una vez hallado el total de los costos variables, se calcularon los costos de manufactura y los gastos generales (Anexo 11) para así hallar el valor del OPEX. En vista de ello, la tabla 4.52 enseña los valores de estos costos y del OPEX.

Tabla 4.52: Costos directos, cargos fijos, costos generales y gastos generales. .

Costos	Componentes	Total (\$/año)
Costos de manufactura	Costos directos de producción	2901586.21
	Cargos fijos	453656.1
	Costos generales de la planta	409981.6

	Costos administrativos	175706.4
	Costos de distribución y venta	175706.4
Gastos generales	Costos de investigación y desarrollo	620000
	Financiamiento	108916.99
OPEX		4845553.7

4.7.3. Flujo de caja

Considerando que la planta opera 335 días al año, y que el primer lote sale a los 16 días con 4 horas y el resto cada 6 días, se estimó un total de 51 lotes producidos al año para una cantidad de 1.163 kg de vitamina b12 por lote. En tal sentido, dado que se desconoce el porcentaje del total importado de vitamina b12 destinado para el consumo humano, se tomará en cuenta el precio de venta de los laboratorios que producen esta vitamina. Es así como, de acuerdo a los valores mostrados anteriormente, se establece que el rango de precios presentados por las empresas farmacéuticas es de 1000 - 100 \$/g, por lo que se tomará un valor de venta de 130 \$ por gramo para la vitamina producida en este proceso [100]. Cabe resaltar, que el precio establecido es atractivo para el consumidor dado que es cercano al valor mínimo (100 \$/g), generando así que sea más ventajosa su producción local que la compra de esta vitamina en empresas extranjeras.

En este sentido, al año se tendrá un total de 59.313 kg de vitamina b12 con un ingreso de \$M 7.7 por la venta de esta vitamina. En este contexto, la tabla 4.53 muestra los resultados de la ganancia bruta anual para cada año que dura el proyecto (20 años [79]). Cabe resaltar, que el CAPEX y el CCOP (Costos de producción en efectivo) fueron hallados anteriormente, en las secciones de CAPEX y OPEX.

Tabla 4.53: Resultados de la ganancia bruta anual.

Año	Ingresos (\$M)	CAPEX (\$M)	CCOP (\$M)	Ganancia bruta (\$M)
1	0	6,5	0	0
2	0	4.3	0	0
3	3.9	2.7	3.3	0.5

4	7.7	0	4	3.7
5	7.7	0	4	3.7
6	7.7	0	4	3.7
7	7.7	0	4	3.7
8	7.7	0	4	3.7
9	7.7	0	4	3.7
10	7.7	0	4	3.7
11	7.7	0	4	3.7
12	7.7	0	4	3.7
13	7.7	0	4	3.7
14	7.7	0	4	3.7
15	7.7	0	4	3.7
16	7.7	0	4	3.7
17	7.7	0	4	3.7
18	7.7	0	4	3.7
19	7.7	0	4	3.7
20	7.7	0	4	3.7

En tal sentido, el flujo de caja se calculó a partir de la ganancia bruta; la depreciación, por medio del ratio de deuda y el costo total de capital fijo; el ingreso imponible, que se consigue restando la ganancia bruta y la depreciación; y los impuestos pagados, que se calculan multiplicando los ingresos imponibles por el impuesto a la renta para este tipo de procesos (26% [101]). Dicho esto, la tabla 4.54 presenta el flujo de efectivo de cada uno de los años proyectados.

Tabla 4.54: Resultados de la ganancia bruta anual - Flujo de caja.

Año	Ganancia bruta (\$M)	Depreciación (\$M)	Ingreso imponible (\$M)	Impuestos pagados (\$M)	Flujo de caja (\$M)
1	0	0	0	0	-6,5
2	0	0	0	0	-4.3
3	0.5	1.1	-0.5	0	-2.1
4	3.7	2.2	1.6	-0.1	3.9

5	3.7	2.2	1.6	0.4	3.3
6	3.7	2.2	1.6	0.4	3.3
7	3.7	2.2	1.6	0.4	3.3
8	3.7	2.2	1.6	0.4	3.3
9	3.7	2.2	1.6	0.4	3.3
10	3.7	2.2	1.6	0.4	3.3
11	3.7	2.3	1.6	0.4	3.3
12	3.7	2.2	1.6	0.4	3.3
13	3.7	2.2	1.6	0.4	3.3
14	3.7	1.1	2.7	0.4	3.3
15	3.7	0	3.7	0.7	3.1
16	3.7	0	3.7	1	2.8
17	3.7	0	3.7	1	2.8
18	3.7	0	3.7	1	2.8
19	3.7	0	3.7	1	2.8
20	3.7	0	3.7	1	2.8

Si bien el flujo de efectivo disminuye con el paso de los años (debido al aumento de los impuestos pagados), se mantiene positivo durante el periodo proyectado. Asimismo, se puede ver que para el año 15 los cargos por depreciación ya no afectarán a los ingresos imponibles y al flujo de caja, ya que todos los activos estarían depreciados. Sin embargo, los impuestos pagados aumentarán generando que el flujo de caja disminuya, como se mencionó anteriormente.

4.7.4. Indicadores de rentabilidad

En este inciso se desarrolló cálculo del VAN y el TIR para determinar si la propuesta a implementar es viable económicamente. En este sentido, se halló el valor actual neto (VAN) y la tasa interna de retorno (TIR) para el tiempo proyectado, los cuales dieron como resultado 12.4 millones de dólares y 19.5%, respectivamente (Anexo 12). El tener un VAN positivo y un TIR mayor que la tasa de descuento (12%), indican que el proyecto es rentable [78].

4.7.5. Análisis de sensibilidad

Por último, se evaluó la sensibilidad del VAN proyectado con respecto al precio de venta de la vitamina b12, el precio de materias primas, el gasto de utilidades, los ISBL y los OSBL. Dicho esto, la figura 4.8 muestra el efecto sobre el VAN de estos parámetros.

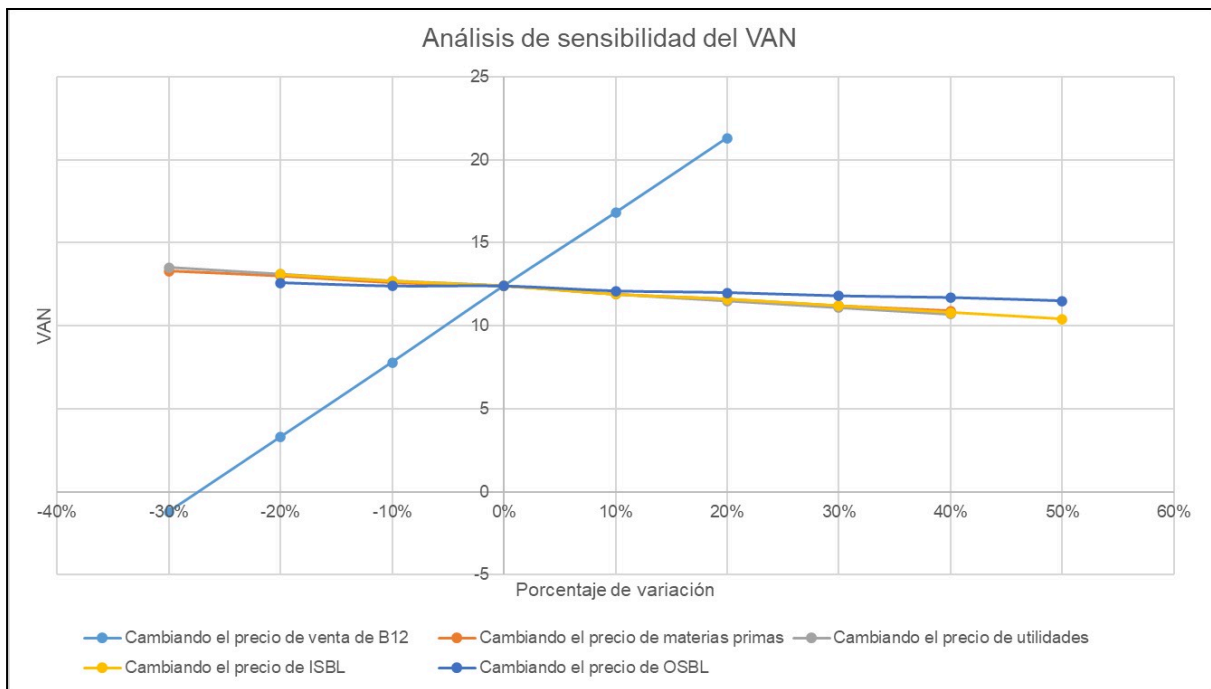


Figura 4.8. Análisis de sensibilidad del VAN con respecto al precio de venta, el gasto por materias primas, el gasto por utilidades, y los costos de ISBL y OSBL.

El efecto de variar el precio de venta de la vitamina b12 sobre el VAN proyectado es el mayor efecto dentro de todos los factores evaluados. Esto revela que el precio del producto a obtener tiene un efecto crítico en el VAN proyectado, ya que si el precio se redujese más produciría un VAN negativo. Por lo tanto, el precio de esta vitamina debería ser una preocupación para los inversores potenciales.

Por otro lado, otro de los efectos que ha tenido gran influencia en esta evaluación es la variación de los ISBL. Como se aprecia, al aumentar ligeramente el porcentaje de variación se reduce el VAN proyectado a diferencia del resto de parámetros (exceptuando el precio de la vitamina b12). Esto surge debido a que uno de los mayores costos a enfrentar dentro del proyecto es el proporcionado por los ISBL. Sin embargo, para que el VAN llegue a ser nulo,

el porcentaje de variación tendría que ser mucho más grande. Por tanto, este parámetro es tenido en cuenta por los inversores potenciales, pero no es un factor tan alarmante a comparación del precio de venta de la vitamina b12.

Por último, los efectos generados por el resto de parámetros (OSBL, materias primas y utilidades) presentan una ligera variación sobre el VAN proyectado. En tal sentido, para que este índice de rentabilidad sea nulo el porcentaje de variación tendría que ser exorbitantemente alto. En conclusión, estos parámetros no son muy considerados por los inversores potenciales, ya que sus variaciones no generan grandes cambios dentro del proyecto.

4.8. E-Factor

Para el cálculo del factor medioambiental E-factor se cuantifican todas las corrientes de residuos, como el caldo de fermentación gastado, CO₂, biomasa sólida y líquida, los subproductos como ácidos propiónico, acético y succínico, así como el metanol de la etapa de desorción. Todas estas corrientes fueron sumadas y reemplazadas en la ecuación 24 para el cálculo de este parámetro.

$$\begin{aligned}
 E - factor &= \frac{\text{masa de residuos totales (kg)}}{\text{masa de producto (kg)}} && (54) \\
 &= \frac{\Sigma \text{Corriente (4,9,34,37,42,52,60)}}{\text{corriente 57}} \\
 E - factor &= 26215
 \end{aligned}$$

Tal y como se observa, el valor calculado resulta ser mayor al dato de E-Factor destinado a las industrias farmacéuticas, el cual debe encontrarse entre 25 - 100 para un rango de 10 - 10³ toneladas producidas por año [102]. Sin embargo, el valor calculado es típico en procesos que generan grandes cantidades de residuos en comparación con el producto final. Esto se debe a que el producto, al ser destinado para consumo humano, requiere de una pureza superior al 98%, generando un proceso complejo que emplea múltiples etapas de separación y purificación en donde la cantidad de residuos generados es elevada. En tal sentido, se proponen algunos procedimientos adicionales que permitan disminuir la cantidad de residuos generados para así minimizar el valor calculado anteriormente.

En este contexto, se identificó una gran cantidad de masa residual proveniente del consumo de agua, la cual representa el 90.7% del total de sustancias desperdiciadas del proceso. Por lo tanto, se propone para un futuro trabajo, emplear tecnologías de separación y purificación para recircular el agua. Tales como ósmosis inversa, una operación que presenta un porcentaje de purificación de 75 - 99% [103]. Asimismo, se pueden emplear biorreactores de membrana que garantizan una separación de hasta un 90% de sólidos disueltos [104].

Por otra parte, será crucial evaluar la comercialización de los subproductos generados en la fermentación. En tal sentido, de acuerdo a lo visto en la sección de Revisión Crítica, es posible separar el ácido propiónico durante el proceso de fermentación. Sin embargo, el método empleado para realizar esta acción requiere un mayor gasto, debido a la implementación de columnas de separación en el arreglo del biorreactor, e implica un debido cuidado al transitar las bacterias por dichas columnas. En vista de ello, Borrero (2010) propone la separación de dichos ácidos por medio de una operación de extracción líquido-líquido, la cual se basa en la distribución de uno o varios solutos entre la fase acuosa y orgánica cuando estas se encuentran en contacto [105].

Adicionalmente, recuperar estos subproductos, implicaría un ingreso extra para el proceso. En tal sentido, el valor comercial reportado de los ácidos propiónico, acético y succínico es de 1.9 \$/kg, 1.1 \$/kg y 30 \$/kg, respectivamente[106][107][108]. Por lo que, multiplicando y sumando dichos valores con la cantidad de ácidos obtenida por cada lote, se alcanza una ganancia de 6200 \$ aproximadamente. Teniendo en cuenta dicha información, sería de gran interés evaluar para un futuro trabajo, si la implementación de estas operaciones para la obtención de estos subproductos es viable económica.

Con estas variaciones se garantizaría la obtención de un valor menor de E-factor (1623) haciendo el proceso más sostenible.

4.9. Análisis de riesgos

Es importante considerar factores que pueden alterar el buen funcionamiento de los equipos, así como las potenciales fallas que pueden ocurrir, ya sea por un exceso de flujo, un inadecuado intercambio de calor, una sobrepresión, entre otros. Por esto, se utilizó la matriz de análisis de modos y efectos de falla que detalla, tanto el modo de falla, como la acción/control tomado para evitar estos escenarios. En esta se califica la severidad del efecto de falla, la probabilidad que esta ocurra y la detectabilidad que puede tener esta potencial falla donde 1 es la calificación ideal, hasta llegar a 10; estos tres valores se multiplican dando el número de prioridad de riesgo (RPN) de cada equipo que mientras más alto sea, tiene que ser tratado con mayor prioridad y que al tomar una acción o control de diseño este número tiene que decrecer. En tal sentido, la tabla 4.55 presenta esta matriz para el análisis de modos y efectos de falla.

Tabla 4.55: Matriz de Análisis de modos y efectos de falla (FMEA). Adaptada de [99]

Item	Modo potencial de falla	Efecto potencial de falla	Sev	Mecanismo potencial de falla	Prob	Controles de diseño actuales	Det	RPN	Acciones recomendadas	Responsable	Resultados de la acción			
											Acciones tomadas	Sev	Prob	Det
Mezcladores - tanques	Exceder el volumen requerido	Desbordar	10	Exceso de caudal	7	Vista de los operadores	8	560	Sensor de alto nivel, que envíe señal a un controlador para que cierre la válvula	Operador	Sensor de alto nivel, que envíe señal a un controlador para que cierre la válvula			
	Poco volumen	Cavitación	6	Poco o nulo caudal	6	Sensor de presión	4	144	Sensor de bajo nivel que envíe señal al controlador de nivel para apagar la bomba	Operador	Sensor de bajo nivel que envíe señal al controlador de nivel para apagar la bomba			
Bomba														

	Fluido de trabajo vapor	Cavitación	6	Aumento de presión	7	Sensor de presión	6	252	Sensor de presión que mande señal al controlador para apagar la bomba	Operador	Sensor de presión que mande señal al controlador para apagar la bomba	3	3	1	9
Intercambiador de calor	Menor temperatura	Inadecuada esterilización	4	Poco flujo de agua de calentamiento	6	Sensor de temperatura	5	120	Sensor de temperatura que envíe una señal al controlador de temperatura que abra la válvula de agua de calentamiento	Operador	Sensor de temperatura que envíe una señal al controlador de temperatura que abra la válvula de agua de calentamiento	3	2	2	12
	Mayor temperatura	Deterioro de las corrientes	6	Exceso de flujo de agua de calentamiento	7	Sensor de temperatura	4	168	Sensor de temperatura que envíe una señal al controlador de temperatura que cierre la válvula de agua de calentamiento	Operador	Sensor de temperatura que envíe una señal al controlador de temperatura que cierre la válvula de agua de calentamiento	3	2	2	12
Intercambiadores de calor (Enfriamiento)	Menor temperatura	Inadecuada fermentación	4	Exceso de flujo de agua de enfriamiento	7	Sensor de temperatura	6	168	Sensor de temperatura que envíe una señal al controlador de temperatura que cierre la válvula de agua de enfriamiento	Operador	Sensor de temperatura que envíe una señal al controlador de temperatura que cierre la válvula de agua de enfriamiento	3	2	2	12
	Mayor temperatura	Deterioro en la fermentación	6	Propio de la fermentación, poca agua de enfriamiento	6	Sensor de temperatura	5	180	Sensor de temperatura que envíe una señal al controlador de temperatura que abra la válvula de agua de enfriamiento	Operador	Sensor de temperatura que envíe una señal al controlador de temperatura que abra la válvula de agua de enfriamiento	3	2	2	12

Reactor	Exceso de presión	Detonar el reactor	10	Sobre presión	5	Sensor de presión	6	300	Si se excede la presión requerida, se apertura la válvula de alivio, expulsando CO2	Operador	Si se excede la presión requerida, se apertura la válvula de alivio, expulsando CO2	5	4	3	60
	Menor temperatura	Inadecuada fermentación	4	Exceso de flujo de agua de enfriamiento	7	Sensor de temperatura	6	168	Sensor de temperatura que envíe una señal al controlador de temperatura que cierre la válvula de agua de enfriamiento	Operador	Sensor de temperatura que envíe una señal al controlador de temperatura que cierre la válvula de agua de enfriamiento	3	2	2	12
	Mayor temperatura	Deterioro en la fermentación	6	Propio de la fermentación, poca agua de enfriamiento	5	Sensor de temperatura	5	150	Sensor de temperatura que envíe una señal al controlador de temperatura que abra la válvula de agua de enfriamiento	Operador	Sensor de temperatura que envíe una señal al controlador de temperatura que abra la válvula de agua de enfriamiento	3	2	2	12
Molino de Bolas	Falla en la eficiencia del intercambiador de calor	Exceso de temperatura	9	Poco flujo de agua de enfriamiento	4	Sensor de temperatura	4	144	Sensor de temperatura que envíe una señal al controlador de temperatura que cierre la válvula de agua de calentamiento	Operador	Sensor de temperatura que envíe una señal al controlador de temperatura que cierre la válvula de agua de calentamiento	3	2	2	12
	Descalibración interna	Ruidos anormales	9	Falta de mantenimiento	6	Revisiones periódicas	7	378	Programación de mantenimiento preventivo de ejes	Encargado de mantenimiento	Programación de mantenimiento preventivo de ejes	7	4	5	140
Adsorción/Desorción	Saturación/desgaste del empaque	Poca o nula adsorción	4	Falta de limpieza de la columna	6	Revisiones periódicas	8	192	Limpieza y/o reemplazo del empaque programada	Encargado de mantenimiento	Limpieza y/o reemplazo del empaque programada	3	2	3	18

	Exceso de suministro de metanol	Producto final diluido	4	Exceso de líquido de desorción	4	sensor de alto nivel	4	64	sensor de alto nivel, que envíe señal a un controlador que cierre la válvula	Operador	sensor de alto nivel, que envíe señal a un controlador que cierre la válvula	4	4	4	64
Cristalizador	Exceso de presión	Detonar el cristalizador	10	Sobre Presión	5	Sensor de presión	4	200	Si se excede la presión requerida, se apertura la válvula de alivio para que salga más metanol	Operador	Si se excede la presión requerida, se apertura la válvula de alivio para que salga más metanol	5	3	3	45
	Menor temperatura	Inadecuada/nula evaporación	4	Exceso de flujo de agua de enfriamiento	5	Válvula	8	160	Sensor de temperatura que envíe una señal al controlador de temperatura que cierre la válvula de agua de enfriamiento	Operador	Sensor de temperatura que envíe una señal al controlador de temperatura que cierre la válvula de agua de enfriamiento	3	2	2	12
	Mayor temperatura	Deterioro de la vitamina b12	4	Consecuencia de la evaporación, poca agua de enfriamiento	4	Sensor de temperatura	4	64	Sensor de temperatura que envíe una señal al controlador de temperatura que abra la válvula de agua de enfriamiento	Operador	Sensor de temperatura que envíe una señal al controlador de temperatura que abra la válvula de agua de enfriamiento	3	2	2	12
Secador	Temperatura de aire de salida muy baja	Producto muy húmedo	4	Mala transferencia de masa	4	Sensor de temperatura	4	64	Sensor de temperatura que envíe una señal al controlador de temperatura que abra la válvula de aire	Operador	Sensor de temperatura que envíe una señal al controlador de temperatura que abra la válvula de aire	3	2	3	18
	Desajuste de eje rotatorio	Ruido y/o vibración en el equipo	9	Falta de mantenimiento	5	Revisiones periódicas	3	135	Programación de mantenimiento preventivo de ejes	Encargado de mantenimiento	Programación de mantenimiento preventivo de ejes	4	3	3	36

CONCLUSIONES

- Se diseñó el proceso para la producción de vitamina b12 por *Propionibacterium freudenreichii* en Perú vía anaerobia, reconociendo las secciones del proceso y plasmando cada etapa en un diagrama de flujo de procesos (PFD).
- Se halló la capacidad productiva del proceso (75.86 kg de vitamina b12 al año), teniendo en cuenta el mercado de esta vitamina en otros países y la demanda de esta vitamina para consumo humano en el Perú.
- Considerando los datos cinéticos de la fermentación por lotes del estudio realizado por Wang et al. (2014) y tomando como punto de partida satisfacer el 1.5% de la demanda anual peruana de vitamina b12, se realizó el balance de masa, obteniendo una producción de 1.36 kg/lote de vitamina b12 a la salida del biorreactor. De igual forma, por medio del balance de energía se halló el gasto energético total para el proceso upstream, siendo este 2171 kW, valor que se encuentra dentro del rango del consumo energético de industrias biotecnológicas. Asimismo, se determinó que el equipo que presenta un mayor consumo energético es el biorreactor. En cuanto al dimensionamiento se logró hallar la geometría de todos los equipos (altura, área, diámetro, volumen) y sus especificaciones respectivas (área de intercambio de calor, geometría del agitador, entre otros).
- Se realizó el balance de masa, obteniendo una producción de 1.163 kg de vitamina b12 por lote, con una pureza del 98%. Asimismo, se logró calcular el rendimiento global del proceso, el cual resultó ser 85.6%. De igual forma, por medio del balance de energía se halló el gasto energético total para el proceso downstream, siendo este 975 kW. Adicionalmente, se determinó que el equipo que posee un mayor consumo energético es el secador por atomización. En cuanto al dimensionamiento se logró hallar la geometría de todos los equipos (altura, área, diámetro, volumen) y sus especificaciones respectivas (área de intercambio de calor, área de la membrana, diámetro de perlas, masa de resina, diámetro del disco atomizador, entre otros).
- Se determinó que el costo de inversión (CAPEX) y el costo de producción (OPEX) son \$M 13.44 y \$M 4.8, respectivamente. Asimismo, el análisis económico del proceso reveló que para una proyección de 20 años en la que se procesan 51 lotes por año, el valor presente neto del proyecto (VAN) es de \$M 12.4 y la tasa interna de

retorno (TIR) es de 19.5 %. Además, se realizó un análisis de sensibilidad, en donde se evidencia el impacto que generan las variables de precio de venta, materias primas, ISBL, OSBL y utilidades sobre la rentabilidad del proyecto; siendo el precio de venta de la vitamina b12 la variable más crítica a considerar para futuros inversores.

- Se efectuó el cálculo del factor medioambiental teniendo en cuenta las corrientes de residuos (caldo de fermentación gastado, CO₂, biomasa sólida y líquida, solución de metanol y los subproductos), obteniendo un valor de 26215 debido a la alta pureza requerida para la producción de vitamina b12 para el consumo humano. Para mejorar este factor, se proponen tecnologías para recircular el agua que es nuestro mayor residuo y la comercialización de los subproductos (ácidos propiónico, acético y succínico). Aplicando estas mejoras el E-factor disminuye considerablemente hasta 1623.
- Se logró realizar el análisis de seguridad por medio de los potenciales modos de falla de los equipos y las posibles acciones de prevención, mantenimiento y/o control. Asimismo, se evidenció que los equipos auxiliares, los intercambiadores de calor y biorreactores, deben tener implementando sensores de presión, temperatura y nivel, para controlar y evitar cualquier potencial de falla. De igual forma, el análisis de seguridad reflejó la necesidad de añadir un mantenimiento a los equipos para garantizar una baja prioridad de riesgo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] C. Bernhardt, X. Zhu, D. Schütz, M. Fischer, y B. Bisping, “Cobalamin is produced by *Acetobacter pasteurianus* DSM 3509,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 103, no. 9, pp. 3875–3885, 2019.
- [2] F. Watanabe y E. Miyamoto, “TLC SEPARATION AND ANALYSIS OF VITAMIN b12 AND RELATED COMPOUNDS IN FOOD,” *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, vol. 25, no. 10-11, pp. 1561–1577, 2002.
- [3] O. Torres y C. Zea, "Factores que intervienen en la decisión de compra para el consumo de comida vegana en el subsector de restaurantes", Trabajo de investigación para obtener el grado académico de Bachiller en Gestión, PUCP, Lima, 2020.
- [4] M. Forrellat, I. Gómis y H. Gautier, “Vitamina b12 metabolismo y aspectos clínicos de su deficiencia”, *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*, vol. 15, no. 3, pp. 159–74, 1999.
- [5] M. Rivas , "Factores de riesgo asociados a la deficiencia de vitamina b12 en la población adulto mayor por consultorio externo en el servicio de geriatría del Hospital Nacional Hipólito Unánue en periodo de enero - diciembre del 2016 ", Trabajo de investigación para título profesional de médico cirujano, URP, Lima, 2018.
- [6] E. Gonzales, L. Huamán-Espino, C. Gutiérrez, J. Aparco y J. Pillaca, “Caracterización de la anemia en niños menores de cinco años de zonas urbanas de Huancavelica y Ucayali en el Perú”, *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, vol. 32, no. 3, pp. 431-439, 2015.
- [7] “Peru Vitamins; vitamin b12 and its derivatives, unmixed imports by country,” *World Integrated Trade Solution | 2021 | Data*. [Online]. Disponible: <https://wits.worldbank.org/trade/comtrade/en/country/PER/year/2021/tradeflow/Imports/partner/ALL/product/293626>.
- [8] “Comercio exterior en los últimos 5 años 293626:vitamina b12 y sus derivados” *Veritrade*. [Online]. Disponible: <https://www.veritradecorp.com/es/Peru/importaciones-y-exportaciones/vitamina-b12-y-sus-derivados/293626>.
- [9] R. Biedendieck, M. Malten, H. Barg, B. Bunk, J.-H. Martens, E. Deery, H. Leech, M. J. Warren, y D. Jahn, “Metabolic engineering of cobalamin (vitamin b12)”, *Microbial Biotechnology*, vol. 3, no. 1, pp. 24–37, 2009.

- [10] K.-T. Li, J. Zhou, X. Cheng, y S.-J. Wei, “Study on the dissolved oxygen control strategy in large-scale vitamin b12 fermentation by *Pseudomonas denitrificans*,” *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, vol. 87, no. 12, pp. 1648–1653, 2012.
- [11] L. Balabanova, L. Averianova, M. Marchenok, O. Son, and L. Tekutyeva, “Microbial and Genetic Resources for Cobalamin (Vitamin b12) Biosynthesis: From Ecosystems to Industrial Biotechnology,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 9, p. 4522, 2021.
- [12] Z. Kang, J. Zhang, J. Zhou, Q. Qi, G. Du, and J. Chen, “Recent advances in microbial production of δ -aminolevulinic acid and vitamin b12,” *Biotechnology Advances*, vol. 30, no. 6, pp. 1533–1542, 2012.
- [13] Z. Wang, G. Xu, W. Du, Y. Zhang, Y. Wang, and Z. Su, “Efficient ex-situ biosynthesis of vitamin b12 by *Propionibacterium freudenreichii* using membrane separation coupling technology”, *Biochemical Engineering Journal*, vol. 161, pp. 107688, 2020.
- [14] A. Gómez, "Estudio de viabilidad de instalación de una planta de producción de vitamina b12 en España", Trabajo de Fin De Grado en Ingeniería Química, USAL, Salamanca, 2016.
- [15] D. Li1, H. Fang, Y. Gai, J. Zhao, P. Jiang, L. Wang, Q. Wei1, D. Yu1, D. Zhang, “Metabolic engineering and optimization of the fermentation medium for vitamin b12 production in *Escherichia coli*”, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, vol 43, pp. 1735-1745, 2020.
- [16] Z.-J. Wang, H.-Y. Wang, Y.-L. Li, J. Chu, M.-Z. Huang, Y.-P. Zhuang, and S.-L. Zhang, “Improved vitamin b12 production by step-wise reduction of oxygen uptake rate under dissolved oxygen limiting level during fermentation process,” *Bioresource Technology*, vol. 101, no. 8, pp. 2845–2852, 2010.
- [17] Sych, M.J.; Lacroix, C.; Stevens, M.J.A. Vitamin b12-physiology, production and application. In *Industrial Biotechnology of Vitamins, Biopigments, and Antioxidants*; Vandamme, E.J., Revuelta, J.L., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2016; pp. 129–159.
- [18] V. Bykhovskii, N.I. Zaitseva, A.A. Eliseev, Tetrapyrroles: diversity, biosynthesis, biotechnology, *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 34 (1998) 3–21.
- [19] P. Wang, Y. Jiao y S. Liu, “Novel fermentation process strengthening strategy for production of propionic acid and vitamin b12 by *Propionibacterium freudenreichii*”, *Ind Microbiol Biotechnol*, vol. 41, pp. 1811–1815, 2014.

- [20] M. F. Ali, E. A. B. M., and J. G. Speight, *Handbook of industrial chemistry: organic chemicals*. McGraw-Hill, 2005.
- [21] Y. Gao, and Y. Yuan, "Comprehensive Quality Evaluation of Corn Steep Liquor in 2-Keto-l-gulonic Acid Fermentation," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 59, pp. 18, July 2011.
- [22] K.T. Li, D.H.Liu, J. Chu, Y.H. Wang, Y.P. Zhuang, y S.L. Zhang, "An effective and simplified pH-stat control strategy for the industrial fermentation of vitamin b12 by *Pseudomonas denitrificans*". *Bioprocess and Biosystems Engineering*, vol.31, no. 6, pp. 605–610, Marzo 2008.
- [23] Y. Z. Piao, M. Yamashita, N. Kawaraichi, R. Asegawa, H. Ono, Y. Murooka, Production of vitamin b12 in genetically engineered *Propionibacterium freudenreichii*, *J. Biosci. Bioeng.* 98 (2004) 167–173.
- [24] P. Wang, Y. Wang, Y. Liu, H. Shi, Z. Su, "Novel in situ product removal technique for simultaneous production of propionic acid and vitamin b12 by expanded bed adsorption bioreactor", *Bioresource Technology*, vol. 104, pp. 652-659, Enero 2012
- [25] "Microbial Production of Vitamins: An Overview," *Biology Discussion*, 29-Sep-2015. [Online]. Disponible en: <https://www.biologydiscussion.com/vitamins/microbial-production-of-vitamins-an-overview/10372>.
- [26] J.H. Martens, H. Barg, M. Warren, D. Jahn, Microbial production of vitamin b12, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58 (2002) 275–285.
- [27] B. Chamlagain. "Fermentation fortification of active vitamin b12 in food matrices using *Propionibacterium freudenreichii*: Analysis, production and stability," M.S. thesis, University of Helsinki, Helsinki, Finlandia, 2016.
- [28] Y. Bertholet y M. Mercante, "Producción de vitamina b12 por fermentación microbiana", Poyecto final para obtener el grado en ingeniería química, UTN, Córdoba, 2019.
- [29] T. Ishchenko, "The effect of 5,6-Dimethylbenzimidazole on vitamin b12 synthesis and protein production in *propionibacterium Freudenreichii* ssp. *Freudenreichii*," M.S. thesis, University of Helsinki, 2014.
- [30] P. Wang, Z. Zhang, Y. Jiao, S. Liu, y Y. Wang, "Estrategia mejorada de control de ácido propiónico y 5,6-dimetilbencimidazol para la fermentación de vitamina b12 por *Propionibacterium freudenreichii*", *J. Biotecnología*, vol.193, pp. 123-129, Enero 2015.

- [31] P. Wang, Y. Jiao y S. Liu, “Novel fermentation process strengthening strategy for production of propionic acid and vitamin b12 by *Propionibacterium freudenreichii*”, *Ind Microbiol Biotechnol*, vol. 41, pp. 1811–1815, 2014.
- [32] A. Nag, *Biosystems engineering*. McGraw-Hill, 2010.
- [33] L. Hendrik and B. Gist-Brocades, "Production and use of compositions comprising high concentrations of vitamin b12 activity"; U. S. Patent 5,955,321, Septiembre 21, 1999.
- [34] S. Ahuja. Manual de Bioseparaciones. 2st edition. Academic Press, 2000.
- [35] R. Harrison, P. Todd, S. Rudge, and D. Petrides, *Bioseparations science and engineering*. Oxford University Press. New York, Oxford, 2003.
- [36] J. M. Sych, C. Lacroix, and M. J. Stevens, “Vitamin B₁₂ - Physiology, Production and Application,” *Industrial Biotechnology of Vitamins, Biopigments, and Antioxidants*, pp. 129–159, 2016.
- [37] S. Survase, I. Bajaj y R. Singhal, “Biotechnological Production of Vitamins”, *Production of Vitamins*, vol. 44, no. 3, pp. 381–396, 2006.
- [38] E. Soares, G. Henares y P. Roncador "Projeto de uma planta de producao de vitamina b12", Trabajo de conclusión de curso, UTFPR, Toledo, 2019.
- [39] Gea Group. (s.f.). Secador por atomización. [Online]. Disponible: <https://www.gea.com/es/products/dryers-particle-processing/spray-dryers/conventional-spray-dryer.jsp>
- [40] J. Mayo. (2014, Nov 6). Comprender el proceso de filtración y secado de Nutsche. [Online]. Disponible: <https://www.ddpsinc.com/blog/understanding-the-nutsche-filtration-and-drying-process>
- [41] GFD Group. (s.f.). Secador de filtro Lab Nutsche. [Online]. Disponible: https://powdersystems.com/solutions/filter-dryer-systems/gfdlab-agitated-nutsche-filter-dryer/?gclid=Cj0KCQiA4OybBhCzARIsAIfn9nSBu3YPNYGieBiHLlwQ7G8DFxQtzPJLek-AFy54UXHDhXW00lkz1waAhzjEALw_wcB
- [42] P. Straw. (200, Apr 23). Why use a Discharge Isolator when using an ANFD Agitated Nutsche Filter Dryer. Standard Group. [Online]. Disponible: <https://stangroupco.com/techno-blog/231-why-use-a-discharge-isolator-when-using-an-anfd-agitated-nutsche-filter-dryer#:~:text=Main%20Disadvantage%20of%20an%20ANFD&text=When%20the%20process%20is%20complete,discharge%20port%20for%20ofurther%20processing>
- [43] R. A. Walhe, S. S. Diwanay, M. S. Patole, R. Z. Sayyed, H. A. Al-Shwaiman, M. M. Alkhulaifi, A. M. Elgorban, S. Danish, and R. Datta, “Cholesterol Reduction and

- Vitamin b12 Production Study on *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus pentosus* Isolated from Yoghurt,” *Sustainability*, vol. 13, no. 11, p. 5853, 2021.
- [44] P. Li, Q. Gu, Y. Wang, Y. Yu, L. Yang, y J. V. Chen, “Novel vitamin b12-producing *Enterococcus* spp. and preliminary in vitro evaluation of probiotic potentials,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 101, no. 15, pp. 6155–6164, 2017.
- [45] E. Soares, G. Henares y P. Roncador "Projeto de uma planta de producao de vitamina b12", Trabajo de conclusión de curso, UTFPR, Toledo, 2017.
- [46] “Vitamina b12: Cobalamina - info-farmacia,” *info*. [Online]. Disponible: <http://www.info-farmacia.com/bioquimica/vitamina-b12-cobalamina>.
- [47] *Encyclopedia of human nutrition*. Elsevier, 2005. [Online]. Disponible: https://books.google.com.pe/books?hl=es&lr=&id=OqcL6JgTUf8C&oi=fnd&pg=PA351&dq=vitamin+b12&ots=hB8Z1px6ME&sig=e9-o9abStmjb_YH_wusrWV9snEs&redir_esc=y#v=onepage&q=vitamin%20b12&f=false
- [48] A. D. Smith, M. J. Warren, and H. Refsum, “Vitamin b12,” *Advances in Food and Nutrition Research New Research and Developments of Water-Soluble Vitamins*, pp. 215–279, 2018.
- [49] J. Liu, Y. Liu, J. Wu, H. Fang, Z. Jin, and D. Zhang, “Metabolic profiling analysis of the vitamin b12,” *MicrobiologyOpen*, vol. 10, no. 3, 2021.
- [50] L. Johnson. (2020, Nov). Deficiencia de vitamina b12 [Online] <https://www.msmanuals.com/es-pe/professional/trastornos-nutricionales/deficiencia-de-ependencia-e-intoxicaci%C3%B3n-vitam%C3%ADnica/deficiencia-de-vitamina-b12>
- [51] Panel de la EFSA sobre aditivos y productos o sustancias utilizados en la alimentación animal, G. Rychen, G., Aquilina, G. Azimonti, V. Bampidis, M. Bastos, J. Bories, A. Chesson, P. Cocconcelli, G. Flachowsky, J. Gropp, B. Kolar, M. Kouba, M. López, S. López, A. Mantovani, B. Mayo, F. Ramos, M. Saarela, R. Villa, P. Oeste, L. Costa, N. Dierick, B. Glandorf, L. Herman, S. Karenlampi, L. Leng, C. Tebbe, J. Aguilera, P. Manini, J. Tarrés-Call y, R. Wallace, “Seguridad y eficacia de la vitamina B 12 (en forma de cianocobalamina) producida por *Ensifer* spp. como aditivo en piensos para todas las especies animales según un expediente presentado por VITAC EEIG,” *EFSA Journal*, vol. 16, no. 7, Julio 2018.
- [52] Sigma-Aldrich, “Ficha de datos de seguridad de la Cianocobalamina”, Merck, US y Canada, Generic EU MSDS, 2022.
- [53] "Vitamin b12 Market Size, Share & Industry Analysis, by dosage form (Syrups, Injection, Tablets, Powder, Nasal Spray), by route of administration (Oral, Intravenous,

- Subcutaneous, Nasal), by distribution channel (Hospital pharmacy, Retail pharmacy, Online pharmacy) and regional forecast 2022 - 2029”, *Fortune Business Insights* | 2021| Data. [Online]. Disponible: <https://www.fortunebusinessinsights.com/vitamin-b12-market-104816>
- [54] Centro nacional de Información Biotecnológica. (2022). Resumen de compuestos de PubChem para CID 5311498, cianocobalamina. [Online]. Disponible: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cyanocobalamin>
- [55] "Vitamina b12", *DrugBank* | 2022 | Data. [Online]. Disponible: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00115>
- [56] "Vitamina b12", *National Institute of Health - Office of Dietary Supplements* | 2022 | Data. [Online]. Disponible: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Vitaminb12-HealthProfessional/>
- [57] "Global Vitamin B12 (Cobalamin) Market," Data Bridge Market Research, [Online]. Available: <https://www.databridgemarketresearch.com/es/reports/global-vitamin-b12-cobalamin-market>. [Accessed: 10-Aug-2024].
- [58] "Vitamin B12 Ingredient Market," Global Market Insights, [Online]. Available: <https://www.gminsights.com/es/industry-analysis/vitamin-b12-ingredient-market>. [Accessed: 10-Aug-2024].
- [59] "Vitamin B12 Derivatives (Unmixed)," OEC World, [Online]. Available: <https://oec.world/es/profile/hs/vitamin-b12-derivatives-unmixed>. [Accessed: 10-Aug-2024].
- [60] "Supplier Price List," Chemical Book, [Online]. Available: https://www.chemicalbook.com/SupplierPriceList_EN.aspx?cbn=CB6126463&page=2. [Accessed: 10-Aug-2024].
- [61] C. Le Maréchal, V. Peton, C. Plé, C. Vroland, J. Jardin, V. Briard-Bion, G. Durant, V. Chuat, V. Loux, B. Foligné, S. Deutsch, H. Falentin, and G. Jan, "Surface proteins of *Propionibacterium freudenreichii* are involved in its anti-inflammatory properties," *Journal of Proteomics*, vol. 113, pp. 447-461, January 2015.
- [62] A. Thierry, S. Deutsch, H. Falentin, M. Dalmasso, F. J. Cousin, and G. Jan, "New insights into physiology and metabolism of *Propionibacterium freudenreichii*," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 149, pp. 19-27, September 2011.

- [63] W. Castillo, and E. Rojas, "Propuesta de evaluación de la cinética de fermentación para la obtención de vitamina b12 utilizando la cepa del género *Propionibacterium freudenreichii*," Lic. thesis, Universidad de El Salvador, San Salvador, 2007.
- [64] P. M. Doran. Principios de ingeniería de los bioprocesos. España. Zaragoza: Acribia, 1998.
- [65] M. L. Shuler y F. Kargi, Bioprocess Engineering: Basic Concepts. New Jersey: Prentice-Hall, 2002.
- [66] A. Zuñiga, "Producción enzimática de Glucosa por fermentación aeróbica del almidón de cuatro especies de tubérculos con α -amilasa de *Bacillus licheniformis* aislado de Géiseres de Calientes, Candarave-Tacna," Bach. thesis, Tacna, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Perú, 2014.
- [67] C. Kubo, R. Sehn, E. Antonio da Silva, N. Yahaut, and T. Rodrigues da Silva, "Culture of *Scenedesmus acuminatus* in Corn Steep Liquor," *Journal of Agricultural Science and Technology*, vol. 7, pp. 346-350, May 2017.
- [68] A. Abdul, "Evaluation of chicken manure and ammonium on yield and yield components of maize (sulphate *zea mays hermonthica* (DEL.) benth infestation fertilizer L.) and striga and seedbank," M.S. thesis, University for development studies, 2019.
- [69] S. El-Din, A. El-Midany, "Calcite Flotation in Potassium Oleate/Potassium Dihydrogen Phosphate System," *Journal of Surfactants and Detergents*, vol. 18, pp. 905–911, July 2015.
- [70] "Industrial Fermentation: Its Contribution to the Bioeconomy," Leaf, [Online]. Available: <https://leaf-lesaffre.com/industrial-fermentation-contribution-to-the-bioeconomy/>. [Accessed: 11-Aug-2024].
- [71] J. R. Couper, W. R. Penney, J. R. Fair, and S. M. Walas, Chemical Process Equipment: Selection and Design. Elsevier, 2005. [Online]. Available: <https://books.google.co.ve/books?id=xFkLuxL115AC&printsec=frontcover>. [Accessed: 11-Aug-2024].
- [72] A. Tejada, R.M. Montesinos, R. Guzmán. Bioseparaciones, Pearson Educación, México, 2011.
- [73] "Cristalizadores industriales al vacío para aguas residuales," Condorchem Envitech, [Online]. Available: <https://condorchem.com/es/cristalizadores/>. [Accessed: 11-Aug-2024].

- [74] World Integrated Trade Solution. (2021). Perú Vitaminas; vitamina b12 y sus derivados, importaciones sin mezclar por país en 2021. [Online]. Disponible: <https://wits.worldbank.org/trade/comtrade/en/country/PER/year/2021/tradeflow/Imports/partner/ALL/product/293626>.
- [75] P. Wang, Z. Zhang, Y. Jiao, S. Liu, y Y. Wang, “Estrategia mejorada de control de ácido propiónico y 5,6-dimetilbencimidazol para la fermentación de vitamina b12 por *Propionibacterium freudenreichii*”, J. Biotecnología, vol.193, pp. 123-129, Enero 2015.
- [76] M. Kula and H. Schutte, “Purification Disruption of Proteins and the of Microbial Cells”, Biotechnology Progress, Vol. 3, no. 1, 1987.
- [77] T. Heerlen, “Microbial production of vitamin b12 and production and use of compositions comprising high concentrations of vitamin b12 activity”, Patente 97202466.5, Noviembre 20, 2012.
- [78] G. Towler y R. Sinnott, Chemical Engineering Design. Oxford: Elsevier, 2013.
- [79] M. S. Peters, K. D. Timmerhaus y R. E. West, Plant Design and Economics for Chemical Engineers. New York: McGraw Hill, 2003.
- [80] S. Aguilar. (2016, Agosto). Manual de operación para el biorreactor. Online. Disponible: <https://www.yumpu.com/es/document/read/59254438/manual-de-operacion-para-el-biorreactor-ibq-2016>
- [81] J. J. H. van der Meer, Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Production and Processes. Wiley, 2008. [Online]. Available: <https://www.uv.mx/personal/izcamacho/files/2012/02/Pharmaceutical-Manufacturing-Handbook-Production-and-Processes-Wiley-2008.pdf>. [Accessed: 13-Aug-2024]
- [82] Nielsen, J. J. Villadsen, and G. Lidén. 2003. Bioreaction Engineering Principles, 2nd ed. New York: Kluwer Academic/Plenum. Olsson, L. y J. Nielsen. 1997.
- [83] B. Estevinho, I. Carlan, A. Blagab, F. Rocha, “Vitaminas solubles (vitamina b12 y vitamina C) microencapsuladas con diferentes biopolímeros mediante un proceso de secado por atomización”, Tecnología de polvo, vol 289, pp. 71 - 78, 2016.
- [84] Bryan Research & Engineering (2005). ProMax (4.0.16071.0; Versión V 4) [Conjunto de datos].
- [85] Sanford A Klein (2019). Engineering Equation Solver (V11.482) [Conjunto de datos].
- [86] Serway. Physics for Scientists and Engineers Sears, Z & Y. Física Universitaria.[Online]. Disponible en: <https://didactica.fisica.uson.mx/tablas/viscosidad.htm>.

- [87] A. Ramos, M. Otero, A. Rodrigues, "Recovery of Vitamin b12 and cephalosporin-C from aqueous solutions by adsorption on non-ionic polymeric adsorbents", *Separation and Purification Technology*, vol 38, pp. 85 - 98, 2004.
- [88] A. C. Yunus, *Fluid mechanics: fundamentals and applications*. McGraw-Hill Education, 2018.
- [89] Y. Chisti Y M. Moo-Young, "Disruption of microbial cells for intracellular products", en *Enzyme and Microbial Technology*, 1986, Vol.8, pp. 194-204. DOI: [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(86\)90087-6](https://doi.org/10.1016/0141-0229(86)90087-6).
- [90] DYNO®-MILL KD, Horizontal agitator bead mill, Willy A. Bachofen AG Maschinenfabrik, Muttenz, CH.
- [91] Thermofisher. Centrifuge Solutions for Bioprocessing. [Online]. Disponible: <https://www.thermofisher.com/pe/en/home/life-science/lab-equipment/lab-centrifuges/centrifuges-bioprocessing.html>
- [92] J. Geciova, D. Bury y P. Jelen, "Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry—a review", en *International Dairy Journal*, 2002, Vol.12, pp. 541-553. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00038-9](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00038-9).
- [93] M. Kula y H. Schiitte, "Purification disruption of Proteins and the of Microbial Cells", en *Biotechnology Progress*, 1987, Vol.3, pp. 31-42. DOI: <https://doi.org/10.1002/btpr.5420030107>
- [94] D. M. Bernal Morales and N. A. Aguirre Domelin, "Escalamiento columna de adsorción para la remoción de cromo en las aguas residuales de la industria de curtimiento por medio de la cáscara de banano," *Fundación Universidad de América*, Bogotá, D.C., Colombia, 2022. [Online]. Available: <https://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/8848/4/6162002-2022-1-IQ.pdf>. [Accessed: 14-Aug-2024].
- [95] Billicom. (s.f.). Máquina Secadora Por Pulverización. [Online]. Disponible: https://www.billicomgroups.com/product/Spray-Dryer--Machine.html?gclid=Cj0KCQjwnbmaBhD-ARIsAGTPcfWU6Uf-Xnf7XRrc2MCOQAO5HXN0SAnTvovgULHd6_7nqDed6kdiBqYaAqSweALw_wcB
- [96] Alibaba. (s.f.). Tanque de cristalización Industrial, cristizador evaporativo cristizador de vacío cristizador. [Online]. Disponible: <https://spanish.alibaba.com/product-detail/Industrial-crystallization-tank-evaporative-crystallizer-Vacuum-60757855663.html>

- [97] Alibaba. (s.f.). Fermentador biológico Fotobiorreactor de algas Fermentador de ácido ascórbico Biorreactor. [Online]. Disponible: https://www.alibaba.com/product-detail/Biological-Fermentor-Algae-Photo-bioreactor-Ascorbic_1600596534144.html?spm=a2700.details.0.0.3b2d75ddZbcTgZ
- [98] Mercado libre. (s.f.). Tanque de almacenamiento de 1000 L. [Online]. Disponible: <https://listado.mercadolibre.com.pe/tanques-1000-litros>
- [99] Alibaba. (s.f.). Columna de adsorción industrial a bajo precio. [Online]. Disponible: <https://spanish.alibaba.com/p-detail/industrial-62103304807.html?spm=a2700.details.0.0.2ee74829fosxHZ>
- [100] Chemical Book. (s.f.). Vitamina b12 - Fabricante: Corporación estadounidense de productos químicos personalizados. [Online]. Disponible: <https://www.chemicalbook.com/Price/Vitamin-b12.htm>
- [101] SUNAT. (s.f.). Tributos que administra. [Online]. Disponible: <https://www.sunat.gob.pe/institucional/quienessomos/tributosadministra.html#:~:text=Los%20principales%20tributos%20que%20administra,la%20primera%20venta%20de%20inmuebles>
- [102] R. A. Sheldon, "The E factor 25 years on: the rise of green chemistry and sustainability," *Green Chem.*, vol. 19, no. 1, pp. 1-12, 2017. [Online]. Available: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2017/gc/c6gc02157c>. [Accessed: 15-Aug-2024].
- [103] A. M. M. Z. Elshafie, A. A. A. M. Elshafie, and A. A. Elshafie, "Membrane Technologies in Wastewater Treatment: A Review," *PMC*, vol. 10, no. 1, pp. 1-16, 2020. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7281250/>. [Accessed: 16-Aug-2024].
- [104] U.S. Environmental Protection Agency, "Membrane Bioreactor Technology," 2021. [Online]. Available: https://www.epa.gov/sites/default/files/2021-06/documents/membrane_bioreactor_technology.pdf. [Accessed: 15-Aug-2024].
- [105] J. M. Borrero, "RECUPERACIÓN DE ÁCIDO ACÉTICO Y ÁCIDO PROPIÓNICO POR EXTRACCIÓN LÍQUIDO/LÍQUIDO Y MEMBRANAS LÍQUIDAS SOPORTADAS" Universitat Politècnica de Catalunya, [Online]. Available: <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099.1/9264/Memòria.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. [Accessed: 15-Aug-2024].

- [106] "Ácido propiónico, sus sales y sus ésteres," Veritrade Corp, [Online]. Available: <https://www.veritradecorp.com/es/peru/importaciones-y-exportaciones/acido-propionico-sus-sales-y-sus-esteres/291550>. [Accessed: 15-Aug-2024].
- [107] "Ácido acético," Veritrade Corp, [Online]. Available: <https://www.veritradecorp.com/es/peru/importaciones-y-exportaciones/acido-acetico/291521>. [Accessed: 15-Aug-2024].
- [108] "Ácido succínico 99,5 +%, grado alimenticio" Laboratorium Discounter, [Online]. Available: <https://www.laboratoriumdiscounter.nl/es/acido-succinico-995-grado-alimenticio.html>. [Accessed: 15-Aug-2024].
- [109] G. Pita, "Ácido fólico y vitamina b12 en la nutrición humana", *Rev Cubana aliment nutr*, vol. 12, no. 2, pp. 107–19, 1998. [Online]. Disponible: https://www.academia.edu/38623225/Instituto_de_Nutrici%C3%B3n_e_Higiene_de_los_Alimentos_%C3%81CIDO_F%C3%93LICO_Y_VITAMINA_B_12_EN_LA_NUTRICI%C3%93N_HUMANA
- [110] S. P. Stabler, "Vitamin b12," *Present Knowledge in Nutrition*, pp. 257–271, 2020.
- [111] M. Torres, "Aspectos esenciales sobre vitamina b12", *Rev informativa científica*, vol. 77, no. 1, 2013. [Online]. Disponible: <http://revinfcientifica.sld.cu/index.php/ric/article/view/874/2645>
- [112] A. Brito, E. Hertrampf, M. Olivares, D. Gaitán, H. Sánchez, L. H. Allen, and R. Uauy, "Folatos y vitamina b12 en la salud humana," *Revista médica de Chile*, vol. 140, no. 11, pp. 1464–1475, 2012.
- [113] M. J. Shipton and J. Thachil, "Vitamin B₁₂ deficiency – A 21st century perspective," *Clinical Medicine*, vol. 15, no. 2, pp. 145–150, 2015.
- [114] R. C. Oh and D. L. Brown, "Vitamin b12 Deficiency," *American Family Physician*, 01-Mar-2003. [Online]. Available: https://www.aafp.org/afp/2003/0301/p979.html?mod=article_inline.
- [115] Red Panamericana de Armonización de la Reglamentación Farmacéutica, "Buenas prácticas de la OMS para laboratorios de control de calidad de productos farmacéuticos Guía de autoevaluación de BPL", Organización Panamericana de la Salud, Tech. Rep. No. 957, 2010.
- [116] R. Meoño, "Implementación de un sistema de gestión de buenas prácticas de manufactura (BPM), para una industria farmacéutica," Tesis para obtener título, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala, 2021

- [117] R. Pesquera-Cabezasa, y L. López-López, “¿Es ética la promoción farmacéutica en el Perú?” Facultad de Administración, Universidad San Ignacio de Loyola, vol. 30, no.2, pp. 158-162, Noviembre 2015.
- [118] Agencia para Sustancias Tóxicas y el Riesgo de Enfermedades. “ToxFAQs™ - Anilina (Aniline)”. DEPARTAMENTO DE SALUD Y SERVICIOS HUMANOS de los EE.UU. Tech. Rep. 62-53-3, 2016.
- [119] C. Acevedo, L. Gronenberg, M. Mack, F. Commichau, y H. Genee, “ Microbial cell factories for the sustainable manufacturing of B vitamins,” Current Opinion in Biotechnology, vol. 56, pp. 18-29, Abril 2019.
- [120] D. W. Green, M. Southard, and R. H. Perry, Perry's chemical engineers' handbook. McGraw-Hill, 2019.
- [121] Catalog No.WAB, Willy A. Bachofen AG Maschinenfabrik, Proven performance in the field of dispersion and ultra fine wet grinding with thousands of installations worldwide, Switzerland.
- [122] A. Valiente y A. Obaya .Operaciones unitarias para la industria alimentaria. Cuatitlán: Editorial Limusa, 1999. [Online] Recopilado de: https://www.researchgate.net/profile/Antonio-Barderas/publication/44512127_Problemas_de_balance_de_materia_y_energia_en_la_industria_alimentaria_Antonio_Valiente_Barderas/links/59e1759f458515393d53549b/Problemas-de-balance-de-materia-y-energia-en-la-industria-alimentaria-Antonio-Valiente-Barderas.pdf
- [123] UK Health Security Agency, “Bacteria Collection: Propionibacterium freudenreichii” Bacteria Collection [Online]. Disponible en: <https://www.culturecollections.org.uk/products/bacteria/detail.jsp?refId=NCTC+10470&collection=nctc>
- [124] Gawron Kft. “Jarabe de glucosa de grado alimenticio, glucosa líquida 100% pura,” Product en Alibaba.com. [Online]. Available: <https://spanish.alibaba.com/p-detail/Food-50037248994.html?spm=a2700.7724857.0.0.6661582biQQHmh>
- [125] Made in china. (s.f.). Licor de Maíz Empinado de Grado Alimenticio de Alta Calidad. [online]. Disponible: <https://h2focusangela.en.made-in-china.com/product/PnEpZsKbbrVI/China-High-Quality-Food-Grade-Corn-Steep-Liquor.html>
- [126] Alibaba. (s.f.). KH₂PO₄ precio de grado industrial 99% MKP fosfato monopotásico precio. [Online]. Disponible:

<https://spanish.alibaba.com/p-detail/KH2PO4-1600628280196.html?spm=a2700.7724857.0.0.744c6adf1bHR4M&s=p>

- [127] B. Romo y L. Conforti, "Producción de nitrato de amonio ", Proyecto Final, Ingeniería química, UNCUYO, San Rafael, Mza, 2016. [Online] Disponible en: https://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/10521/proyecto-final-nitrato-de-amonio.pdf
- [128] Alibaba. (s.f.). Cloruro de cobalto de alta pureza, Grado Industrial, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, al mejor precio, CAS:7791-13-1. [Online]. Disponible: <https://spanish.alibaba.com/p-detail/High-643243189.html?spm=a2700.7724857.0.0.6a4d2af7bpAFcS&s=p>
- [129] Sedapal S.A., "Estructura tarifaria", Diario el peruano, Perú, Agt. , 2022. [Online] Disponible en: <https://www.sedapal.com.pe/storage/objects/1-web-estructura-tarifaria-agua-potable-y-alcantarillado-rgg-n-356-2022-gg-del-01082022-publicada-02082022-20220825022209.pdf>
- [130] Chemical Book. (s.f.). 5,6 - Dimethylbenzimidazole - Fabricante: Alicheme. [Online]. Disponible: <https://www.chemicalbook.com/Price/5-6-Dimethylbenzimidazole.htm>
- [131] "Perú precios de la electricidad, marzo 2022," Global Petrol Prices.com. [Online]. Disponible en: https://es.globalpetrolprices.com/Peru/electricity_prices/
- [132] Alibaba. (s.f.). Metanol Industrial al mejor precio, 99% de alcohol metílico, UN 1230. [Online]. Disponible: <https://spanish.alibaba.com/p-detail/Best-1600106816567.html?spm=a2700.7724857.0.0.40a12cf8RKEDFp>
- [133] Made in china. (s.f.). Duolite analógica una resina de intercambio de aniones 161. [Online]. Disponible: https://es.made-in-china.com/co_kivifilter/product_Analogue-Duolite-a-161-Anion-Exchange-Resin_oionnrehg.html
- [134] Mantis Innovation, "Energy efficiency in biotech and pharma," Mantis Innovation Blog. [Online]. Disponible: [https://blog.mantisinnovation.com/energy-efficiency-in-biotech-and-pharma#:~:text=High%20biotech%20and%20pharma%20energy%20use&text=\(257%20kWh%2Fm2\)%20](https://blog.mantisinnovation.com/energy-efficiency-in-biotech-and-pharma#:~:text=High%20biotech%20and%20pharma%20energy%20use&text=(257%20kWh%2Fm2)%20)
C [Accessed: 11-Aug-2024]

ANEXOS

Anexo 1: Funcionamiento e importancia de la vitamina b12 en el organismo

En tal sentido, cuando la cobalamina ingresa al organismo por medio de la comida, se mezcla con la saliva y son dirigidas al estómago. Aquí, la vitamina es liberada de los alimentos por la acción de los ácidos y la pepsina del estómago, y se une con la haptocorrina secretada en la saliva, la cual posee una afinidad que persiste al pH ácido del jugo gástrico [109]. Posteriormente, en el duodeno, el ácido estomacal se neutraliza y las enzimas pancreáticas degradan la haptocorrina y liberan la vitamina, permitiendo su unión con el factor intrínseco [110]. Luego, este compuesto se dirige al íleon distal, donde se encuentran con los receptores cubilina facilitando la entrada del complejo vitamina b12 - factor intrínseco a la célula por endocitosis [111]. Una vez adentro, el complejo se degrada y esta vitamina se une a diferentes transportadores como la transcobalamina II, la cual se encarga de transportar a la cobalamina por la sangre ya sea hacia el hígado, para que sea almacenado, o al resto del cuerpo. En el hígado, la vitamina b12 se convierte en coenzima b12 en una reacción que depende del adenosín trifosfato (ATP) y flavín adenín dinucleótido (FAD), excretándose con la bilis [16]. Mientras que en el resto de las células, la vitamina b12 actúa como coenzima para la síntesis de metionina y la isomerización de L-metilmalonil-CoA a succinilCoA [110].

Ahora bien, cabe destacar que la cobalamina puede ser absorbida por un proceso fisiológico activo o por difusión pasiva. En tal sentido, la forma activa, se da debido a la unión de esta vitamina con el factor intrínseco (FI) en el intestino delgado, generando que entre un 60 - 80% de la cobalamina sea absorbida [112]. Por otro lado, la difusión pasiva, es un proceso independiente del factor intrínseco en donde la vitamina es absorbida en el intestino delgado pasivamente, originando que solo el 1 o 2% de la cantidad ingerida pueda ser absorbida [1013]. Este último proceso, por lo general se presenta en los adultos mayores o personas que poseen un déficit de factor intrínseco [114]. En pocas palabras, dicha sustancia no llega a ser absorbida por completo por el organismo, por lo que el porcentaje restante es eliminado por medio de la orina o las heces.

Anexo 2: Marco referencial

- **Buenas prácticas de manufactura en industrias farmacéuticas**

Las buenas prácticas de manufactura (BPM) son aquellas que garantizan y aseguran que los productos farmacéuticos son producidos y controlados consistentemente con los estándares de calidad apropiados para su uso y según sea requerido por la autorización de comercialización [115]. Estas prácticas buscan evitar la contaminación cruzada del producto fabricado con otros productos para poder garantizar el monitoreo total de los procesos. De igual forma, es necesario considerar un control ambiental del lugar y de los equipos, ya que estos deben de ser apropiados para las funciones y operaciones que se realicen en las instalaciones de bioprocesamiento. Además, es necesario contar con procedimientos para la eliminación segura de los distintos tipos de residuos incluyendo desechos tóxicos (químicos y biológicos), solventes, muestras, reactivos, entre otros [115]. De esta manera, la industria farmacéutica toma en consideración los puntos planteados anteriormente para trabajar bajo restricciones exigentes sobre la calidad, presentando rangos muy estrechos para evitar errores, debido a que de esto depende la salud y riesgo de sus consumidores [116].

Teniendo en cuenta lo anterior, esta industria está altamente regulada y controlada por entidades en Estados Unidos y Perú, como la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) y la Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas (DIGEMID), las cuales exigen cumplir procesos rigurosos, como las buenas prácticas de manufactura y almacenamiento [117]. En este contexto, esta última entidad, dirigida por el Ministerio de Salud, realiza inspecciones completas al proceso de producción de diferentes fármacos adoptando normas establecidas, a fin de garantizar productos de buena calidad. Dentro de estas normas, se encuentra el Manual de Buenas Prácticas de Manufactura, el cual recoge la opinión del Comité de Expertos de la OMS en especificaciones para las preparaciones farmacéuticas, esbozando conceptos generales de la garantía de la calidad, proveyendo asesoramiento respecto de las acciones que se han tomar y brindando normas complementarias sobre la fabricación de productos farmacéuticos estériles y las buenas prácticas que se deben observar en la fabricación, control y manejo de ingredientes farmacéuticos activos.

- Seguridad y regulaciones en la producción de vitaminas

Dentro del proceso de producción de vitaminas en la industria farmacéutica, existen ciertas impurezas que se generan a lo largo del proceso, las cuales se han de controlar para así garantizar un producto de calidad para los usuarios. En tal sentido, dichos contaminantes se

encuentran definidos de acuerdo al método de producción de la vitamina: químico o biológico.

Un claro ejemplo de contaminación empleando el método químico es la presencia de anilina dentro del proceso de producción de la riboflavina (vitamina b2). Esta impureza es eliminada del proceso, debido a que causa alteraciones en la sangre cuando el oxígeno es transportado a los tejidos [118]. Otro ejemplo, es la presencia de ADN en los productos fermentados, una impureza propia del método biológico que se ha de retirar en las etapas de separación y purificación de ciertas vitaminas, como en el caso de las cobalaminas. En relación con lo anterior, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) establece que es obligatorio realizar estudios de toxicidad a los productos terminados y verificar que este no cuente con rastros de microorganismos genéticamente modificados o el ADN recombinante del microorganismo empleado, de manera que se obtengan productos aptos y de calidad para el consumo humano [119]. Asimismo, es necesario realizar controles en todas las etapas del proceso y en las materias primas que se vayan a emplear, ya que si se cuenta con un adecuado sistema de control se podrán ahorrar recursos y trabajar con mayor eficiencia y rendimiento [28].

Anexo 3: Datos cinéticos de la fermentación por lotes de *P. freudenreichii*

En la figura 1 se aprecia la cinética de fermentación empleada para el presente estudio.

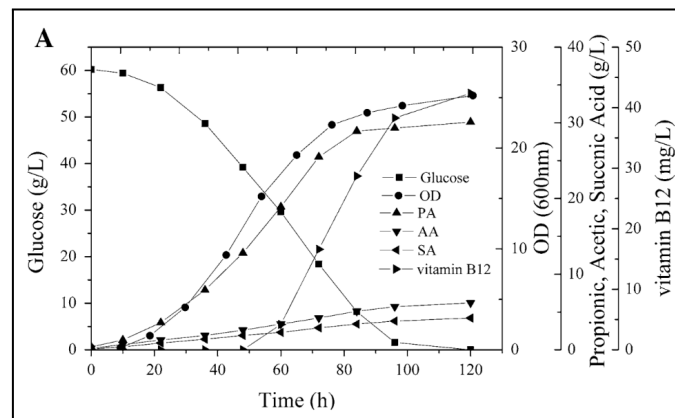


Figura 1. Cinética de fermentación por lotes de *P. freudenreichii* con glucosa como fuente de carbono. [31]

En vista de ello, por medio de dicha figura se pudo determinar el tiempo total de fermentación, el tiempo de cada etapa del proceso (latencia, exponencial y estacionaria) y las

concentraciones del sustrato, la biomasa, los subproductos y el producto de interés vitamina b12 (Tabla 1).

Tabla 1: Concentraciones del sustrato, biomasa, producto y subproductos en cada intervalo de tiempo. Adaptada de [31]

Tiempo (h)	Glucosa (g/L)	Biomasa (g/L)	Vitamina b12 (mg/L)	Ácido Propiónico (g/L)	Ácido Acético (g/L)	Ácido Succínico (g/L)
0	60	0.15	0	0	0	0
10	59	0.3	0	1.8	0.15	0.38
20	57	0.6	0	3	1	0.65
30	51.5	1.5	0	6.2	1.5	0.95
40	45	2.46	0	9.8	2	1.29
50	37	4.05	1	13.9	2.5	1.77
60	29	5.4	4.7	19	3.5	2.155
70	19	6.3	15	24.9	4	2.586
80	11.5	6.9	25	28	4.8	3.1
90	4	7.2	34	29	5.1	3.49
100	0.8	7.41	39	29.5	5.5	3.66
110	0.3	7.47	40.8	29.9	6	3.88
120	0	7.53	42.5	30.1	6.3	4.3

Anexo 4: Descripción de los cálculos del balance de masa para los fermentadores 1 y 2, y el biorreactor.

- Balance de masa para los fermentadores:

Para hallar los valores de cada compuesto a la salida del fermentador 1, se tomó como primer dato la consideración que indica que el licor de maceración de maíz, el fosfato monopotásico, el nitrato de amonio y el cloruro de cobalto no intervienen en la reacción, debido a que su función es brindar el medio adecuado para que las bacterias crezcan y se reproduzcan. Por lo tanto, la cantidad que ingresa al biorreactor es igual a la cantidad que sale

de estos. Asimismo, tomando la consideración de que el proceso demora 80 horas en realizarse, la masa del sustrato a la salida del equipo será hallada por medio de la concentración del sustrato en dicho tiempo (11.5 g/L) multiplicado por el volumen del fermentador (15,11 L).

En segunda instancia, se calculó la cantidad de biomasa y subproductos (ácido propiónico, acético y succínico) generados en la fermentación. Esto se pudo determinar mediante las concentraciones finales obtenidas del Anexo 3 y el volumen de este equipo.

En cuanto al agua, hay cierta parte de esta que es generada debido a la reacción. Este valor se calcula por medio de la multiplicación entre la cantidad de glucosa que ingresa al proceso y la relación de agua/glucosa brindada por el estudio de Soares, Henares y Roncador (2019) [38]. Es así como, se suma la cantidad de agua que ingresa al proceso con el valor del agua generada y se obtiene el dato del agua a la salida del proceso.

Finalmente, se tiene como último compuesto al dióxido de carbono generado durante la reacción. Para hallar la cantidad de este compuesto a la salida del biorreactor, se tomó el dato de su solubilidad en agua a 30°C es 0.1257 kg CO₂ / 100 kg H₂O [120]. Este valor fue multiplicado por la cantidad de agua que sale del equipo, dando como resultado la cantidad de CO₂ a la salida del biorreactor [38].

Una vez finalizada la explicación para el balance de masa del fermentador 1, continuaremos con el siguiente equipo del tren de siembra. Para esto, se tomó como primer dato la consideración de que la corriente del inóculo es la misma que la corriente de salida del fermentador 1. Dicha consideración se llevó a cabo, debido a que la cantidad de inóculo a ingresar es muy pequeña a diferencia de la cantidad del medio de cultivo, por lo que la cantidad de subproductos generados no afectará la siguiente fermentación.

En tal sentido, para hallar la cantidad de cada compuesto a la salida del fermentador 2 se siguió el mismo procedimiento que para el fermentador 1, con la diferencia de que el volumen a trabajar es de 694.98 L.

- Balance de masa para el biorreactor:

Para iniciar con los cálculos del balance de masa en el biorreactor se tomó como primer dato la consideración de que la corriente del inóculo es la misma que la corriente de salida del prefermentador 2. Esta consideración se efectuó, debido a que, al igual que en el prefermentador 2, la cantidad de inóculo a ingresar es muy pequeña a diferencia de la cantidad del medio de cultivo, por lo que la cantidad de subproductos generados no afectará la fermentación.

En segunda instancia, se consideró en la reacción que el licor de maceración de maíz, el fosfato monopotásico y el nitrato de amonio no intervienen, debido a que su función es brindar el medio adecuado para que las bacterias crezcan y se reproduzcan. Por lo tanto, la cantidad que ingresa al biorreactor es igual a la cantidad que sale de estos. Asimismo, es importante resaltar que a diferencia de los prefermentadores, el cloruro de cobalto si interviene en la reacción cuando a su vez se encuentra el precursor vitamínico dentro de la reacción. En tal sentido para hallar la cantidad de cloruro de cobalto que sale del biorreactor, se sabe que cada molécula de vitamina b12 posee un átomo de cobalto; por tanto, la relación de reacción es de 1:1. Esto quiere decir que la cantidad de cloruro de cobalto gastado es igual a la cantidad de vitamina formada. Teniendo en cuenta esto, se sumó la cantidad de cloruro de cobalto a la entrada del biorreactor y se restó con la cantidad gastada para así obtener el dato de este compuesto a la salida del biorreactor.

Asimismo, se consideró que tanto el sustrato como el precursor vitamínico se consumen por completo en la fermentación, dando un resultado de 0 kg de ambos compuestos.

Posteriormente se calculó la cantidad de biomasa, producto y subproductos (ácido propiónico, acético y succínico) generados en la fermentación. Esto se pudo determinar mediante las concentraciones finales obtenidas del Anexo 3 y el volumen del biorreactor (31969 L).

Por último, con respecto al balance del agua y dióxido de carbono en el biorreactor, se realizó el mismo cálculo que para los prefermentadores.

Anexo 5: Cálculos para el balance de masa en la etapa de desorción para la columna de adsorción

Para hallar la cantidad de solución de metanol a emplear en la desorción, se utilizó el estudio de Ramos, Otero y Rodrigues (2004), en donde presentan las condiciones experimentales para la adsorción y desorción de la vitamina b12 (Vb12) empleando la resina Duolite S861 en una torre de lecho fijo (Tablas 2 y 3) [87].

Tabla 2: Condiciones experimentales para la adsorción de Vitamina b12 sobre la resina Duolite S861. Adaptada de [87]

Condiciones experimentales	Unidades	Valores
Volumen total	[ml]	48.695
Concentración de alimentación	[g/L]	0.156
Porosidad entre partículas		0.4
Caudal	[mL/min]	12
Diámetro de partícula	[mm]	0.4
Temperatura	[°C]	25
pH		5

Tabla 3: Condiciones experimentales para la desorción con metanol de Vitamina b12 de la resina Duolite S861. Adaptada de [87]

Condiciones experimentales	Unidades	Valores
Volumen total	[ml]	45.55
Concentración inicial	[g/L]	0.002
Porosidad entre partículas		0.4
Caudal	[mL/min]	190
Diámetro de partícula	[mm]	0.6
Temperatura	[°C]	25
pH		5
Concentración de metanol	[%]	40

De dichas tablas, se tomó el valor del volumen total (volumen de vitamina b12, 48.695 ml y volumen de la solución de metanol, 45.55 ml) y de la tabla 63 se tomó la concentración de vitamina b12 de la alimentación (0.156 g/L), de manera que se pueda hallar la masa de vitamina b12 adsorbida y el volumen de metanol a emplear en la presente investigación.

Masa de vitamina b12 adsorbida:

$$m_{b12\ experimental} = V_{b12\ experimental} \times C_{b12\ experimental} \quad (55)$$

$$m_{b12\ experimental} = 0.048695 \times 0.000156 = 7.596 \times 10^{-6} \text{ kg}$$

Volumen de la solución de metanol al 40% empleado en este trabajo:

$$V_{MET\ del\ trabajo} = \frac{V_{MET\ experimental}}{m_{b12\ experimental}} \times m_{b12\ del\ trabajo} \quad (56)$$

$$V_{MET\ del\ trabajo} = \frac{0.0456}{7.596 \times 10^{-6}} \times 1.21 = 7261.453 \text{ L}$$

Teniendo el volumen de la solución de metanol al 40% y consiguiendo su densidad a la temperatura de 25 °C (0.9318 kg/L) [121], la tabla 4 muestra la masa de dicha solución y la del agua y metanol que la componen.

Tabla 4: Masa de solución de metanol al 40% y del agua y metanol que la componen.

Componente	Masa (kg)	Componentes de la solución de metanol al 40%	Masa (kg)
Solución de metanol al 40%	7139.695	Agua	4059.733
		Metanol	2706.489

Anexo 6: Cálculos para el balance de energía en el biorreactor y prefermentadores

Para iniciar con los cálculos del balance de energía en las etapas de fermentación, se tomó la siguiente ecuación [28].

$$Q_{reac} + Q_{agit} - Q_{per} - Q_{evap} = Q_{acc} \quad (57)$$

Donde:

- Q_{reac} : Calor de reacción
- Q_{agit} : Calor por agitación
- Q_{per} : Calor perdido
- Q_{evap} : Calor por evaporación (que para este estudio no se cuenta)
- Q_{acc} : Calor acumulado

En tal sentido, comenzando a hallar el calor de reacción, se tiene la siguiente expresión, la cual es aplicada para todo los equipos que presentan reacción:

$$Q_{reac} = \frac{\mu_{neto} \cdot X \cdot V}{Y_H} \quad (58)$$

Donde:

- μ_{neto} : Velocidad específica de crecimiento
- X : Concentración celular al finalizar la fermentación entre el volumen de fermentación
- V : Volumen de fermentación
- Y_H : Rendimiento de biomasa/ sustrato ($Y_{x/s}$) sobre entalpía de la glucosa en kcal/g de glucosa.

Cabe recalcar que todos los parámetros de velocidad específica de crecimiento, la concentración celular y el rendimiento fueron hallados teniendo en cuenta los datos del Anexo 3. Asimismo, es importante recalcar que estos parámetros fueron calculados teniendo en cuenta el tiempo de fermentación en cada equipo (80 horas en prefermentadores y 120 horas en el biorreactor), tal como se observa en la tabla 5.

Tabla 5: Parámetros para hallar el calor de reacción en los equipos de reacción.

Parámetros	Prefermentador 1	Prefermentador 2	Biorreactor
μ_{neto} (h-1)	0.04	0.04	0.04
X (g bio/m3)	6900.9	6900.02	7530
V (m3)	0.015	0.695	31.969
Y_H (g cel/ kcal)	0.037	0.037	0.033
Q_{reac} (kJ/h)	466.97	21478.36	1218466.304

Posteriormente, se halló el calor por agitación, el cual es igual a la potencia de agitación requerida, la cual fue hallada de la siguiente manera:

1. Primero se halló el diámetro del agitador por medio de la siguiente ecuación y tabla 6, teniendo en cuenta que el volumen de los prefermentadores y del biorreactor son: $0.02 m^3$, $0.75 m^3$ y $35 m^3$, respectivamente.

$$V = \frac{\pi}{4} \times D_T^2 \times H_L \quad (59)$$

Donde:

- V : Volumen del equipo
- D_T : Diámetro del equipo.
- H_L : Altura del líquido.

Tabla 6: Relaciones geométricas para Turbina Rushton. Adaptada de [64]

Turbina Rushton					Deflectores	
$\frac{W_B}{D_i}$	$\frac{L_B}{D_i}$	$\frac{D_i}{D_T}$	$\frac{H_L}{D_T}$	$\frac{C_i}{D_T}$	$\frac{W_{BF}}{D_T}$	Número
0.2	0.25	0.33	1	0.33	0.1	4

2. Luego, se procedió a hallar el número de Reynolds para cada equipo. En tal sentido, la tabla 7 evidencia los diámetros del agitador, y algunos parámetros extras para el cálculo de la ecuación de Reynolds.

$$Re = \frac{N_i \times D_i^2 \times \rho}{\mu} \quad (60)$$

Donde:

- N_i : Parámetro
- D_i : Diámetro del agitador.
- ρ : Densidad del líquido.
- μ : Viscosidad del líquido.
-

Tabla 7: Parámetros para hallar el número de Reynolds.

Parámetros	Prefermentador 1	Prefermentador 2	Biorreactor	Referencias
Di (m)	0.097	0.325	1.17	[Cálculo]
Ni (s^{-1})		3.5		[120]
ρ_{agua} (kg/m ³)		995.647		[120]
μ_{agua} (kg/m.s)		0.0007972		[120]
Re	41129.14	461713.81	5983463.22	[Cálculo]

3. Por último, por medio de la figura 2 se determinó el Np y con la siguiente ecuación se halló la potencia requerida para la agitación en cada equipo, la cual se observa en la tabla 8.

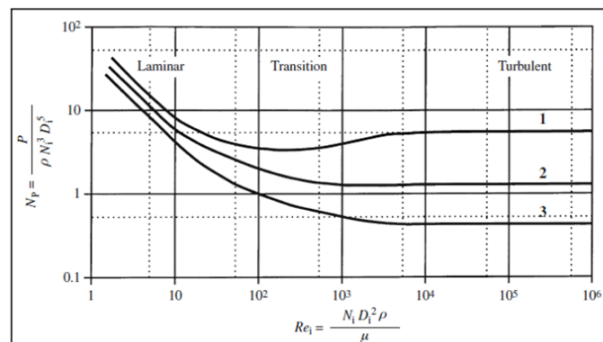


Figura 2. Gráfica para la determinación del Np. [64]

$$P = N_p \times \rho \times N_i^3 \times D_i^5 \quad (61)$$

Tabla 8: Valores de potencia de cada equipo.

Parámetros	Prefermentador 1	Prefermentador 2	Biorreactor
P (kW)	0.0018	0.7739	467.89

Luego, se calculó el calor por perdido por medio de la siguiente ecuación [28].

$$Q_{per} = A \cdot h_c \cdot \Delta T \quad (62)$$

Donde:

- A: Área de transferencia de calor
- h_c : Coeficiente de transferencia de calor

En tal sentido, se tomó la tabla 6 para hallar el diámetro del equipo y por consiguiente el área del biorreactor y los prefermentadores, registrando los resultados en la tabla 9.

Tabla 9: Parámetros para hallar el calor perdido.

Parámetros	Prefermentador 1	Prefermentador 2	Biorreactor	Referencia
A	0.339	3.8	49.36	[Cálculo]
h_c	2.54	2.54	2.54	[28]
ΔT	5	5	5	[Cálculo]
Q_{per} [kJ/h]	4.31	48.37	626.86	[Cálculo]

Posteriormente, se realizó la suma de todos los calores hallados anteriormente para hallar el calor de acumulación.

Anexo 7: Cálculos para el balance de energía en el secador por atomización

Para calcular el balance de energía del secador, se tomó en consideración los flujos de entrada (fluido que sale del cristizador y el flujo de aire caliente) y los flujos de salida (calor

perdido y el flujo de aire húmedo con partículas en polvo de vitamina b12). Es así como, a partir de la siguiente expresión se comenzó a desarrollar este cálculo [83].

$$Q_{feed} + Q_{in} = Q_{loss} + Q_{out} \quad (63)$$

Donde:

- Q_{feed} : Flujo de energía del aire caliente
- Q_{in} : Flujo de energía de la corriente de alimentación
- Q_{loss} : Flujo de energía de la corriente de salida
- Q_{out} : Flujo de energía disipada por el equipo

Para comenzar, se calculó el calor de entrada del aire caliente por medio de la siguiente ecuación y contando con los parámetros establecidos en la siguiente tabla 10.

$$Q_{in} = F_{drying} \cdot Cp_{gas} \cdot T_{in} \quad (64)$$

Donde:

- F_{drying} : Flujo másico del aire (kg/s)
- Cp_{gas} : Calor específico del aire (kJ/kg.°C)
- T_{in} : Temperatura de ingreso del aire (°C)

Tabla 10: Parámetros para el cálculo de calor de entrada del aire caliente.

Datos	Valor	Referencia
Flujo másico del aire (kg/s)	0.791	[83]
Calor específico del aire (kJ/kg.°C)	1.024	[84]
Temperatura de ingreso del aire (°C)	140	[95]
Calor de ingreso (kJ/s)	113.41	[Cálculo]

Luego, se halló el calor de la alimentación, por medio de la siguiente ecuación.

$$Q_{feed} = F_{feed} \times (1 - C_{feed}) \times \Delta H_{vap} + F_{feed} \times (1 - C_{feed}) \times Cp_{feed} \times (T_{wb} - T_{feed}) \quad (65)$$

Donde:

- F_{feed} : Flujo másico de alimentación (kg/s)
- Cp_{feed} : Calor específico del solvente (kJ/kg.°C)
- T_{feed} : Temperatura de alimentación (°C)
- C_{feed} : Concentración de sólidos en la alimentación
- ΔH_{vap} : Entalpía de vaporización del solvente en la alimentación a la temperatura a la cual se evapora el solvente
- T_{wb} : Temperatura de bulbo húmedo

Asimismo, se aplicó la siguiente ecuación para hallar la temperatura del bulbo húmedo.

$$T_{wb} = T_{in} - \frac{(H_{out} - H_{in}) \times \Delta H_{vap}}{Cp_{gas}} \quad (66)$$

Donde:

- H_{in} : Humedad absoluta del aire a la entrada (kg de vapor/m³ de aire)
- H_{out} : Humedad absoluta del aire a la salida (kg de vapor/m³ de aire)

En tal sentido, los pasos para hallar el calor de la alimentación comienza con el cálculo de las humedades absolutas del aire a la entrada y la salida por medio de la siguiente ecuación:

$$H = \frac{P_{vap}}{R_{vap} \times T} \quad (67)$$

Donde:

- P_{vap} : Presión parcial del vapor (Pa)
- R_{vap} : Constante específica del vapor (J/kg.K)

Sabiendo la composición de cada corriente y las condiciones a la cual se trabaja en dicho equipo, se calcularon los datos de presión de vapor; y contando con la temperatura y la constante específica, se halló la humedad absoluta a la entrada y a la salida, tal como se muestra en la tabla 11.

Tabla 11: Parámetros para hallar las humedades absolutas.

Parámetros	Corriente de entrada de aire	Corriente de salida de aire	Referencia
P_{vap}	370066	71548.5	[Cálculo]
R_{vap}		461.5	[84]
T [°C]	140	85	[95]
H [kg_{vap} / m³_{air}]	1.94	0.43	[Cálculo]

Teniendo el valor de las humedades absolutas, se procede a calcular la entalpía de vaporización por medio de la ecuación de Clausius Clapeyron. Así pues, la tabla 12 presenta los datos de los parámetros y el valor de dicha entalpía.

$$\ln\left(\frac{P_2}{P_1}\right) = -\frac{\Delta H_{vap}}{R} \times \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1}\right) \quad (68)$$

Tabla 12: Parámetros para el cálculo de la entalpía de vaporización.

Datos	Valor	Referencias
P_1 (mmHg)	4500.37	[83]
P_2 (mmHg)	760	[83]
T_1 (K)	413	[95]
T_2 (K)	358	[95]
Entalpía de vaporización (kJ/mol)	39.75	[Cálculo]

Contando con todos los datos anteriormente descritos, se procede a calcular la temperatura del bulbo húmedo, para posteriormente, hallar el calor de la alimentación. Es así, como la tabla 13 evidencia el valor de dichos parámetros

Tabla 13: Parámetros para el cálculo de calor de la alimentación.

Datos	Valor	Referencias
Temperatura del bulbo húmedo (°C)	198.57	[Cálculo]
Flujo másico de alimentación (kg/s)	0.04167	[95]
Calor específico del solvente (kJ/kg.°C)	3.765	[84]
Temperatura de alimentación (°C)	49	-
Concentración de sólidos en la alimentación	0.002	-
Entalpía de vaporización del solvente (kJ/mol)	39.75	[Cálculo]
Calor de alimentación (kJ/s)	25.07	[Cálculo]

Posteriormente, se halló el calor de salida del producto con la siguiente expresión y los valores fueron recolectados en la tabla 14.

$$Q_{out} = F_{drying} \times Cp_{gas} \times T_{out} \quad (69)$$

Donde:

- F_{drying} : Flujo másico de aire húmedo y vitamina b12(kg/s)
- Cp_{gas} : Calor específico del aire (kJ/kg.°C)
- T_{out} : Temperatura de salida (°C)

Tabla 14: Parámetros para el cálculo de calor de salida.

Datos	Valor	Referencias
Flujo másico de aire húmedo y vitamina b12 (kg/s)	0.833	[Cálculo]
Calor específico del aire (kJ/kg.°C)	1.024	[83]
Temperatura de salida (°C)	85	[83]
Calor de salida (kJ/s)	72.48	[Cálculo]

Una vez hallados estos calores, se realiza la suma y resta respectiva para hallar el calor perdido, y por medio de la siguiente ecuación se halla el área de transferencia de calor, para posteriormente registrar todos los valores en la tabla 15.

$$Q_{loss} = U \times A_{sup} \times \Delta T_w \quad (70)$$

Donde:

- U : Coeficiente de transferencia de calor global (kW/m².°C)
- A_{sup} : Área de transferencia de calor (m²)
- ΔT_w : Temperatura media logarítmica (°C)

Tabla 15: Parámetros para el cálculo del área de transferencia de calor.

Datos	Valor	Referencias
Calor perdido (kJ/s)	66	[Cálculo]
Coeficiente de transferencia de calor global (kW/m ² .°C)	3.6	[38]
Temperatura media logarítmica (°C)	44.83	[Cálculo]
Área de transferencia de calor (m²)	0.409	[Cálculo]

Por último, se halla la energía eléctrica requerida para calentar el aire hasta 140°C por medio de la siguiente expresión. Los resultados se aprecian en la tabla 16.

$$Q_{calentamiento} = F_{drying} \times C_{p\ gas} \times \Delta T \quad (71)$$

Tabla 16: Parámetros para el cálculo del área de transferencia de calor.

Datos	Valor	Referencias
Flujo másico del aire (kg/s)	0.79	[83]
Calor específico del aire (kJ/kg.°C)	1.024	[84]

Delta de temperatura (°C)	115	[Cálculo]
Calor de calentamiento (kJ/s)	93.16	[Cálculo]

Anexo 8: Cálculos para el dimensionamiento de los equipos de calentamiento y enfriamiento

Para el dimensionamiento de estos equipos, se consideró una geometría de tanque con un serpentín en su interior por donde pasará el fluido caliente o frío. En tal sentido, se tomó como punto de partida el volumen de la solución a esterilizar, para luego determinar el volumen del equipo considerando que el volumen de la solución debe de ocupar aproximadamente el 80% del volumen total del equipo. Teniendo en cuenta esto, se halló el área, el diámetro y la altura de los equipos considerando que la relación diámetro (D) y altura (H) es de $D/H = 0.5$ [28]. Dicho todo esto, la siguiente tabla 17 muestra los valores de los parámetros mencionados.

Tabla 17: Geometría de los equipos de calentamiento y enfriamiento.

Parámetro	Equipos de calentamiento		Equipos de enfriamiento	
	Solución de glucosa	Solución fosfatada	Solución de glucosa	Solución fosfatada
Volumen de la solución a calentar o enfriar (m ³)	15.77	15.7995	15.77	15.7995
Volumen del equipo (m ³)	18			
Diámetro del equipo (m)	2.2545			
Área del equipo (m ²)	3.992			
Altura del equipo (m)	4.51			

Luego, se halló el área de transferencia de calor por medio de la siguiente ecuación junto con los parámetros y resultados obtenidos anteriormente mostrados en la tabla 18. Cabe resaltar

que el valor del coeficiente global de transferencia de calor fue obtenido del estudio de Y. Bertholet y M. Mercante (2009) [28].

$$A_t = \frac{Q}{U_d \times \Delta TML} \quad (72)$$

Donde:

- Q: Calor de calentamiento o enfriamiento
- U_d : Coeficiente global de transferencia de calor
- ΔTML : Temperatura media logarítmica

Tabla 18: Parámetros para determinar el área de transferencia de calor.

Parámetro	Equipos de calentamiento		Equipos de enfriamiento	
	Solución de glucosa	Solución fosfatada	Solución de glucosa	Solución fosfatada
Q (kJ/s)	264.27	272.395	187.27	193.015
U_d (kW/m ² .K)	1.2	1.2	1	1
ΔTML	55.85	55.85	32.26	32.26
A_t (m ²)	3.94	4.06	5.8	5.98

Por último, sabiendo el valor del área de transferencia de calor y el volumen del fluido de enfriamiento o calentamiento, se determinó la longitud de cada serpentín para luego hallar el diámetro de estos por medio de la siguiente ecuación. En tal sentido, la tabla 19 muestra los parámetros empleados y los resultados obtenidos.

$$A_t = 2 \times \pi \times r \times h \quad (73)$$

Donde:

- r: Radio del serpentín
- h: Longitud del serpentín

Tabla 19: Parámetros para dimensionar el serpentín.

Parámetro	Equipos de calentamiento		Equipos de enfriamiento	
	Solución de glucosa	Solución fosfatada	Solución de glucosa	Solución fosfatada
Área de transferencia de calor (m ²)	3.94	4.06	5.8	5.98
Volumen del fluido (m ³)	0.418	0.442	8.2	8.45
Longitud del serpentín (m)	0.106	0.109	1.4	1.4
Diámetro del serpentín (m)	1.18	1.19	1.3	1.35

Anexo 9: CAPEX

Para hallar el costo de la mayoría de los equipos, se emplearon las correlaciones de la tabla 20, y por medio de la siguiente ecuación, se pudo realizar una estimación preliminar del costo de los equipos.

$$C_e = a + bS^n \quad (74)$$

Donde:

- C_e : costo del equipo adquirido.
- a y b: constantes de costo
- S: parámetro de tamaño
- n: exponente para ese tipo de equipos.

Tabla 20: Correlaciones para calcular el costo de equipo comprado [78]

Equipment	Units for Size, S	S _{lower}	S _{upper}	a	b	n	Note
<i>Agitators & mixers</i>							
Propeller	driver power, kW	5.0	75	17,000	1,130	1.05	
Spiral ribbon mixer	driver power, kW	5.0	35	30,800	125	2.0	
Static mixer	liters/s	1.0	50	570	1,170	0.4	
<i>Boilers</i>							
Packaged, 15 to 40 bar	kg/h steam	5,000	200,000	124,000	10.0	1.0	
Field erected, 10 to 70 bar	kg/h steam	20,000	800,000	130,000	53	0.9	
<i>Centrifuges</i>							
High speed disk	diameter, m	0.26	0.49	57,000	480,000	0.7	
Atmospheric suspended basket	power, kW	2.0	20	65,000	750	1.5	
<i>Compressors</i>							
Blower	m ³ /h	200	5,000	4,450	57	0.8	
Centrifugal	driver power, kW	75	30,000	580,000	20,000	0.6	
Reciprocating	driver power, kW	93	16,800	260,000	2,700	0.75	
<i>Conveyors</i>							
Belt, 0.5 m wide	length, m	10	500	41,000	730	1.0	
Belt, 1.0 m wide	length, m	10	500	46,000	1,320	1.0	
Bucket elevator, 0.5m bucket	height, m	10	30	17,000	2,600	1.0	
<i>Crushers</i>							
Reversible hammer mill	t/h	30	400	68,400	730	1.0	
Pulverizers	kg/h	200	4,000	16,000	670	0.5	
Jaw crusher	t/h	100	600	-8,000	62,000	0.5	
Gyratory crusher	t/h	200	3,000	5,000	5,100	0.7	
Ball mill	t/h	0.7	60	-23,000	242,000	0.4	
<i>Crystallizers</i>							
Scraped surface crystallizer	length, m	7	280	10,000	13,200	0.8	
<i>Distillation columns</i>							
See pressure vessels, packing and trays							

Equipment	Units for Size, S	S _{lower}	S _{upper}	a	b	n	Note
<i>Dryers</i>							
Direct contact Rotary	m ²	11	180	15,000	10,500	0.9	1
Atmospheric tray batch	area, m ²	3.0	20	10,000	7,900	0.5	
Spray dryer	evap rate kg/h	400	4,000	410,000	2,200	0.7	
<i>Evaporators</i>							
Vertical tube	area, m ²	11	640	330	36,000	0.55	
Agitated falling film	area, m ²	0.5	12	88,000	65,500	0.75	2
<i>Exchangers</i>							
U-tube shell and tube	area, m ²	10	1,000	28,000	54	1.2	
Floating head shell and tube	area, m ²	10	1,000	32,000	70	1.2	
Double pipe	area, m ²	1.0	80	1,900	2,500	1.0	
Thermosiphon reboiler	area, m ²	10	500	30,400	122	1.1	
U-tube Kettle reboiler	area, m ²	10	500	29,000	400	0.9	
Plate and frame	area, m ²	1.0	500	1,600	210	0.95	2
<i>Filters</i>							
Plate and frame	capacity, m ³	0.4	1.4	128,000	89,000	0.5	
Vacuum drum	area, m ²	10	180	-73,000	93,000	0.3	
<i>Furnaces</i>							
Cylindrical	duty, MW	0.2	60	80,000	109,000	0.8	
Box	duty, MW	30	120	43,000	111,000	0.8	
<i>Packings</i>							
304 ss Raschig rings	m ³			0	8,000	1.0	
Ceramic intalox saddles	m ³			0	2,000	1.0	
304 ss Pall rings	m ³			0	8,500	1.0	
PVC structured packing	m ³			0	5,500	1.0	
304 ss structured packing	m ³			0	7,600	1.0	3
<i>Pressure vessels</i>							
Vertical, cs	shell mass, kg	160	250,000	11,600	34	0.85	4
Horizontal, cs	shell mass, kg	160	50,000	10,200	31	0.85	4

Equipment	Units for Size, S	S _{lower}	S _{upper}	a	b	n	Note
Vertical, 304 ss	shell mass, kg	120	250,000	17,400	79	0.85	4
Horizontal, 304 ss	shell mass, kg	120	50,000	12,800	73	0.85	4
<i>Pumps and drivers</i>							
Single stage centrifugal	flow, liters/s	0.2	126	8,000	240	0.9	
Explosion proof motor	power, kW	1.0	2,500	-1,100	2,100	0.6	
Condensing steam turbine	power, kW	100	20,000	-14,000	1,900	0.75	
<i>Reactors</i>							
Jacketed, agitated	volume, m ³	0.5	100	61,500	32,500	0.8	2
Jacketed, agitated, glass lined	volume, m ³	0.5	25	12,800	88,200	0.4	
<i>Tanks</i>							
floating roof	capacity, m ³	100	10,000	113,000	3,250	0.65	
cone roof	capacity, m ³	10	4,000	5,800	1,600	0.7	
<i>Trays</i>							
Sieve trays	diameter, m	0.5	5.0	130	440	1.8	5
Valve trays	diameter, m	0.5	5.0	210	400	1.9	
Bubble cap trays	diameter, m	0.5	5.0	340	640	1.9	
<i>Utilities</i>							
Cooling tower & pumps	flow, liters/s	100	10,000	170,000	1,500	0.9	6
Packaged mechanical refrigerator evaporator	duty, kW	50	1,500	24,000	3,500	0.9	
Water ion exchange plant	flow m ³ /h	1	50	14,000	6,200	0.75	

Anexo 10: Costos variables del proceso

Para determinar el valor de los costos variables, se hallaron los costos de materias primas, utilidades, consumibles y disposición de efluentes, obteniendo en las tablas 21, 22, 23 y 24 el precio de cada costo por catálogo y considerando que al año se trabajan 335 días y que el total de lotes a obtener al año son 51.

Tabla 21: Costos de materias primas.

Materias primas	Cantidad (ton)	Precio (\$)	Total (\$/año)	Referencias
<i>P. Freudenreichii</i>	2.26E-06	170	8670	[123]
Glucosa	1.96	7843.01	399993.66	[124]
Licor de maceración de maíz	1.34	937.89	47832.55	[125]
KH ₂ PO ₄	0.15	1653.57	84332.16	[126]
(NH ₄)NO ₃	0.088	26.47	1349.99	[127]
CoCl ₂	0.0042	2.158	110.065	[128]
Agua	29.14	843.78	43032.71	[129]
DMBI	2.877E-05	7.19	366.84	[130]
TOTAL			585687.99	[Cálculo]

Tabla 22: Costos de utilities.

Utilities	Cantidad	Precio (\$)	Total (\$/año)	Referencias
Agua de calentamiento (ton)	50.36777	1 458.65	74391.2	[79]
Electricidad (kW-h)	73991	10900.7	555936.52	[131]
TOTAL			630327.7	[Cálculo]

Tabla 23: Costos de consumibles.

Consumibles	Cantidad (ton)	Precio (\$)	Total (\$/año)	Referencias
Metanol	2.706	93.15	4750.56	[132]
Agua	4.0597	117.57	5996.06	[129]
Resina	0.119	154.2	7864.37	[133]
TOTAL			18611.001	[Cálculo]

Tabla 24: Costos de disposición de efluentes.

Disposición de efluentes	Cantidad (ton)	Precio (\$)	Total (\$/año)	Referencias
Tratamiento de agua de proceso	32.676	49.014	2548.719	[78]
TOTAL			2548.719	[Cálculo]

Anexo 11: Cálculo del OPEX

Para calcular los costos de manufactura y los gastos generales se consideraron los porcentajes establecidos en el libro “Plan design and economics for chemical engineers” [79]. En tal sentido, la siguiente tabla 25 muestra dichos porcentajes y los resultados de los parámetros establecidos y del OPEX.

Tabla 25: Costos para el cálculo del OPEX.

Costos	Componentes	VARIABLES	Tipo de costo	Porcentaje	Total (\$/año)	
Costos de manufactura	Costos directos de producción	Materias prima	Variable	-	585687.99	
		Mano de obra operativa	Fijo	10% del OPEX	585687.99	
		Mano de obra directa de supervisión	Fijo	18% de mano de obra operativa	105423.84	
		Utilidades	Variable	-	630327.7	
		Mantenimiento	Fijo	6% del costo total de capital fijo	645217.6	
		Suministros operativos	Fijo	10% del costo de mantenimiento y reparaciones	64521.76	
		Cargos de laboratorio	Fijo	15% mano de obra operativa	87853.2	
		Consumibles	Variable	-	18611	
		Disposición de efluentes	Variable	-	2548.7	
		Patentes y regalías	Fijo	3% del OPEX	175706.4	
		Cargos fijos	Impuestos locales	Fijo	1% del costo total de capital fijo	107536.3
			Depreciación	Fijo	10% del costo de capital fijo para equipos	207076.3
			Alquiler	Fijo	1% de ISBL más OSBL	86029.01

		Seguros	Fijo	0.4% del costo total de capital fijo	43014.5
	Costos generales de la planta	-	Fijo	5% del OPEX	409981.6
Gastos generales		Costos administrativos	Fijo	3% del OPEX	175706.4
		Costos de distribución y venta	Fijo	3% del OPEX	175706.4
		Costos de investigación y desarrollo	Fijo	5% del Main product	620000
		Financiamiento	Fijo	1.01% del CAPEX	108916.99
OPEX					4845553.7

Anexo 12: Análisis económico - Flujo de caja

En la tabla 26 se muestra el desarrollo completo del análisis económico del proyecto.

Tabla 26: Análisis económico - flujo de caja. Adaptada de [72]

Biotechnology Company								
ECONOMIC ANALYSIS								
Owner's Name	Claudia Neyra y Jesdely Velito		Capital Cost Basis	2022				
Plant Location	Lima - Perú		Year					
Case Description	Proceso para la producción de vitamina b12		Units	English	Metric			
			On Stream	8,040 hr/yr	335 day/yr			
REVENUES AND PRODUCTION COSTS			CAPITAL COSTS		CONSTRUCTION SCHEDULE			
	<u>\$M/yr</u>		<u>\$MM</u>	Year	% FC	% WC	% FCOP	% VCOP
Main product revenue	11.6	ISBL Capital Cost	6.1	1	60.00%	0.00%	0.00%	0.00%
Byproduct revenue	0	OSBL Capital Cost	2.5	2	40.00%	0.00%	0.00%	0.00%
Raw materials cost	0.6	Engineering Costs	1.5	3	0.00%	100.00%	100.00%	50.00%

Utilities cost	0.7	Contingency	0.6	4	0.00%	0.00%	100.00%	100.00%
Consumables cost	0	Total Fixed Capital Cost	10.8	5	0.00%	0.00%	100.00%	100.00%
VCOP	<u>1.3</u>			6	0.00%	0.00%	100.00%	100.00%
Salary and overheads	0.7	Working Capital	<u>2.7</u>	7+	0.00%	0.00%	100.00%	100.00%
Maintenance	1.5	CAPEX	<u>13.442</u>					
Interest	0.3							
Royalties	0.2							
FCOP	<u>2.7</u>							
OPEX	<u>4</u>							

ECONOMIC ASSUMPTIONS

Cost of equity	6.07%	Debt ratio	20%	Tax rate	26%
Cost of debt	3.58%			Depreciation method	Straight line
Cost of capital	8%			Depreciation period	10 years

CASH FLOW ANALYSIS

All figures in \$MM unless indicated

Project year	Cap Ex	Revenue	CCOP	Gr. Profit	Depren	Taxbl Inc	Tax Paid	Cash Flow	PV of CF	NPV
1	6.5	0	0	0	0	0	0	-6.5	-6.0	-6
2	4.3	0	0	0	0	0	0	-4.3	-3.7	-9.7
3	2.7	3.9	3	0.5	1.1	-0.5	0	-2.1	-1.7	-11.4
4	0	7.7	4	3.7	2.2	1.6	-0.1	3.9	2.9	-8.5
5	0	7.7	4	3.7	2.2	1.6	0.4	3.3	2.3	-6.2
6	0	7.7	4	3.7	2.2	1.6	0.4	3.3	2.1	-4.1
7	0	7.7	4	3.7	2.2	1.6	0.4	3.3	1.9	-2.2
8	0	7.7	4	3.7	2.2	1.6	0.4	3.3	1.8	-0.4
9	0	7.7	4	3.7	2.2	1.6	0.4	3.3	1.7	1.3
10	0	7.7	4	3.7	2.2	1.6	0.4	3.3	1.5	2.8
11	0	7.7	4	3.7	2.2	1.6	0.4	3.3	1.4	4.2

12	0	7.7	4	3.7	2.2	1.6	0.4	3.3	1.3	5.6
13	0	7.7	4	3.7	2.2	1.6	0.4	3.3	1.2	6.8
14	0	7.7	4	3.7	1.1	2.7	0.4	3.3	1.1	7.9
15	0	7.7	4	3.7	0	3.7	0.7	3.1	1	8.9
16	0	7.7	4	3.7	0	3.7	1	2.8	0.8	9.7
17	0	7.7	4	3.7	0	3.7	1	2.8	0.7	10.5
18	0	7.7	4	3.7	0	3.7	1	2.8	0.7	11.1
19	0	7.7	4	3.7	0	3.7	1	2.8	0.6	11.8
20	0	7.7	4	3.7	0	3.7	1	2.8	0.6	12.4

ECONOMIC ANALYSIS

Average cash flow	3.2 \$MM/yr	NPV	10 years	2.8 \$MM	IRR	10 years	13%
	4.220768						
Simple pay-back period	965 yrs		15 years	<u>8.9 \$MM</u>		15 years	<u>18.2%</u>
Return on investment (10 yrs)	7.92%		20 years	<u>12.4 \$MM</u>		20 years	<u>19.5%</u>
Return on investment (15 yrs)	10.85%	NPV to yr	1	-6 \$MM			
