



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



①① Número de publicación: **2 102 332**

②① Número de solicitud: 9600005

⑤① Int. Cl.⁶: C12P 19/42

//C02F 3/34

C12P 19/42

C12R 1:61

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

②② Fecha de presentación: **03.01.96**

④③ Fecha de publicación de la solicitud: **16.07.97**

④③ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.07.97

⑦① Solicitante/s:
Investigación y Desarrollo Agro-Industrial, S.L.
C/ Alcanar, N° 7 - entresuelo
12004 Castellón, ES

⑦② Inventor/es: **Muñoz Coronado, Salvador**

⑦④ Agente: **Ungría López, Javier**

⑤④ Título: **Procedimiento para la producción de vitamina B₁₂ a partir de residuos contaminantes de las industrias cítrica.**

⑤⑦ Resumen:

Procedimiento para la producción de vitamina B₁₂ a partir de residuos contaminantes de la industria cítrica.

Cultivar la cepa *Propionibacterium shermanii* ATCC 13673 empleando como sustrato jugo recocido de aceite esencial de limón tratado con hidróxido de sodio y suplementado con una fuente de nitrógeno y en presencia de una fuente de cobalto, a un pH comprendido entre 6,5 y 8,2 y a una temperatura comprendida entre 28 y 32 °C.

El procedimiento tiene una doble aplicación industrial: producción de vitamina B₁₂ y aprovechamiento de residuos altamente contaminantes para el medioambiente.

ES 2 102 332 A1

DESCRIPCION

Procedimiento para la producción de vitamina B₁₂ a partir de residuos contaminantes de la industria cítrica.

Campo técnico de la invención

La presente invención se encuadra dentro del campo técnico del tratamiento y aprovechamiento de los efluentes industriales que son nocivos para el medioambiente.

Más específicamente, la presente invención propone un nuevo procedimiento para la obtención de vitamina B₁₂ a partir de los residuos altamente contaminantes provenientes de la industria cítrica.

Estado de la técnica anterior a la invención

Los grandes avances tecnológicos de la época actual en los diferentes campos industriales tiene como consecuencia el deterioro medioambiental debido a la eliminación de grandes cantidades de efluentes y residuos altamente contaminantes que dañan gravemente el medioambiente y los ecosistemas, sin olvidar tampoco la contaminación producida por las aguas y lodos procedentes de los residuos domésticos en las ciudades.

Tiene por lo tanto un gran interés industrial y ecológico el aprovechamiento de todos estos residuos con un doble objetivo, a saber, la reducción significativa del volumen de contaminantes y la transformación de los mismos en sustratos útiles para diferentes finalidades industriales.

En esta línea, la presente invención se dirige a la obtención de concentrados productores de vitamina B₁₂ a partir de residuos o desechos procedentes de las industrias.

Como es bien sabido, la vitamina B₁₂ es una sustancia terapéutica muy importante utilizada para el tratamiento médico de la anemia perniciosa, así como antineurítico, antirreumático, desintoxicante y en otras afecciones humanas. En la industria alimentaria se emplea como complemento alimenticio y en veterinaria como factor de crecimiento.

Un tipo de residuos especialmente abundante y contaminante de la cuenca y zonas mediterráneas es el correspondiente a la agroindustria cítrica y a la agroindustria de la aceituna. Así son especialmente contaminantes y agresivos el jugo recocado que queda como sobrante del proceso de obtención de aceites esenciales de limón, de residuos del proceso de extracción y/o concentración de jugos de naranja, toronja, etc. al igual que el alpechín derivado de los procesos industriales olivareros.

La industrialización de cítricos en España con aproximadamente una producción de 220.000 TM (Zaragoza y Trenor 1989. Congreso de Citricultura de la Plana), entre ellos el limón, proporciona como productos principales: aceite esencial de limón destilado, centrifugado, jugo concentrado, cáscara seca, etc. y como subproducto de la destilación el residuo llamado jugo recocado. La cantidad de este producto, unida a todo los desechos o subproductos del volumen general procesado de los cítricos, es de grandes proporciones.

El jugo recocado o subproducto del limón se utiliza, a su vez, industrialmente en forma eventual para la obtención de ácido cítrico ya sea por

precipitación o fermentación, generando con ello un grave problema de eliminación de residuos y de contaminación ambiental.

El objetivo principal de esta invención es la utilización para la obtención de vitamina B₁₂ de los diferentes residuos de la industria cítrica como sustratos sustituyentes de los diferentes medios sintéticos utilizados hasta ahora, lo cual representa ingresos significativamente más altos que la obtención de ácido cítrico y más si se tiene en cuenta que la producción convencional de vitamina B₁₂ a partir de las fuentes de carbono habituales resulta antieconómica por el precio de los materiales de partida.

Los primeros trabajos de investigación relativos a la obtención de vitamina B₁₂, corresponden a Leviton y Hargrove (Leviton, A. y Hargrove R.A. 1952 Microbiological Synthesis of vitamin B₁₂ Propionic acid bacteria. Industri & Enginf. Chem. Vol 44, No. 11:2651 -2655) a partir de los cuales se ha ido produciendo un continuo desarrollo y perfeccionamiento de los procesos siempre evolutivos en la producción de vitamina B₁₂ con el empleo del inóculo *Propionibacterium Freudenreichii* (ATCC 6207) y la selección de los mejores medios y sustratos. Sin embargo, la relación coste/beneficio sigue sin ser suficientemente rentable desde el punto de vista económico.

Frente a los inconvenientes de la técnica anterior, la presente invención proporciona un procedimiento para la obtención de vitamina B₁₂ a partir de sustratos muy económicos, los desechos de la industria cítrica, al tiempo que permite un aprovechamiento racional de los mismos.

Además la invención tiene un gran interés ecológico y medioambiental al posibilitar una importante reducción de contaminantes agresivos en las zonas de cultivos y su procesado como lo son las zonas mediterráneas.

Descripción detallada de la invención

La presente invención tal y como se indica en su enunciado, se refiere a un procedimiento para la producción de vitamina B₁₂ a partir de los residuos de la industria cítrica. Con esta invención se pretende modificar radicalmente los caminos tecnológicos hasta ahora conocidos para producir vitamina B₁₂ con sustratos novedosos muy económicos y totalmente diferenciados de los convencionales. Dichos sustratos, además, están representando en la actualidad importantes fuentes de contaminación ambiental, por lo que su posible aprovechamiento tiene gran interés ecológico.

Más específicamente, la presente invención se basa en la adecuación de los efluentes de la industria cítrica particularmente del jugo recocado del aceite esencial, como sustrato idóneo en los procesos de fermentación anaeróbica y aeróbica conducentes a la obtención de la vitamina B₁₂.

La composición del sustrato propuesto presenta un análisis típico medio como sigue:

La composición media del jugo recocado de la industria cítrica:

Manganeso	1,5 ppm
Cobre	0,85 ppm
Magnesio	8,0 ppm
Hierro	16,85 ppm
Cinc	4,2 ppm

Cromo	< 3,0 ppm
Fósforo	15,95 mg/100 ml
Azúcares totales	1,5 %
Nitrógeno	0,06621 g/100 ml
Acidez	5,426 %
Aceite esencial	0,02 % v/v
Grado Brix	8,6 %
pH	2,5

Como puede observarse del anterior análisis, el substrato es bajo en fósforo y nitrógeno, por lo que con solo corregir estas deficiencias se tiene un buen medio para fermentación.

El solicitante, tras el desarrollo de sus trabajos de investigación, pudo comprobar que el microorganismo más adecuado para los fines de la presente invención era el *Propionibacterium shermanii* ATCC 13673.

El procedimiento de la invención por tanto, se llevó a cabo empleando este microorganismo y utilizando, como medio base, jugo recocido de limón tratado con NaOH aproximadamente (500 ml/l).

Este medio se suplementa con agua de cocimiento de maíz como fuente adicional de nitrógeno (en una cantidad adecuada para proporcionar aproximadamente 315 mg de N₂/100 ml, lo que equivale a unos 60 ml/l).

El proceso de fermentación se lleva a cabo inoculando con una suspensión del microorganismo al 10% v/V aproximadamente durante unos 3 días.

Las condiciones de fermentación más adecuadas son:

- 3 días anaerobiosis
- 3 día aerobiosis, con agitación

El control del crecimiento del microorganismo en el medio se lleva a cabo por métodos convencionales, por ejemplo, el de Carpenter (Carpenter, P.L. 1969. Microbiología, 2a. Edición Edit. Interamericana pp 205).

La separación de las células y caldos se lleva a cabo por centrifugación, preferentemente a 12.000 rpm durante unos 20 minutos.

La presencia y contenido de vitamina B₁₂ se determina en las células en base a la metodología propuesta por Fisher (Fisher, R.A. 1954, Rapid spectrophotometric determination of vitamin B₁₂ in microbial material. J. Agr. Food Chem. 1: 951-953) y, en caldos, por el método de Rudkin (Rudkin, G.D. y Taylor, R.J. 1952. Chemical method for determining vitamin B₁₂. Anal. Chem. 24: 1155-1156).

El tratamiento con NaOH del jugo recocido tiene como finalidad proporcionar mejores rendimientos de vitamina B₁₂ y menos problemas de precipitación.

Evidentemente, es preciso llevar a cabo el proceso en presencia de una fuente de cobalto. Así, el medio se suplementa con CoCl₂.6H₂O (aproximadamente unos 5 mg/l).

El pH del medio de fermentación debe controlarse dentro del rango de 6,5 a 8,2 estando los niveles óptimos entre 7,0 y 7,5. Deben evitarse los pH muy alcalinos o muy ácidos para evitar la degradación del producto terminal en el primer caso y la inhibición del crecimiento del organismo

con el segundo.

La temperatura de fermentación debe mantenerse entre 28° y 32°C, siendo la temperatura preferida de 29-30°C.

Puede resultar especialmente ventajoso llevar a cabo el proceso de fermentación en presencia de 5,6-dimetilbencimidazol, que es un precursor de la vitamina que según Janicki (Janicki, J. y col. 1954, Acta Microbiol. Pol. 3:3) puede actuar como potenciador acelerante del proceso. De hecho el solicitante ha podido comprobar que existe una relación directa entre la adición de este compuesto y la producción de vitamina, la cual se ve claramente aumentada, especialmente en condiciones anaerobias.

También puede ser conveniente complementar el agua de cocción de maíz, como fuente de nitrógeno, con NH₄OH. Puede también incorporarse un azúcar (dextrosa, por ejemplo) como fuente adicional de carbono.

Modos de realización de la invención

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, los cuales no deben considerarse limitativos de su alcance.

Ejemplo 1

Este ejemplo se ha elaborado para ilustrar el procedimiento de obtención de vitamina B₁₂ de la presente invención, partiendo de los efluentes de la industria citrícola.

Se preparó un medio mezclando homogéneamente 1 litro de jugo recocido de limón, 60 ml de agua de cocimiento de maíz, 1,5 g de solución acuosa saturada de hidróxido amónico, 20 mg de CoCl₂.6H₂O o e hidróxido de sodio en la cantidad necesaria para alcanzar un pH de 6,7. Seguidamente se añadió dextrosa al 10 % p/v y 10 mg/l de bencimidazol.

Se inoculó este medio con *Propionibacterium shermanii* ATCC 13673 al 10 % v/v.

Seguidamente, se llevó a cabo el proceso de fermentación a una temperatura de 29-30°C con una primera fase anaerobia (3 días) y una segunda fase aerobia (3 días) con agitación.

Tras la fermentación se separaron las células y caldos por centrifugación a 12.000 rpm durante unos 20 minutos.

Mediante este proceso, pudieron obtenerse 20,5 mg de vitamina B₁₂.

Ejemplo 2

Este ejemplo se ha elaborado con el fin de comparar la alta rentabilidad económica del proceso de la presente invención. Se efectúa un análisis comparativo de costes en los procesos convencionales de obtención de vitamina B₁₂, con los del proceso de la invención.

Como método convencional se emplea el de Leviton y Hargrove, descrito en Inds. & Enging Chem. Vol. 44. No. 11: 2651-2655. Se exponen a continuación los resultados de los diferentes experimentos:

Experimento 1:

Medio A: 200 ml con 4 ml de lactato de sodio (0,6 g de ácido Láctico por ml), 2 g de N-Z Amina (Tipo A) 0,6 g de extracto de levadura, 16 CoCl₂

Tiempo (horas)	24	48	96	144
Vitamina B ₁₂ (mg/l)	0,10	0,02	0,0	0,02

En este experimento la fermentación se llevó a cabo con aireación.

Experimento 2

Medio: El mismo del experimento 1

Tiempo (horas)	24	48	96	144
Vitamina B ₁₂ (mg/l)	0,22	0,28	0,34	0,56

Este experimento se llevó a cabo en condiciones anaerobias (pasando nitrógeno a través del tubo de fermentación).

Para trasladar los resultados obtenidos anteriormente a mayor escala, los mencionados autores llevaron a cabo otros dos experimentos paralelos empleando 2,5 l de medio, con la siguiente composición por litro: 10 g de N - Z Amina, 5 g de extracto de levadura, 3 g de (NH₄)₂SO₄, 20 g de ácido láctico, 9,1 g de NaOH y 4 mg de CoCl₂ 6H₂O;

Experimento 3

Tiempo (horas)	20	42	70	94
Vitamina B ₁₂ (mg/l)	0,0	1,0	1,0	1,0

Experimento 4

Tiempo (horas)	20	42	70	94
Vitamina B ₁₂ (mg/l)	0,0	0,9	1,1	1,0

Este experimento se concluyó en condiciones de fermentación aerobia.

El costo de los reactivos empleados en el medio o sustrato de los experimentos anteriores 3 y 4, alcanza un total de US \$ 120.56 para cada uno de ellos (Cifra obtenida por cálculos proyectados a un volumen de 2,5 litros y derivados de cada uno de los precios actuales de los nuevos reactivos utilizados en el medio o sustrato láctico.- Consulta de precios en el anuario Biochemical Organic Compounds for Research Diagnostic reagents. Sigma Chemical Co. 1995-). Si se proyectan estas cifras a un volumen semi-industrial de 50 litros de fermentación, el costo de los reactivos que componen el sustrato utilizado en cada experimento alcanza un valor de US\$2411.17.

Se estima que en el precio medio del gramo de vitamina B₁₂ en forma purificada fluctúa alrededor de los 50.00 \$US. En el catálogo Sigma 1995 el valor o precio para un gramo, es de 133.00 \$US en presentación de frascos de 100 mg y de \$77.60 US para la Cyanocobalamina (V 6629) en frascos de 250 mg.

La comparación a simple vista de estos datos pone de manifiesto la no rentabilidad del método convencional de Leviton y Hargrove.

Este proceso convencional está claramente mejorado por Speedie y Hull (Speedie. J.D. y Hull, G.W. 1960 Patente US 2.951.017) y Pierrel (Pierrel S.p.A. 1965, Patente Británica 1.007.972). El esquema de obtención de vitamina B₁₂ por este proceso mejorado es el siguiente:

Propionibacterium shermanii Liofilizado con suero de leche
cultivo madre

5 *mantenimiento cultivo* tubo de prueba sustrato(a) días incubación a 30°C

10 *1a. etapa cultivo semilla* frasco 2 lts. Erlenmeyer con 0,4 l de sustrato(b) 2 días incubación a 30°C sin agitar

15 *2a etapa cultivo semilla* fermentador 30 lts. con 10 lts. sustrato (c), incubado 24 horas a 30°C anaerobicamente, pH 6,5 con solución de NH₄OH

20 *cultivo principal* fermentador 500 lts. con 340 lts. sustrato (d) esterilización 40 min. a 120°C, inoculado con 7 lts. semilla cultivo 2a. etapa, incubado a 30°C 80hr anaerobicamente agitación lenta, 88hr. aeróbicamente (2 m³/hr con agitación) pH ajustado con NH₄OH acuoso.

25 Substrato (a): Tryptone 10 g., extracto de levadura 10 g. jugo de tomate filtrado 200 ml., agar 15 g. a 1 litro de agua.

Substrato (b): igual anterior sin agar.

30 Substrato (c): Licor saturado de maíz 20 g., dextrosa 90 g. a 1 lto. agua.

Substrato (d): Licor saturado de maíz 40 gr., dextrosa 100 g., Cloruro cobalto 20 mg. a 1 litro agua.

35 Mediante este procedimiento, se consiguen producciones de vitamina B₁₂ del orden de 25-45 mg/l aproximadamente.

El costo de los reactivos empleados en los dos últimos sustratos (c) y (d) es aproximadamente US\$ 1.591,23.

40 Para fines comparativos, se establece arbitrariamente que el costo o valor inicial del jugo recocido, como desecho industrial, empleado en el procedimiento de la invención, es de US\$ 0,008 por litro.

45 Si llevamos los costos expuestos a valores de, por ejemplo, 340 litros de volumen de fermentación, se tiene:

50 Proceso convencional, 340 lts. con un promedio de 32 mg/litro para un total producido de 10,880 mg y un costo de US\$ 1.591,23 Relación económica = 6.83. (2,75%)

55 Proceso de la invención, 340 lts. con un promedio de 20.562 mg/litro para 6,991 mg y un costo de US\$ 28.17. Relación económica = 248.17 (97.25%).

lo que demuestra claramente la rentabilidad económica del procedimiento de la presente invención.

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la producción de vitamina B₁₂ a partir de residuos de la industria citrícola, cuyo procedimiento se **caracteriza** por cultivar la cepa *Propionibacterium shermanii* ATCC 13673 empleando como substrato jugo recocado de aceite esencial de limón tratado con hidróxido de sodio y suplementado con una fuente de nitrógeno y en presencia de una fuente de cobalto, a un pH comprendido entre 6,5 y 8,2 y a una temperatura comprendida entre 28 y 32°C, y aislar la vitamina B₁₂ del medio.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la fuente de nitrógeno es

agua de cocción de maíz, opcionalmente complementada con NH₄OH.

3. Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** porque la fuente cobalto es CoCl₂·6H₂O.

4. Procedimiento según las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el cultivo se lleva a cabo en presencia de 5,6-dimetilbencimidazol como potenciador.

5. Procedimiento según las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque se incorpora adicionalmente al medio de cultivo un azúcar como fuente de carbono.

6. Procedimiento según la reivindicación 5, **caracterizado** porque dicho azúcar es dextrosa.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁶: C12P 19/42, C02F 3/34 // (C12P 19/42, C12R 1:01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	GB-851601-A (BENCKISER G.m.b.H. CHEMISCHE FABRIK) 19.10.60 * Página 1, líneas 9-28; página 3, líneas 87-94; ejemplos *	1-6
Y	EP-87920-A (NIPPON OIL Co. Ltd.) 07.09.83 * Página 4, línea 32 - página 5; página 9, línea 13 - página 10, línea 28 *	1-6
Y	US-2951017-A (SPEEDIE et al.) 30.08.60 * Ejemplos *	3
A	GB-866488-A (HOFFMANN-LA ROCHE Y CO) 26.04.61 * Página 1, líneas 24-127 *	1-6
A	GB-1007972-A (PIERREL S.P.A.) 22.10.65 * Todo el documento *	1-6

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
14.04.97

Examinador
A. Polo Díez

Página
1/1



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① N.º de publicación: 2 102 332 A1

② Número de solicitud: 9600005

⑤ Int. Cl.⁶: C12P 19/42

//C02F 3/34

C12P 19/42

C12R 1:61

CORRECCION DE ERRATAS DE FOLLETO DE PATENTE

Pág./INID	Errata	Corrección
1, ⑤	C12P 19/42 //C02F 3/34 C12P 19/42 C12R 1:61	C12P 19/42 C02F 3/34 //(C12P 19/42 C12R 1:01)