

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

---



METODOS DE FABRICACION DE LA VITAMINA B-12  
(MONOGRAFIA)

TESIS

QUE PRESENTA

GUADALUPE RUIZ MORIMOTO

PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO

1972

8

8

3



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PRESIDENTE	PROF. Francisco Giral González
V O C A L	" José Ma. García Sainz
SECRETARIO	" Federico García Jiménez
1er. SUPLENTE	" Ma. del Carmen Rivera Muñoz
2do. SUPLENTE	" Guillermo Jiménez Molina

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA: Bibliotecas

NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DEL SUS-

TENTANTE

Guadalupe Ruiz Morimoto

NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DEL ASE--

SOR DEL TEMA.

Federico García Jiménez.

A MI ABUELITA Y  
TÍOS, A QUIEN TODO  
SE LOS DEBO.

CON RESPETO Y CARÍO  
A MI MADRE  
Y HERMANA

A MIS MAESTROS Y AMIGOS

METODOS DE FABRICACION DE LA VITAMINA B<sub>12</sub>

( M O N O G R A F I A )

- 1    Introducción
- 2    Generalidades
- 2.1. Historia
- 2.2. Estructura
- 2.3. Química de la vitamina
- 2.4. Métodos de análisis
- 3    Métodos de fabricación
- 4    Conclusiones
- 5    Bibliografía

## I N T R O D U C C I O N .

La producción de la vitamina B<sub>12</sub> por fermentación, con microorganismos en cultivos bajo condiciones aerobias o anaerobias, ha creado un considerable interés comercial.

Desde su aislamiento en 1948, la producción de esta vitamina ha llegado a ser una de las más importantes industrias de la fermentación. Originalmente la vitamina B<sub>12</sub> fué extraída del hígado de buey, actualmente se obtiene casi exclusivamente como un producto de fermentación microbiológica primaria o simultáneamente con ciertos antibióticos.

Las preparaciones altamente purificadas son usadas en el tratamiento de ciertas anemias megaloblásticas y con deficiencias nutricionales. En la actualidad se emplea en forrajes y complementos alimenticios.

En el presente trabajo se ha reunido información acerca de los principales métodos para la obtención de la vitamina, y se han investigado la mayoría de los procesos desarrollados -- con el fin de aportar datos que puedan ser utilizados cuando se llegue a producir en nuestro país.

## 2.- G E N E R A L I D A D E S.

### 2.1.- H I S T O R I A.

Todavía a principios de este siglo se creía que bastaba una dieta balanceada de carbohidratos, grasas, proteínas y ciertas sustancias minerales para constituir un alimento completo o, dicho en otra forma, que las enfermedades eran causadas únicamente por microbios y no por deficiencias en la alimentación. Pero subsecuentes investigaciones demostraron que existían algunas sustancias orgánicas que eran esenciales para mantener un buen estado de salud en el hombre y en los animales, y de las que antes no se tenía conocimiento debido entre otras razones, a que intervenían en cantidades muy pequeñas. A dichos compuestos se les dió el nombre genérico de "vitaminas" y, dependiendo generalmente del orden cronológico de su descubrimiento, fueron siendo identificadas con letras -- del alfabeto, en orden progresivo "A", "B", "C".... etc. Después, poco a poco se llegó a conocer cada vez mejor su constitución química y, por lo tanto, la nomenclatura correspondiente, pero por razones de abreviación y debido a que muchas veces se trata de compuestos diferentes con la misma actividad fisiológica (v.g.  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  tocoferoles de la vitamina E) o de un conjunto de sustancias distintas (el complejo "B") han conservado su antiguo nombre.

Considerándose como un ente fisiológico más que un ente químico se miden muchas veces en "unidades de actividad fisiológica" y no en gramos aunque generalmente se puede establecer una correspondencia entre las dos unidades (v.gr.:... una unidad de vitamina A equivale a 0.6 mg. de caroteno).

La vitamina B<sub>12</sub> fué obtenida en un principio del hígado de buey, el fraccionamiento del hígado y la obtención del factor antianemia perniciosa fué lograda por Cohn y colaboradores (30) y su proceso llegó a ser la base de cierto número de preparaciones comerciales de extracto de hígado.

La precipitación con alcohol al 95% es efectiva en la extracción de la vitamina del hígado crudo, el principio activo pudo precipitarse con ácido fosfotúngstico. Laland y Klen en Noruega la extrajeron del hígado desmenuzado con acetona fría al 50%.

Más tarde con técnicas nuevas pudo ser extraído el principio activo con una solución acuosa de fenol (aproximadamente con 15% de agua).

Aún con los conocimientos hasta ahora disponibles es casi imposible aislar la vitamina B<sub>12</sub> incluso de las fuentes más ricas sin emplear técnicas cromatográficas.

Fué en 1946 cuando Emery W.B. y Parker L.F.H. (41) publicaron la purificación de una fracción de hígado. En 1948 los laboratorios Merck publicaron el aislamiento de una subs-



tancia roja cristalina la cual llamaron vitamina B<sub>12</sub> (107). Poco tiempo después los laboratorios Glaxo anunciaron la separación de la misma substancia (129, 130, 131) las separaciones de Lester fueron reportadas también por Ellis, Petrow y Snook -- (39) y por Preece, Page, Stokstard y Jukes (104), la vitamina B<sub>12</sub> está estrechamente ligada con el factor proteina animal - descrito por Jukes y colaboradores (75).

El descubrimiento de que la vitamina puede ser separada del cultivo de *Streptomices griseus* (109) hizo posible que la vitamina pudiera ser producida comercialmente a escasos dos años de su aislamiento y a un costo menor que la obtenida por extracción del hígado. Actualmente el principal método de obtención de ésta vitamina es microbiológico. La vitamina B<sub>12</sub> - se ha encontrado también en la naturaleza. Muchos microorganismos solamente producen lo suficiente para sus propias necesidades, pero algunas bacterias y acetomicetes producen más de lo que necesitan para su propio crecimiento bajo condiciones apropiadas de cultivo.

Robbins, W. J. y colaboradores encontraron, usando un ensayo muy sensitivo con *Englera gracilis*, en extractos acuosos de suelo, en la leche y aún en el agua potable de algunos lugares, pequeñas cantidades de vitamina B<sub>12</sub>. Cowey la encontró en el agua de mar, observando que en invierno se obtenía mayor cantidad.

Es probable que la vitamina este presente en forma liga

da dentro de las células de las plantas superiores. Se ha tratado de obtenerla de los extractos crudos, pero esto no se ha logrado satisfactoriamente; Se hicieron ensayos analíticos empleando *Lactobacillus leichmanii* pero éste es sensible a la -- tiamina y a otros deoxiribósidos, entonces se trataron los -- extractos con un álcali caliente con el cual se destruye la -- vitamina B<sub>12</sub> y por consiguiente la diferencia encontrada se -- debe a la vitamina B<sub>12</sub>, entonces se encontró que la vitamina--provenia (presumiblemente) de una fermentación bacterial y -- fueron Robbins y Col. (112) quienes detectaron trazas de vitamina B<sub>12</sub> en las raíces de algunas plantas, en legumbres fué -- encontrada por M. Kliewer y Evans (79,80).

J. Ford y Hunter (48) encontraron que las algas mari--nas azul-verde, café y roja sintetizaban la vitamina B<sub>12</sub> , -- también supusieron estos autores que un compuesto que contie--ne cobalto con funciones metabólicas similares se encontraba--en plantas superiores.

La vitamina B<sub>12</sub> se ha encontrado prácticamente en to--dos los tejidos y productos animales, sin embargo, esta no se origina en el organismo sino que algunos animales la adquieren al ingerir agua o algún alimento que la contiene, otros como--los roedores la pueden extraer del suelo, los seres humanos --ingieren la vitamina B<sub>12</sub> ya sintetizada y en el intestino ocurre la absorción. La síntesis natural se presenta en la panza de los ruminantes. Aunque se ha detectado en los tejidos se en

contró que el hígado es el principal depósito de almacenaje - en la mayoría de las especies.

En estos casos el aislamiento ha sido logrado por cromatografía pero no ha podido aislarse completamente pura y, - además, por las cantidades tan pequeñas en las que se encuentra, no es costeable para su obtención en escala industrial.

En la siguiente tabla se encuentran algunos productos- animales que contienen la vitamina B<sub>12</sub>.

	<i>μg</i> /100g de prod. fresco
Músculo de res	2-8
Riñón " "	20-50
Corazón " "	25
Hígado " "	50-130
Cerdo	0.1-5
Ternera	2
Pierna de carnero	8
Leche (vaca)	0.2-0.6
(cabra)	0.01
Queso	1.4-3.6
Hígado de pollo	8
Yema de huevo	1.2 (por yema)
Clara	0
Arenque (total)	11
(filete)	13
(hígado)	34

µg/100g de prod. fresco

Harina de pescado	10-25
Sustancias solubles de pescado	15-40
Carne deshebrada	3.5

Se ha encontrado la vitamina B<sub>12</sub> en el lodo de drenaje municipal (debido, posiblemente, a la materia fecal (10, - 11, 22) también se han encontrado análogos de la vitamina en materias fecales de pollos y puercos.

La necesidad de obtener un mayor rendimiento de la vitamina ha hecho que se desarrolle el cultivo de microorganismos aumentando así la fuente de la vitamina.

La vitamina B<sub>12</sub> es la única vitamina que se obtiene - por microorganismos, principalmente bacterias y actinomicetes, y no por extracción de plantas superiores. Se han publicado un gran número de artículos que describen procesos de fermentación que utilizan una gran variedad de organismos, pero so lamente algunos géneros han probado tener uso industrial para la obtención exclusivamente de vitamina B<sub>12</sub> o, conjuntamente con otros antibióticos.

## 2.2 E-S-T-R-U-C-T-U-R-A .-

Por análisis de emisión espectrofotométrica se mostró que la vitamina B<sub>12</sub> es un complejo de coordinación que contiene cobalto, nitrógeno y fósforo (108) y como en la molécula - la parte esencial es el cobalto se le dio el nombre de cobalamina, y más particularmente cianocobalamina debido al grupo - ciano que se encuentra coordinado al cobalto (76, 69)

Los resultados combinados del trabajo de degradación - aportan los siguientes datos de la vitamina B<sub>12</sub>, el factor an - tianemia perniciosa tiene como fórmula parcial (Fig. I) la -- fórmula molecular corresponde a C<sub>61-64</sub>H<sub>84-92</sub>O<sub>13-14</sub>N<sub>14</sub>PCo, de - acuerdo con los datos publicados por Brink, Wolf, Kaczka, Ko - nuszy, Wood y Folkers; (2, 21).

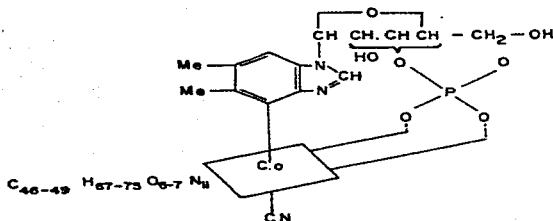


FIG. I

Una parte principal de la estructura (I) es el residuo de 5,6 dimetil-1-( $\alpha$ -D-ribofuranosil) benzimidazol (63) fos - fato, el cual puede estar completamente esterificado.

La vitamina contiene grupos ácidos libres, el nucleótido benzimidazol ha sido aislado de los productos de la hidrólisis ácida de la vitamina B<sub>12</sub> (24) como sal de bario y como ácido libre (78).

El punto de unión del fosfato a la cadena del azúcar, - el nucleosido correspondiente, ha sido aislado de la hidrólisis ácida (19) y la estructura del 5,6 dimetil-1- ( $\alpha$  -D-ribofuranosil) benzimidazol ha sido confirmada por síntesis (66); y el 5,6 dimetil benzimidazol ha sido separado de los productos de la hidrólisis ácida de la vitamina (8, 18).

El amoniaco y el D<sub>g</sub>-1 aminopropan-2-ol (151) son también producidos por hidrólisis ácida y, según Chargaff, Levine, Green y Kream (29), dos moles de alcanolamina y 4-5 moles de amoniaco se forman de cada mole de vitamina después de la hidrólisis ácida con ácido clorhídrico 6N durante 6 h. a 100°C en un tubo sellado. Por otro lado, Cooley, Davies, Ellis, Petrov y Sturgeon (31) encontraron solamente una mole de aminopropanol y 6 moles de amoniaco. Bajo condiciones de hidrólisis específica Cooley y colaboradores habían obtenido resultados similares, pero usando ácido 11N, obteniendo aproximadamente 2 moles de aminopropanol por molécula. Aunque actualmente no se tiene una explicación satisfactoria de las anomalías de los resultados con ácidos fuertes, se llega a la conclusión de Cooley y colaboradores de que solamente está presente un -

residuo de aminopropanol. La hidrólisis de la vitamina con hidróxido de bario saturado de 5 moles de amoniaco por molécula.

De las otras fracciones de la estructura parcial (I), - la presencia del grupo ciano fué deducido de los resultados de oxidación con permanganato (20); y la ligadura coordinada entre el nitrógeno (3) del núcleo de benzimidazol y el átomo de cobalto fué supuesta por espectroscopía (9). La vitamina B<sub>12</sub> - puede ser convertida en otras sustancias de la serie de cobalaminas, vitamina B<sub>12b</sub> (hidroxocobalamina) y vitamina B<sub>12c</sub> (nitrítocobalamina) al reemplazar el grupo ciano (77, 126).

Los grupos ácidos son esterificados cuando se emplean soluciones alcohólicas de ácidos para la hidrólisis de la vitamina. El coeficiente de partición ha sido empleado por Shmed, Ebnöther y Karrer (121) en una prueba para separar los componentes de la mezcla de pigmentos esterificados obtenida de la hidrólisis de vitamina B<sub>12</sub> con ácido clorhídrico.

Mediante una medición de la suceptibilidad magnética - (35, 54 y 144) y estudios polarográficos (34, 128), se ha demostrado que el cobalto se encuentra en forma trivalente en la vitamina B<sub>12</sub> y la estabilidad del complejo, por ejemplo a agentes tales como sulfuro de hidrógeno (77), a la hidrólisis ácida y al cambio con cobalto radioactivo (43,5,13), indican que el cobalto está unido muy estrechamente. La posibilidad de que la vitamina B<sub>12</sub> pudiera ser una cobalto-porfirina fué conside

rada por McConnel, Overell, Petrow y Sturgeon (90a), pero el espectro de absorción ultravioleta de la vitamina no da la banda de Soret característica de las porfirinas (87). Oxidaciones controladas de porfirinas con ácido crómico se conoce que producen maleinimidas (93, 148, 149, 94), pero no fué posible obtener estas por oxidaciones similares de la vitamina (El Dr. J.G. Buchanan, trabajando en Cambridge, demostró que las maleinimidas pueden ser detectadas convenientemente sobre cromatogramas de papel, por exposición del papel al cloro o rociándolo con agua de bromo en solución acuosa saturada, removiendo el exceso de halógeno y después tratándolo con una solución de yoduro de potasio-almidón. Un método similar de detección de péptidos y compuestos similares ha sido descrito por Rydon y Smith (116).

La estructura completa fué conocida cerca de 60 años después de su aislamiento, por cristalografía de rayos X, por la Dra. Dorothy C. Hodgking (60, 61, 62, 63), quién recibió el premio Nobel en Química por su trabajo realizado entre los años 1950 - 1962.

La molécula se puede dividir en dos grandes porciones, reconocidas como "grupo planar" y "nucleativo". (Fig. II).



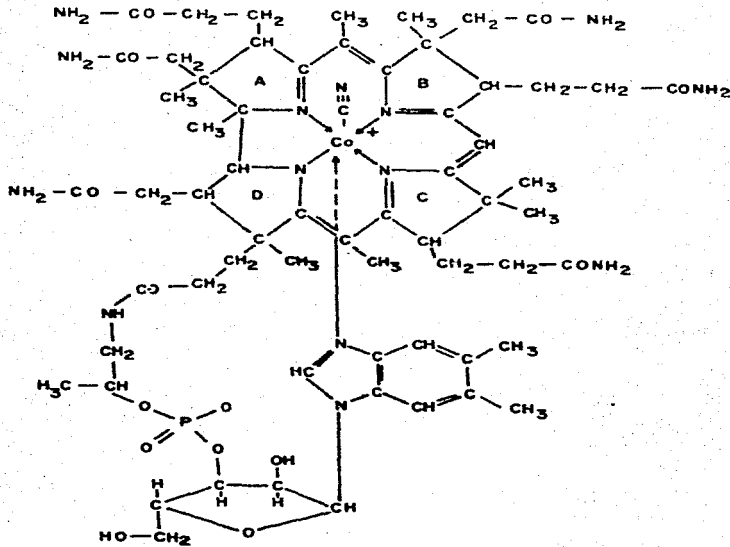


Fig. II - Cianocobalamina

El último se encuentra en un plano casi en ángulo recto con respecto al primero, el cual soporta un anillo parecido al de las porfirinas. La configuración en el espacio se observa mejor en la Fig. III, el átomo de cobalto está unido a cuatro anillos reducidos de pirrol formando un macroanillo, - tres de las cuatro uniones entre anillos toman la forma meso- o de un puente de átomos de carbono, característico de las porfirinas, en el cuarto lugar se tiene una unión directa entre los dos átomos  $\alpha$  de los anillos D y A.

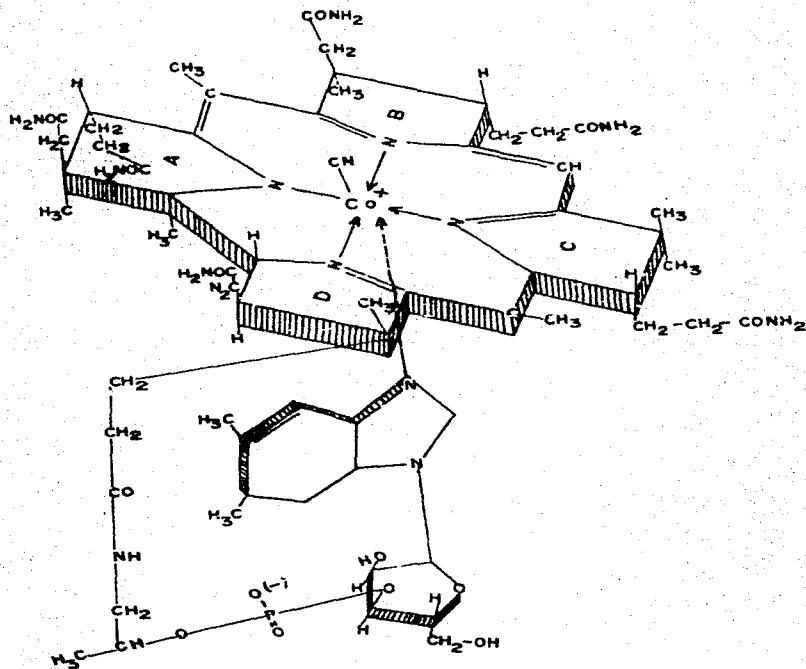


Fig. III Cianocobalamina en el espacio.

El macroanillo contiene seis dobles ligaduras conjugadas que constituyen el único sistema resonante, seis de los diecinueve átomos de carbono que forman el macroanillo están completamente substituídos por grupos metilo o cadenas más largas, las cuales son residuos de acetamina o propionamida. Las cadenas largas y cortas se encuentran en el mismo orden que en el caso de las uro-porfirinas III.

La diferencia entre los nucleótidos del ácido nucleico y el que se encuentra en este caso consiste en que este último no contiene una purina o pirimidina, sino que la base es 5,6-dimetil benzimidazol. El azúcar es ribosa, pero la unión glucosido es  $\alpha$ , diferente de los ácidos nucleicos (los cuales contienen ligadura  $\beta$ ). La ribosa está fosforilada a C3; el fosfato está también unido, a través de una ligadura de amida, con la cadena del ácido propiónico sobre el anillo D. Finalmente, se encuentra coordinado a uno de los átomos de nitrógeno del benzimidazol, haciendo así un segundo puente entre las dos partes de la molécula. La tercera función hidróxido del grupo fosfato no está esterificada.

La vitamina B<sub>12</sub> es, de hecho, una sal inerte; la carga negativa sobre el átomo de fósforo se neutraliza por una carga positiva sobre la coordinación del cobalto del complejo.

## 2.2.1.- NOMENCLATURA.

La primera comisión reunida durante el primer Simposium Europeo sobre vitamina B<sub>12</sub> y el factor intrínseco en la ciudad de Hamburgo en mayo de 1956, publicó un reporte sobre un sistema tentativo de nomenclatura. Los comités de la Sociedad Química y Bioquímica adoptaron el sistema de "Hamburgo" con algunos cambios en los nombres triviales y en la numeración de los compuestos; la comisión sobre Nomenclatura de Química Orgánica de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada, celebrada en julio de 1957, adoptó este sistema para la vitamina B<sub>12</sub>, excepto por cambios en la numeración basados en el Índice universal de sistemas de anillos. Este sistema presentó desventajas al aplicarlo a las moléculas complejas del grupo de la vitamina B<sub>12</sub>. Se hizo una combinación de números relacionándolos --- aproximadamente, a las porfirinas de origen biogénico similar. Por otra parte, una ligera modificación del sistema de la vitamina B<sub>12</sub> pudo servir para ambos grupos de compuestos, cuando la Comisión de nomenclatura dio por terminadas las reglas en septiembre de 1959, cambiando nuevamente la numeración.

El resultado final fué que la numeración empieza en el anillo "A" en el punto donde está unida directamente al anillo "D" y continúa en los carbonos siguientes alrededor del macroanillo hasta el 19; finalmente, los nitrógenos de los anillos llevan los números del 21 al 24.

La omisión del número 20 se explica por la necesidad de guardar este número para el carbono meso adicional de las porfinas.

Las reglas definitivas fueron publicadas en 1960<sup>70</sup>, en donde se le dá el nombre de cianuro de  $\alpha$  (5,6-dimetilbenzimidazoil) cobalamina a la cianocobalamina o vitamina B<sub>12</sub>.

En los compuestos derivados de la vitamina B<sub>12</sub> se usan 6 nombres triviales. Estos compuestos contienen el grupo "corrín" y se denominan corrinoídes.

(IV) Corrín

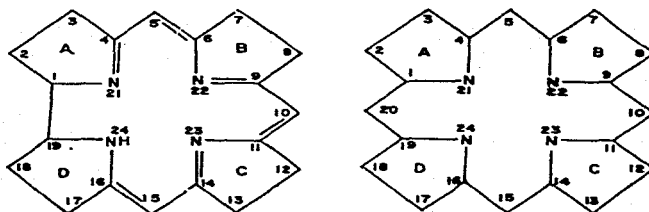
(V) Ácido Cobirínico.

(VIb) Ácido Cobínico

(VIIa) Ácido Cobámico

(VIIb) Cobamida

El núcleo de la corrín y sus derivados se numera de la siguiente manera.



Corrín  
FIG. IX

Núcleo porfirina

La numeración del núcleo de las porfirinas es similar al de la corrina, en el que se omite el número 20.

Los grupos caroxilo terminales en sustancias del tipo II, III, IV, V, VI y VII son designados con letras de a a la g.

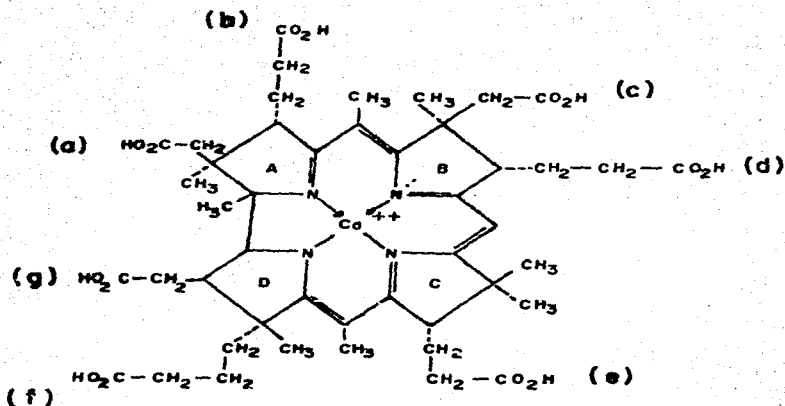


Fig. V - Acido cobirínico

Para nucleótidos de esta serie, el nombre del radical heterocíclico adicional termina en -il, ej. Cianuro de (5,6 dimetilbenzimidazolil) cobamida. ) vitamina B<sub>12</sub>).

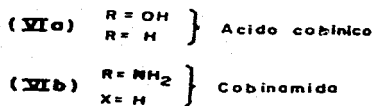
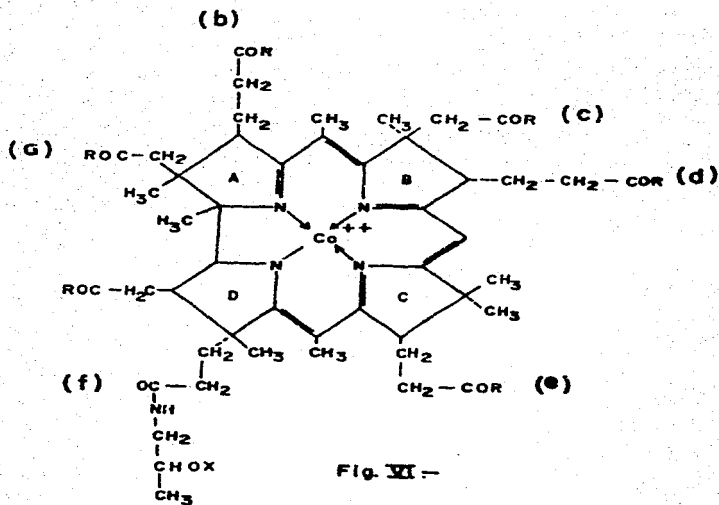
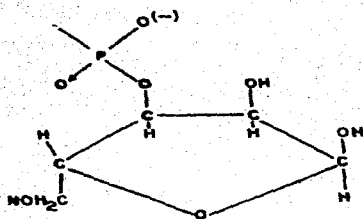


Fig. VII - (VIIa)  $\left. \begin{array}{l} R = OH \\ X = \end{array} \right\}$  Acido cobámico



(VII b)  $\left. \begin{array}{l} R = NH_2 \\ X = \end{array} \right\}$  Cobamido

En las moléculas formadas por los iones mencionados, - la ligadura unida al metal se nombra por el método usado en - química inorgánica, y no por un prefijo, por ejemplo ácido di - nitrito carbámico,  $\alpha$ -(5,6 dimetilbenzimidazoil) acuocobala - mina o vitamina B<sub>12b</sub>.



### 2.3.- QUIMICA DE LA VITAMINA B<sub>12</sub>

#### PROPIEDADES FISICAS.-

La vitamina B<sub>12</sub> (cianocoblamina) cristaliza en agujas o prismas rojos oscuros; el color varía según el tamaño de los cristales, los cuales oscurecen a 210-220° pero no funden --- abajo de 300°. Los índices de refracción son:  $n_{\alpha} = 1.616$ ;  $n_{\beta} = 1.652$ ;  $n_{\gamma} = 1.664$  (107). Las medidas cristalográficas indican que el sistema es orto-rómico y los cristales normalmente -- prismáticos (43,64). Cristaliza de acetona acuosa, pero se -- presenta una considerable cantidad de agua de cristalización- (ésta se puede eliminar por calentamiento bajo presión reduci da). El material deshidratado de nuevo absorbe humedad hasta un 10-12%.

La vitamina B<sub>12</sub> es soluble en agua (aprox. 1.2%, a la temperatura ambiente) y también en alcoholes de bajo peso mo lecular, ácidos alifáticos y fenoles. Es insoluble en piridi na y por otras aminas terciarias, pero es soluble en algunas amidas líquidas o fundidas, tales como acetamida o dimetil -- formamida.

Las soluciones acuosas presentan una absorción máxima<sup>\*</sup> a 278, 361 y 550  $m\mu$ . El espectro en el infrarrojo fué regis trado por Fantes y colaboradores. La vitamina B<sub>12</sub> presenta un fuerte efecto Cotton con una rotación dextro máxima a 400  $m\mu$ , (no presenta desviación a 525  $m\mu$ ) y una rotación levo máxima

a 575  $m\mu$ (38). Esto explica las discrepancias en su rotación a diferentes longitudes de onda (21, 107). La vitamina B<sub>12</sub> es diamagnética, indicando ésto que el cobalto está en estado trivalente (35, 54). Las sustancias estrechamente relacionadas también son diamagnéticas (128, 144) (B<sub>12b</sub> y B<sub>12c</sub>). La situación electromagnética y las mediciones de conductividad mostraron la ausencia de cualquier grupo fuertemente ionizante (43), (Fantes y colaboradores). También se han registrado mediciones polarográficas (Fantes y colaboradores) (2). El peso molecular fué determinado por el método de elevación -- del punto de ebullición y se encontró entre 1490-150 (Brinky colaboradores) (3). Por cristalografía de rayos X se determinó entre 1360 y 1575, siendo la diferencia debido al diferente grado de hidratación de los cristales.

Las mayores contribuciones a la química de esta vitamina fueron logradas por los equipos de cuatro instituciones: Laboratorios Merck, British Drug Houses, Glaxo y la Universidad de Cambridge.

Las primeras observaciones químicas se encuentran enunciadas en el inciso anterior, se obtienen productos de degradación por hidrólisis ácida o alcalina de la vitamina, bajo diferentes condiciones. Estas reacciones dieron información valiosa acerca de la estructura exterior de la molécula, complementándose con las reacciones de oxidación.

Al tratar la vitamina B<sub>12</sub> con agentes reductores se obtuvieron derivados tales como la vitamina B<sub>12r</sub>, de color café, que contiene el cobalto divalente. Esta al contacto con átomos de oxígeno, se transforma en vitamina B<sub>12a</sub>. Kaczxa y colaboradores (76, 77, 118) fué el primero que indicó que algunos reactivos llevan la reducción hasta la obtención de un compuesto gris verde llamado B<sub>12s</sub> y el cual parece ser un derivado del hidruro de cobalto.

Una reducción reversible puede hacerse al adicionar -- ácido tioglicólico a una solución alcalina de la vitamina B<sub>12</sub>. El cambio de coloración es lento, de rojo a café naranja. Agitando el contacto con aire se vuelve instantáneamente rojo.

La cloración vigorosa de la vitamina B<sub>12</sub> da un producto que contiene 30% de cloro Garbers y colaboradores (51, 52, 101) describieron varios productos provenientes del tratamiento de la vitamina B<sub>12</sub> con cloro o cloramina T, los cuales pudieron ser separados por cromatografía.

Estudios de halogenación más detallada fueron logrados por los equipos de la Glaxo y Cambridge (12).

Frederick y Bernhauer (11), investigaron las condiciones bajo las cuales la posición N3 del benzimidazol puede ser alquilado. Esta reacción fué estudiada para ver el comportamiento complejo del factor III, análogo de la vitamina, el cual puede ser metilado por una reacción con sulfato de dimetilo en solución acuosa de cianuro a pH 8.3. aprox.

#### 2.4.- MÉTODOS DE ANÁLISIS.

Los métodos de análisis disponibles para la determinación de la vitamina B<sub>12</sub> caen dentro de tres grupos: biológicos, microbiológicos y químicos. Los métodos biológicos emplean mucho tiempo, no se emplean frecuentemente, aunque, por otro lado, las respuestas de los animales pueden dar una medida específica de la cantidad de vitamina aprovechable en la sustancia probada. Los métodos microbiológicos son más sensibles, emplean menor tiempo y requieren personal menos capacitado una vez que el método ha sido establecido. Los métodos químicos son menos sensibles que cualquiera de los métodos biológicos pero son más rápidos y, generalmente, más reproducibles.

Los métodos biológicos emplean dos animales diferentes: ratas (destetadas) y pollos. Los métodos que emplean pollos usan directamente la reacción de crecimiento para medir la actividad de la vitamina B<sub>12</sub> (92, 137). Los ensayos que emplean ratas jóvenes se dificultan a veces debido a un tratamiento anterior por caseína iodada o sustancia tiroidea (40).

Aunque los métodos microbiológicos han tenido un rápido desarrollo, muchos de ellos no han tenido éxito. El actobacillus lactis (Dorner) fué sugerido al final de los años cuarenta como un organismo apropiado (53, 122), sin embargo, simultáneamente surgieron métodos usando lactobacillus leichmanii

(99, 123, 138). Este es actualmente el microorganismo preferido por la Association of Official Agricultural Chemists de los E.E.U.U. (92). Cuando es cultivado en un medio semi-sintético el lactobacillus usa pseudo-vitamina B<sub>12</sub>, trimidina y otros deoxirribósidos, con variación en la sensibilidad con relación al medio sin vitamina B<sub>12</sub> (120, 135, 136, 150). Sin embargo el *L. leichmannii* provee un ensayo rápido y sensible para cobalaminas totales y deoxirribosidos, puesto que pequeñas cantidades de deoxirribósidos pueden interferir con la vitamina B<sub>12</sub> lo suficiente para nulificar el análisis, la interferencia debe ser removida diluyendo el ribósido a menos de 1mcg/ml de la solución ensayo. Las substancias que interfieren también pueden ser removidas por extracción y purificación anterior al análisis (91). Para medirlo se emplea un ensayo diferencial (47, 49, 59)

En muestras de productos animales que han sido purificadas por cromatografía sus cobalaminas totales pueden ser -- analizadas con *Escherichia coli* (25). Este organismo provee un ensayo rápido (16-24 h). Sin embargo éste también responde a la metionina y al Factor B, los cuales deben ser eliminados antes del ensayo.

La vitamina B<sub>12</sub> puede ser analizado con una sensibilidad igual al de *Lactobacillus leichmannii* con el protozoario - fagocítico, *Ochromonas malhamensis* (49). Este organismo responde solamente a la vitamina B<sub>12</sub> verdadera y no a los tipos pseu

do. Los ensayos con el protocoario se correlacionan bien con la actividad clínica de la vitamina B<sub>12</sub> aunque algunas formas de coenzima no dan respuesta (7). El suero de pacientes enfermos del hígado, pueden contener formas activas para el *O. malhamensis*, pero que no dan respuesta al ensayo con *Euglena gracilis* (95). El alga *Euglena gracilis* es muy usada para el ensayo de cobalqminas puesto que no se conocen factores de crecimiento que substituyan las necesidades de B<sub>12</sub>, (96), excepto en las formas "pseudo". La desventaja de emplear estos microorganismos es el tiempo empleado para la incubación (4-7 días), pero los resultados son bastante aceptables.

Los métodos bioautográficos con los cuatro microorganismos *L. leichmannii*, *E. coli*, *O. malhamensis* y *E. gracilis* permiten la indentificación de compuestos activos obtenidos en pequeñas cantidades. Tales métodos de placa son usados en unión con la cromatografía pero no para ensayos de rutina de vitamina B<sub>12</sub>. Han sido reportados los cuatro procedimientos de ensayo. (84, 85).

Los primeros métodos para los análisis químicos de B<sub>12</sub> están basados en degradaciones químicas y físicas, seguidas por la determinación de uno o más productos de reacción. Los métodos usuales para la determinación de B<sub>12</sub> están basados en el análisis del cobalto de las cenizas o de la fusión de la muestra. Antes de aclarar la estructura de la molécula

de B<sub>12</sub> se encontró que por hidrólisis ácida se obtenía el -- 5,6 dimetilbenzimidazol, (14). Un método colorimétrico y flugrimétrico combinado se emplea para comprobar el contenido de 5,6 dimetil benzimidazol en el hidrolizado ácido. La cantidad de ácido cianhídrico liberado de una solución ácida de la vitamina fué también relacionado con la concentración, (14, 15, 15a, 16).

La absorción en el infrarrojo ha sido usada para diferenciar las cantidades de varias cobalaminas, pero solamente pueden ser detectadas concentraciones elevadas. (3, 43).

Un método espectrofluorimétrico en fosfato buffer a - pH 7 ha demostrado tener una sensibilidad de 0.003 mg de B<sub>12</sub> por ml, (36). El desarrollo de espectrofluorímetros más modernos, capaces de registrar al mismo tiempo la actividad y la emisión de radiación, podría resultar en una aplicación - basada en este tipo de medición.

Fantes K. H. y colaboradores (42), seguidos - - - por Heinrich H.C. (58), desarrollaron exitosamente un método analítico basado en la formación y determinación subsecuente de un esterocéflico de la vitamina.

La cianocobalamina puede ser determinada directamente por medida espectrofotométrica a 550 m $\mu$  y/o a 361 m $\mu$ . Fig. - VIII. El  $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  de estas longitudes de onda son 64 y 207 respectivamente. Este método tiene limitaciones pero pueden usarse convenientemente para comprobar la concentración de las --

soluciones puras.

Cooley G y colaboradores (32) describieron la existencia y formación de un complejo diciano del cobalto de la vitamina; y Rudkin G. O. Jr. y Taylor R. J. (113) apoyaron exitosamente el primer método química directo para la determinación del dicianuro colorido, Fig. IX. De Carneri y más tarde Janicki J. y colaboradores (72, 74), recomendaron modificaciones del mismo método para los extractos de hígado y caldos de cultivo. Cuando un exceso de cianuro se añade a una solución alcalina de B<sub>12</sub> se forma el complejo diciano acompañado por un cambio de color rojo a púrpura y un cambio en el máximo de absorción a 582 mm, terminando la absorción a la muestra con un exceso de cianuro, y ajustando el pH a 9.5-10. Después de estabilizar el complejo diciano, se extrae con alcohol bencílico y después se reextrae con agua. El extracto acuoso se divide en dos porciones, una conteniendo exceso de cianuro a pH 10 y la otra ajustada a pH 5-6. La diferencia en los dos espectros es un máximo a 582 mm con el  $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 54$ . Se emplea esta diferencia para el análisis de la vitamina B<sub>12</sub> en la cual se corrige automáticamente la gran interferencia de absorción encontrada en las preparaciones crudas.

Fisher R. A. (46), propuso una modificación en el procedimiento de dicianuro, en la cual se le extrae del cultivo-secado con alcohol bencílico caliente en presencia de cianuro a pH 7-8. Otros investigadores (27), encontraron que los pig-



mentos "pseudo" de la B<sub>12</sub> formados también forman el complejo diciano y causaban interferencia.

Las resinas de intercambio se probaron para eliminar la interferencia de ciertos pigmentos rojos (90), y un método se basa en el color del complejo diciano (139) formado después de que la muestra se ha pasado a través de las columnas de intercambio.

La vitamina B<sub>12</sub> ha sido marcada con C-14 (15a, 117, -- 146) y con fósforo-32 (125, 127) pero ninguno de estos métodos ha probado ser superior al método que emplea cobalto marcado para las determinaciones analíticas. La cianocobalamina marcada con cobalto radiactivo 60 (vida media 5.2 años) y con cobalto-58 (vida media 72 días) ha sido sintetizada por fermentación.

Barker F. A. Boley A. E. y Shonk C. E. describieron -- una técnica de silución isotópica. En 1954 se estableció un Comité en E.E.U.U. para estudiar esta nueva técnica.(23). El comité concluyó que el método era realmente específico para la vitamina B<sub>12</sub> y subsecuentemente recibió el reconocimiento oficial en la Farmacopea de E.E.U.U. N°XV Primer Suplemento - p.1. (1956) y en el Formulario Nacional XI (p.419(1960) como un ensayo estándar para la cobalamina. La Farmacopea Mexicana adoptó también este método.

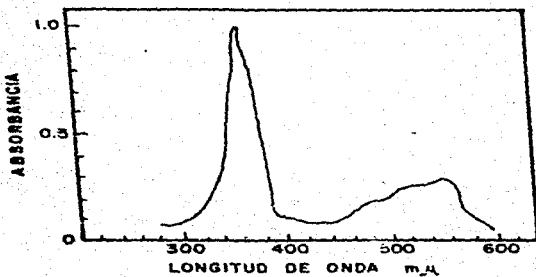


FIG. VIII Curva de absorción espectrofotométrica para cianocobalamina (48.3 /g/ml en KCN 0.2N a pH 6"

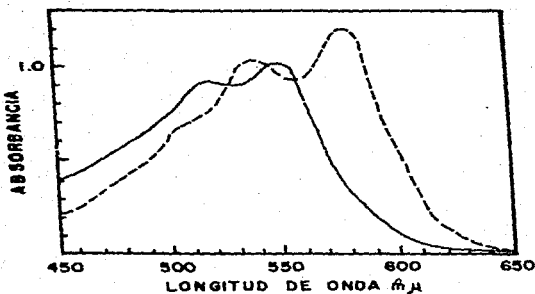


FIG. IX Curvas de absorción espectrofotométrica para vitamina B<sub>12</sub> (línea) y el complejo diciano (punteada) Complejo diciano: 81mg/ml. Vitamina B<sub>12</sub>: -- 81 mg/ml.

### 3. METODOS DE FABRICACION

Después de las primeras publicaciones de la separación de la vitamina B<sub>12</sub> se hicieron muchos estudios de los cuales se vio la necesidad de obtenerla en grandes cantidades. Los estudios de la biosíntesis de la vitamina B<sub>12</sub> han logrado progresos considerables en los últimos años para encontrar los posibles orígenes de la misma, se han hecho investigaciones para encontrar organismos apropiados para la producción industrial de antibióticos, en la que el medio contiene un bajo nivel de cobalto. En los cultivos de *Streptomyces griseus* y *Streptomyces aureofaciens* se obtuvo la vitamina B<sub>12</sub> como subproducto, aunque este método no es el más económico se logró que la vitamina B<sub>12</sub> no quedara simplemente como curiosidad científica o muy costosa, como lo era cuanto se obtenía por la extracción del hígado y del estiércol.

Han recibido atención especial los actinomicetos. Dentro de este grupo se encuentran los que producen estreptomicina, neomicina y clorhidrato de tetracilina (71, 73, 105, 119).

Darken es una amplia revisión (33) enlistó un gran número de microorganismos que producen cianocobalamina, principalmente por actinomicetos y bacterias. Los actinomicetos reportados que son capaces de producir vitamina B<sub>12</sub> o derivados (compuestos con actividad de vitamina B<sub>12</sub>) incluyen una especie de *Nocardia* y las siguientes especies del género de *Streptomyces*: albidofavus, antibioticus, aureofaciens, colombiensis,

griseus, olivaceus y roseochromogenus. Entre las bacterias se incluyen Aerobacter, aerogenes, Bacillus megatherium, B. subtilis, Clostridium butyricum, Cl. cochlearium, Cl. labelliferum, Cl. teteromorphos, Escherichia coli; las especies de Flavobacterium, acetylicum, acidificum, aquatile, arborescens, devorans, esteroaromaticum, flavescens, solare y suareolens, Lactobacillus arabinosus, L. casei, Mycobacterium phlei, M. smegmatis, M. tuberculosis, Propionibacterium freunderichii, P. shermanii, P. zeae, Proteus vulgaris; Especies de Pseudomonas, Serratia marcescens, Staphylococcus aureus y Streptococcus faecalis. También ciertas especies de Rhizobium pueden llegar a sintetizar vitamina B<sub>12</sub> (88).

A continuación se describen algunos procesos para la producción de vitamina B<sub>12</sub> en escala industrial.

### 3.1.- PRODUCCION DE VITAMINA B<sub>12</sub> POR MEDIO DE STREPTOMICES GRISEUS.

Después de los primeros descubrimientos de Rickes (107) al aislarla del hígado en forma cristalina y Shorb (122), encontró que la vitamina era un promotor para el crecimiento del Lactobacillus lactis con lo cual se logró que fué investigada en un gran número de posibles orígenes, Rickes y col. (109) hicieron un estudio comparativo entre la vitamina B<sub>12</sub> obtenida del hígado y la del nuevo origen, Streptomices griseus.

Rickes E.L., Rahway Wood R.T. (110) preparan la inocu-

lación empleando un medio básico de crecimiento consistente en:

- 1% de Extracto de levadura; Difco
- 0.02% de jugo de tomate;
- 1% de dextrosa anhidra;
- 1.5% de agar.

Las células de inoculación así obtenidas se lavan con agua destilada, y se secan y esterilizan por calentamiento a 120° C durante 13 min., posteriormente se enfrían a la temperatura ambiente. Después los tubos son inoculados con una gota de suspensión estandarizada de *Lactobacillus leichamni*.

Medio de fermentación:

Extracto de carne (75% sólidos)	43 Kg.
Cesafina	141 Kg.
Cloruro de sodio	72 Kg.
Sulfato ferroso. 7H <sub>2</sub> O	720 g.
Aceite de soya	20 lt.
Agua (Aprox.)	13,000 lt.

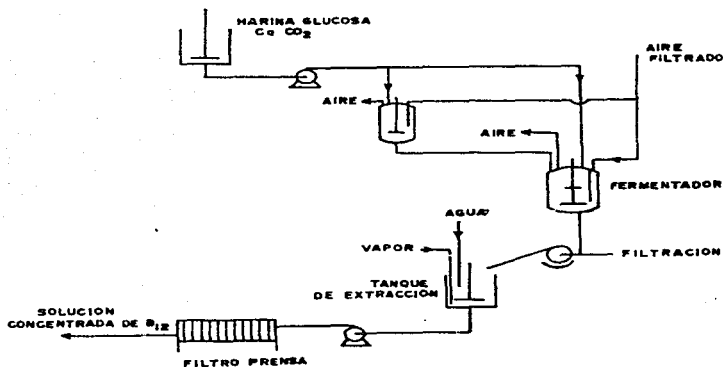
La solución se esteriliza durante 30 min. a 120°C, posteriormente se enfría a 28°C. Esta solución se inocula con 1000 l. de un cultivo de *Strptomyces griseus*. El medio inoculado se fermenta a 28°C durante 28 hrs. agitando con un agitador mecánico de turbohélice y con aereación continua aprox. 500 litros de aire por hr. Al final de período de fermentación el caldo de cultivo se acidifica a pH 3 con ácido fosfórico y se filtra

tra, se lava y se alcaliniza ligeramente con hidróxido de sodio. El caldo de fermentación resultante presenta un pH de 7,8.

La vitamina B<sub>12</sub> producida por *Streptomyces griseus* puede ser aislada tratando con una resina de intercambio iónico (89) en la que los grupos polares son carbóxido los que absorben la estreptomycinina y retienen la vitamina B<sub>12</sub>. Posteriormente se trata con carbón activado, alúmina activada o similares (se emplean extracciones acuosas cuando se emplea carbón activado, y para las columnas de alúmina se emplean alcoholes alifáticos miscibles en agua); la solución es purificada y posteriormente se precipita la vitamina con un solvente no miscible. El producto se saca durante dos horas al vacío a 100°.

El equipo necesario es semejante al utilizado para la producción de antibióticos fig X. Es necesario que los recipientes no sean de acero, pero puede ser producida en reactores recubiertos de esmalte

Fig X.- DIAGRAMA DE FLUJO



Russell-UCLAF. (115) la produce en un medio nutritivo-que contiene mono sodio Co (iii) EDTA.

Dulaney E.L. y Williams P.L. (37) encontraron que la -fenilamina estimula la producción de vitamina B<sub>12</sub> obtenida por Streptomices griseus.

### 3.2 PRODUCCION DE VITAMINA B<sub>12</sub> POR MEDIO DE STREPTOMI-- CES OLIVACEUS.

Los Streptomices NRRL B-1125, han sido usados para la-producción comercial de vitamina B<sub>12</sub>. Fue aislada por el Nor--then Utilization Research and Development Division of the De--partament of Agriculture (57, 58a, 102) y otros.

Preparación del cultivo.- El cultivo se mantiene expo--rulado en agar de Bennett. (Jones K.L. (56, 141)).

Estracto de levadura	1.0 g.
Extracto de carne	1.0 g.
N-Z Amina A*	2.0 g.
Glucosa	10.0 g.
Agar	15.0 g.
Agua dest.	1,000.0 ml.

Se ajusta el pH a 7.3 con NaOH

\* hidrolizado enzimático de caseína.

Las esporas para el cultivo se preparan por crecimien--to del organismo sobre el agar de Bennett durante 4 a 6 días a 28°C. Estas pueden ser usadas inmediatamente o pueden ser guar



dados por varias semanas en refrigeración.

Se puede emplear una gran variedad de medios para cultivo, pueden contener 1% de sólidos del licor del procesamiento del maíz (0.5% de sólidos y 0.5% de dextrosa.)

Medio de Cultivo y Fermentación:

	Medio 1	Medio 2*
Dextrosa	0.5	1.0
Sólidos del licor de proces. del maíz.	0.5	---
Solubles de destilería o harina-de soya	---	4.0
Cloruro de cobalto ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )ppm	2.0	2-10
Carbonato de calcio	---	0.5
Aceite de soya %	0.1	0.1
pH ajustado a	7.0	7.0

\* Pfeifer y col. Ind. Eng. Chem. 46,843 (1954)

El medio líquido se inocula con las esporas y se aerea y agita durante 48 hr. a 28°C. Para la fermentación el cultivo puede ser desarrollado con agitación rotativa o recíproca en tanques de fermentación.

Diagrama de flujo.- La Fig XI muestra el diagrama de flujo para la producción de vitamina B<sub>12</sub> con Streptomyces olivaceus. El pH se ajusta a 7.7-7.5 antes de la esterilización y puede ser controlado durante la fermentación; la gráfica Fig.- XII muestra los cambios de pH, azúcar y vitamina B<sub>12</sub> durante -

una fermentación típica en la que el pH no fue controlado.

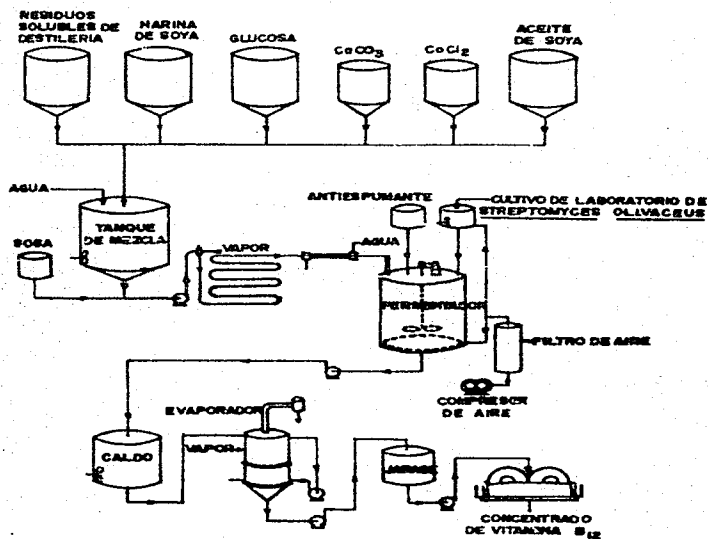


FIG. XI Diagrama de flujo.

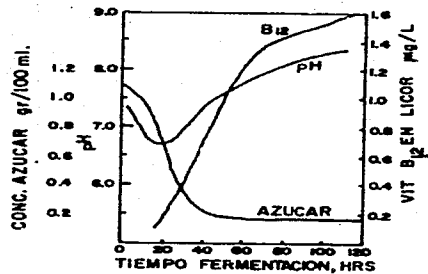


Fig. XII Cambios típicos en la fermentación de B<sub>12</sub>

Esterilización.- Los medios y materiales empleados para la producción de vitamina B<sub>12</sub> deben ser esterilizados, así como también los tanques de fermentación, líneas y conexiones relacionadas.

La esterilización continua o en lotes (intermitente) puede ser usada en el medio, Pfeifer y asociados encontraron que es necesario calentar el medio durante 1.5 a 2 hr a 250°C para efectuar la esterilización en la operación. Es necesario ajustar el pH del medio a 7.0 antes del calentamiento para obtener resultados satisfactorios. El empleo de esterilización continua a 30°C y con un tiempo de retención de 13 min. se efectuaba siempre a bajo pH en un fermentador de cobre, acero inoxidable o acero.

Temperatura.- Se obtuvieron rendimientos óptimos de la vitamina B<sub>12</sub> de *Streptomyces olivaceus* NRRL B-1125 a 80°F, aunque el rango óptimo es de 78° a 82°F.

Acreación y agitación.- Para obtener buenos rendimientos se requiere de una agitación vigorosa en la fermentación.- El aire estéril debe ser inyectado a una velocidad cercana a 0.25 a 0.5 volumen a volumen del medio por minuto. De acuerdo con Pfeifer y colaboradores, la velocidad mínima de absorción del O<sub>2</sub> determinada por el método de oxidación del sulfito debe ser 1.0 ml. de oxígeno absorbido por minuto.

Recuperación.- La vitamina B<sub>12</sub> está asociada con los -

micelios de Streptomyces olivaceus durante las primeras 60 --- hrs. de fermentación (fig. XI), consecuentemente la mayor parte de actividad puede ser recuperada del micelium por centrifugación o filtrando el caldo de fermentación de 70 a 90 hrs. -- Los sólidos obtenidos en esta forma pueden ser secados directamente en un secador a 120°F dando un rendimiento de 95%.

Otro método para la obtención de un concentrado es reduciendo el pH del caldo a 5 con  $H_2SO_4$ , calentando la mezcla a ebullición para separar la vitamina; centrifugando ó filtrando para separar los sólidos, y evaporando el centrifugado o filtrado a vacío y secando el jarabe. El sulfito de sodio en concentración cercana a 100 ppm pueda añadirse a la mezcla (después de reducir el pH con objeto de proteger a la vitamina durante los procesos subsecuentes). Un concentrado preparado de esta manera llega a contener de 5 a 10 mg. de vitamina  $B_{12}$  por kilo. Usando el micelium separado del caldo de malta fresca -- suspendido en agua, reduciendo el pH a 5 con  $H_2SO_4$ , calentando a ebullición, centrifugando o filtrando, evaporando el líquido hasta jarabe a bajo vacío y secando se obtiene una concentración que contiene 50 mg. de vitamina  $B_{12}$  por kilo.

La vitamina  $B_{12}$  se ha obtenido utilizando el por Streptomyces olivaceus a partir de los desperdicios de algunos ---- otros procesos como de los mostos de la producción de acetona- y butanol (119a). El mosto del líquido restante después de la-

destilación de la acetona y del alcohol contiene 2.1-2,5% de sustancia seca, compuesta de 5-39% de sustancias nitrogenadas y 3.2-38% de sustancias reductoras.

La vitamina B<sub>12</sub> se determinó en Escherichia coli, dando un rendimiento de 0.03 a 0.09 g/ml.

Una gran parte de la vitamina fue producida en la segunda fase del crecimiento del micelio (81). Se indica que además de la vitamina B<sub>12</sub> y otras vitaminas de complejo B se encuentran en el caldo de cultivo, niacina, ácido pantoténico, biotina, pirodixina, tiamina y riboflavina (57).

También ha sido obtenida por medio de Streptomyces olivaceus en las fábricas de vodka y licor de Moscú (82).

Se ha estudiado el efecto de algunos compuestos orgánicos sobre la síntesis de Streptomyces olivaceus (4) en la cual el ext. de frijol castor secado logró el máximo rendimiento -- 1.0-  $\frac{1}{4}$  -1.2 mg/ml.

### 3.3 PRODUCCION DE VITAMINA B<sub>12</sub> POR BACTERIAS PRODUCTORAS DE -- ACIDO PROPIONICO.

Se ha empleado un gran número de medio para el crecimiento de estos microorganismos, algunos contienen una gran variedad de originadores naturales incluyendo harina de soya (un subproducto de la producción de aceite de soya), desperdicios de pesca y harina de pescado, preparaciones de fermentos, extractos de carne, macerado de maíz (un subproducto de la fabricación de almidón de maíz) hidrolizados de proteína o caseína y residuos de otros procesos de fermentación por ejemplo. Solubles de destilería, levadura de cerveza etc. En la mayoría de los procesos de fermentación los rendimientos de la vitamina B<sub>12</sub> han sido correlativos con los rendimientos celulares. Una adición continua de carbohidratos o vegetales fermentables o aceites de animales (usadas ampliamente como antiespumantes en las fermentaciones aeradas) han promovido el crecimiento de las células y por consiguiente también los rendimientos.

Los procesos de Speedie J. D. y Hull G.W. (133) han sido los más productivos, los cultivos de Propionibacterium crecen anaerobicamente durante 2 ó 4 días y entonces se aerean vigorosamente de 3 a 4 días. Es una fermentación continua de dos pasos, el primer paso es anaeróbico y el segundo aeróbico. Riley Abraham Leviton y Hargrove R.E. (111) efectuaron la fer--

mentación usando un gas inerte en una escala de 4 a 20 l. con agitación a 240 rpm, una aereación adecuada y la introducción-aseptica de los materiales. Los experimentos se realizaron a -30°C, la esterilización se realiza a 120°C durante 15-60 min. El microorganismo empleado fué el Propionibacterium freunreichii (ATCC 6207). En estos experimentos se observó que la agitación es un factor importante para el buen rendimiento de la cobalamina.

Speedie y colaboradores (197) efectuaron la fermentación bajo condiciones anaeróbicas y continúan la fermentación con oxígeno. En un reactor de fermentación con 2500 litros de un medio nutriente con la siguiente composición.

Licor de maíz = 41/2% de peso por volumen del medio  
(=315 miligramos de nitrógeno por ml.-  
de medio).

Glucosa (anhidra esterilizada) = 10% w/v de medio

Cobalto (como  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) = 5 ppm de medio.

El medio fue inoculado con un cultivo de Propionibacterium freundereichii y se pasó nitrógeno a través del medio -- por un anillo apersor. La fermentación se realizó a 30°C durante 82 h bajo una atmósfera de nitrógeno a una presión baja. Durante la fermentación el pH del medio fué mantenido a 7 por -- adiciones de amoníaco conforme fué siendo necesario. Después -- de las 82 hrs. de fermentación, el medio fue aereado pasando -- aire a través del medio a razón de 0.05 v/v de medio por minu-

to hasta completar la fermentación a 140 hrs.

El medio fermentado fué analizado usando Ochromonas malhamensis, determinando un contenido de 24.3 microgramos de cobalamina por ml. de medio.

De acuerdo con otra patente (83), se encontró que el rendimiento de la vitamina B<sub>12</sub> se aumenta cuando se agrega glicina, en el medio nutritivo, como originador de nitrógeno. La cantidad que se añade está sujeta a algunas variaciones; la menor cantidad efectiva empleada es alrededor de 0.05% del peso del medio de fermentación y no aportan ninguna ventaja cantidades arriba del 2%.

El pH del medio de fermentación fue controlado preferiblemente entre 7.0 a 7.5 y la temperatura mantenida a 30°C.

Una fermentación en medio acuoso se prepara con la siguiente composición:

Medio de cultivo	Partes
Extracto de levadura	20
Glucosa monohidratada	25
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.008
Agua de la llave	1000

El pH fue ajustado a 6.0 con ácido sulfúrico concentrado y entonces se añadieron 40 partes de carbonato de calcio. La esterilización se realizó durante 15 min. a 121°C y posteriormente se enfrió a la temperatura ambiente. Se inocula el -



medio de cultivo a 30°C con un cultivo líquido de Propionibacterium freudenreichii (ATCC 6207), creciendo durante dos días en el mismo medio bajo condiciones anaerobias con una agitación continua a 135 rpm. Después de la fermentación durante 6 días se obtuvieron los siguientes resultados (que varían de acuerdo con la cantidad de glicina añadida)

Ejemplo	Partes de glicina añadidas.	Vit. B <sub>12</sub> µg/l
1	0	13.1
2	0.05	15.6
3	0.10	16.8
4	0.20	23
5	0.30	22

Se ha estudiado el efecto de la luz en el metabolismo de la bacteria del ácido propiónico, (42), en un medio de cultivo que contenía: ácido láctico-2%,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  -3%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  -0.2%,  $\text{CoCl}_2$ -1 mg, biotina µg/l, pantotenato-500 µg/l.

La suspensión bacterial fué preparada en fosfato 1/15M a pH 7.3, a esta solución se le agrega la solución de ácido láctico al 1% neutralizada previamente con bicarbonato.

El efecto de la luz de lámparas incandescentes con diferentes intensidades se expresan en la siguiente tabla, la temperatura se mantuvo a 30°.

Intensidad luminosa $10^3 \text{ erg.cm}^2/\text{sec}$	Medio $\mu\text{g/ml}$	Peso seco $\mu\text{g/g}$
Control (obscuridad)	2.8	2.6
7	1.7	2.1
15	1.2	1.5
30		

Fig. XIII.- Contenido de Vitamina  $B_{12}$  dependiendo de la iluminación de los cultivos.

Cuando los cultivos de Propionibacterium son iluminados decrece la cantidad de vitamina  $B_{12}$ .

También se estudió el efecto de  $\text{MnSO}_4$  (141) en un medio - que contiene ácido láctico-3.0,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ -2.0,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -0.3, ---  $\text{CoCl}_2$ -1 mg%  $\text{MgSO}_4$ -0.02,  $\text{FeSO}_4$ -0.001.

Todos los materiales fueron recristalizados y pasados - a través de resinas de intercambio iónico: El catiónico SDV-3- y el aniónico AN-0 (obtenidas en el Instituto Químico-tecnológico Mendelew).

El efecto del  $\text{MnSO}_4$  en el crecimiento de la vitamina -  $B_{12}$  se muestra en la siguiente tabla.

tiempo hrs.	MnSO <sub>4</sub> en % añadido	Peso de células secas g/l	Vit B <sub>12</sub> γ/l	Vit B <sub>12</sub> γ/l
72	0.01	0.33	332	1006
	No	0.33	587	1780
96	0.01	0.46	535	1160
	No	0.504	700	1400
144	0.01	0.84	1641	1950
	No	1.104	1836	1660

Fig. XIV.- Efecto del MnSO<sub>4</sub> en el crecimiento de B<sub>12</sub>

En este caso se observa que la cantidad de MnSO<sub>4</sub> disminuye la formación de vitamina B<sub>12</sub> en un 34% durante los primeros días de crecimiento. Después de 40. día no se observa que el MnSO<sub>4</sub> tenga efecto inhibitor.

Chinoin Gyogyszer es Vegszeti Termekek Gyera Rt (26).-

En un medio no coloidal que contenga glucosa-2, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-0.4, KCl 0.1, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-0.1, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O-0.1, CaCO<sub>3</sub>-0.2 y un origenador de N de licor de maceración con 0.25% FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O-40, Co -- (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-6, H<sub>2</sub>O-5 y pantotenato de calcio-25 γ/ml (pH 7.0) a -- 25-6° durante ocho días añadiendo 2 γ de 5,6 dimetilbencimidazol/ml en ácido diluido al 50 día da un rendimiento de 5.4 de vit. B<sub>12</sub>/ml.

Los licores sulfúricos (143) se usaron como componente básico, la máxima producción de vitamina B<sub>12</sub> fué obtenida con-

10% de levadura hidrolizada y 0.003 g/l de 5,6 dimetilbencidazol, después del 4o. día; el rendimiento fue de 3.65  $\gamma$ /ml.

Hernan Rudy y Colaboradores (114). El Micelio de Aspergillus niger molido (400 Kg) de una fermentación de ac. cítrico se mezcla con 8000 l de lodos de melaza (10% de sólidos secos, 1.2% azúcar invertido); el pH de la mezcla se ajusta a -- 7.5 con  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  y se añaden 80 Kg de  $\text{CaCO}_3$  como buffer (1% de medio). Después de una esterilización a 100°C durante 1 hr y enfriando a 30°C el medio fue mezclado con 2000 l de un cultivo de 24 hr de Propionibacterium en el que el medio nutriente contenía solamente 0.2% de  $\text{CaCO}_3$ , el pH se mantuvo entre 5.5, a 7 con adiciones continuas de  $\text{CaCO}_3$ . Después de 96 hr de fermentación las células contienen 1.2 mg de vitamina  $\text{B}_{12}$ /l.

La vitamina  $\text{B}_{12}$  se extrae de los cultivos de Propionibacterium (98) separando la biomasa del líquido de cultivo por centrifugación continua y suspendiéndola en 20 volúmenes menos de agua que la del líquido de cultivo original. Se añaden  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  y  $\text{NaHSO}_3$  en cantidades aproximadamente 5 veces de la vitamina contenida; el pH se ajusta a 6.0 y se calienta a 80° durante 30 min. acidificando a pH 5 y filtrando para eliminar las proteínas coaguladas. El filtrado se extrae dos veces con 5% de una mezcla de cresol:  $\text{CCl}_4$  1:1, lavándolo con 2 vol. de  $\text{H}_2\text{O}$  reextrayendo con 0.6 vol de BuOH y 1.2 vol de  $\text{CCl}_4$ , después se ajusta el pH a 4.0, se añade  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$  al 2%, neutralizando in

mediatamente con NaOH al 10%, el pp fue separado por filtración.

Esto puede ser complementado con un complejo Cu-CN, -- acidificando a pH 2.8-3.0, añadiendo de 15 a 20 volúmenes de - CuSO<sub>4</sub> al 25% de y precipitando la vitamina B<sub>12</sub> con una solu--- ción acuosa de NaCN al 5% hasta completa decoloración de la so--- lución. Después de separarlo de los solventes orgánicos, el -- concentrado acuoso fue diluido con acetona al 80% cromatogra--- fiandola sobre una columna de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y cristalizando con aceto--- na.

#### 3.4 PRODUCCION DE CIANOCOBALAMINA POR BACILLUS MEGATHE- RIUM.

Un proceso comercial para la producción de vit. B<sub>12</sub> es el reportado por Garibaldi John A. y colaboradores (56), por--- Bacillus megaterium.

Especies de Bacillus megaterium como NRRL B-938, B-938R y B-1366, B-1372 se han empleado para la síntesis de cobalami--- na.

Medio y nutrientes.

Los medios empleados se representan en la siguiente ta--- bla.

## Medio, gramos por litro

Constituyentes	A	B	C	D	E	F	G
Sacarosa	10	50	50	..	..	..	..
Purificada				..	..	..	..
como melazas de remolacha	..	..	..	50	62	..	..
como melazas de limón	..	..	..	..	..	12	..
Cebada seca	..	..	..	..	..	..	50
Extracto de levadura	..	2.5	2.5	..	..	..	..
ácido cítrico (anh)	1.2	11.7	0.5	..	..	..	..
agar	15	..	..	..	..	..	..
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.4	2.1	4.2	4.2	8.0	8.0	1.0
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.4	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	..
KCl	0.08	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	..
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	..	..	..	..	..	..	0.9
NH <sub>3</sub> hasta ph 7	..	..	..	..	..	..	..

## Mg por litro

Mg (como cloruro)	50	50	50	50	50	50	50
Ca (como cloruro)	..	20	20	50	50	20	20
Mn (como cloruro)	15	15	15	15	50	15	15
Fe (como cloruro)	10	5	5	5	5	5	5
Zn (como cloruro)	10	5	5	5	5	5	5
Co (como cloruro)	1	2	2	2	5	2	2

Fig. XV.- Variantes del medio básico: B<sub>a</sub> no contiene extracto de levadura, B<sub>c</sub> contiene 5.8 gramos de ácido cítrico por litro, C<sub>a</sub> no contiene extracto de levadura, C<sub>b</sub> y C<sub>c</sub> es igual a C<sub>a</sub> pero conteniendo 0.05 g y sin ácido cítrico respectivamente por litro.

La sacarosa, glucosa, maltosa, etc. dan buenos rendimientos de cobalamina. Sin embargo, el azúcar de maíz, jaraba de maíz, azúcar invertido, melaza de caña y ciertos alcoholes polihídricos se usan también en la producción de la cianocobalamina. La óptima concentración de sacarosa es de 3 a 5%.

El nitrógeno puede ser suministrado en forma orgánica por medio de proteínas, enzimas digestivas, amino-ácidos, asparagina o urea; y en forma inorgánica por fosfato de amonio, ci

trato de amonio, hidróxido de amonio y amoníaco. El mínimo y -  
óptimo rango de nitrógeno es de 1700 a 200 mg/l.

El ácido cítrico se añade al medio para incrementar la  
solubilidad de las sales y sirve con propósitos de estabiliza-  
ción.

#### Condiciones de propagación.

Garibaldi J.A., y Colaboradores (56), emplearon las si  
guientes condiciones anotadas en la fig. XVI.

El fermentador descrito por Humefeld H. (68), fué em--  
pleada para 10 l% de medio. Sin embargo, también se emplearon--  
propagadores de 150 l descrito por Garibaldi y Feeney (55) y -  
en un propagador de 1l. descrito por Fausel y Humfeld (45). Un  
medio que contiene 5% de azúcar fue esterilizado durante 45 --  
min. a 1 kg/cm<sup>2</sup> de vapor.

La inoculación crece en el mismo medio que el empleado  
para la propagación. La cantidad empleada representa de 5 a 10%  
del volúmen del medio de propagación.

#### Control del pH

El pH puede variar de 7.5 a 5.5, sin embargo el pH de--  
6.5 a 7.0 es el óptimo par el Bacillus megatherium (NRRL B-938).  
El pH puede mantenerse constante con una adición controlada de  
amoníaco, hidróxido de amonio, hidróxido de sodio o de potasio.  
También puede ser controlado por el empleo de solución buffer,  
tales como ácido cítrico o fosfórico o sus sales solubles en -

agua.

Temperatura.- El intervalo de temperatura es de 35 a - 40°C empleado para la fermentación siendo la más favorable la de 35°C fig. XVI.

La temperatura máxima para el crecimiento del B. megatherium NRRL B-938 es de 42 a 44°C. Las células que crecen a - 40°C son más pequeñas que las que se forman de 30 a 35°C.

Aereación.- El aire es suministrado para el crecimiento del organismo y para la agitación del medio. La cantidad necesaria puede variar de 0.1 a 2 volúmenes /volúmenes de medio/ min. Se emplea agitación mecánica y el aire debe ser esterilizado antes de emplearse.

Agentes antiespumantes.- Un agente antiespumante esterilizado puede ser requerido durante la fermentación para controlar la espuma excesiva. Un monoglicérido del aceite de cerdo de cerdo, octadecanol diluido con aceite de cerdo, aceite mineral purificado, o silicones.

Tiempo.- Los mejores rendimientos de las células y vitamina B<sub>12</sub> se obtienen preferentemente de 6 a 12 hrs.

Extracción.- El método general de recuperación es similar al empleado para la producida por Streptomyces olivaceus. Las células, que contienen esencialmente toda la vitamina, pueden ser separadas del licor por centrifugación, filtración o decantación, ellas pueden ser empleadas como suplemento alimen



FIG. XVI.- PROPAGACION DEL BACILLUS MEGATHERIUM NRRL B-938 BAJO AERACION FORZADA.

Prueba N°	Condiciones de crecimiento	Medio*	Horas requeridas para			Rend/100 g azúcar	
			fase Lag †	Crecimien to max.	cobalmi na max.	Celulas Bac teriales.	Cobalamina
42	pH no controlado	B	1	7	7-8	45	0.38
110	10% azúcar a 37°C	C	2	11	11	48	0.91
120	10% azúcar 37°C	C	1	12	13	43	0.80
121A	pp de sales de citrato, inocula- ción ligera del cultivo.						
121B	Como arriba, po con poco citrato	C	largo	24	----	15	0.89
124B	Medio de melazas de remolacha	E	6	18	18, 23	46	
126A	30°C	E	2	8	11	..	0.72
126B	37°C	E	2.5	9	11	..	0.66
127A	Control sobre el medio	E	2	8	10	..	0.73
127B	Como arriba, sin extracto de lev.	C	1	7.5	9	54	0.56
131A	Azúcar purificado incrementos 1%	C	8	14.5	14, 23	48	0.57
131B	Como arriba, azúcar de melazas	G	3	11	11	29	0.45
133A	0.58% medio cítrico	F	2.5	10	13	51	0.66
133B	0.05% medio cítrico	B	2	8	10	60	0.66
136A	Agitación 600 rpm	C	2	7	7-8	62	0.70
136B	Agitación 1500 rpm (normal)	C	3	28	24	15	0.09
146A	40% O <sub>2</sub> en mezcla de aeración	C	2	7	8-9	53	0.51
146B	Aeración normal	C	2	8	9-10	55	0.59
148A	10.5% en la mezcla de aeración	C	2	8	8-9	51	1.00
148B	Aeración normal	C	1	7	9	48	0.66
150A	2.1% O <sub>2</sub> en la mezcla de aera	C	1	7	9	51	0.62
150B	Aeración norma)	C	1	11, 24	11, 24	18	0.29
188A	0.1 vol air/volmedio/min.	C	1	7	8	54	1.02
188B	1 vol aire/vol medio/min	B	1	8	10	55	1.06
220	pH rango 5.8-6.5, 150 lt, propa- gador, inoculo en lag fase de crec.	B	1	7	8	54	1.10
			0	7.5	8, 18	55	0.77

\* Ver tabla

† Tiempo lag es el intervalo entre el observado y el ideal rango de crecimiento exponencial estimado para los pesos de células lavadas y secas y vol de células frescas centrifugadas.

Suspendida la aeración y el cultivo enfriado a 20°C a 8 hrs, rendimiento cobalamina a 8 hr. fue 72% del de 18 hrs.

ticio. Pero si la vitamina se desea para propósitos medicinales, se lava la suspensión de las células y se calienta a 100° para provocar la autólisis y la liberación de la vitamina a la fase acuosa. Posteriormente la vitamina es concentrada y purificada.

Rendimientos.- Los datos concernientes a condiciones especiales de propagación del Bacillus megatherium NRRL B-938 bajo acreación forzada, medio empleado tiempo requerido para el máximo crecimiento de cianocobalamina. Y rendimientos de las células bacteriales y de cobalamina, por 100 g de azúcar, se representan en la tabla anterior (fig. XVI).

### 3.5 PRODUCCION DE VITAMINA B<sub>12</sub> POR MYCOBACTERIUM.

La producción industrial actual está basada en el descubrimiento de una cepa particular capaz de producir en condiciones apropiadas de crecimiento una notable cantidad de vitamina B<sub>12</sub>.

En los últimos años se ha realizado una continua investigación de nuevas cepas (1). Por otra parte se ha logrado un importante resultado mejorando la capacidad fermentativa de las cepas mediante sustancias empleadas por los microorganismos como precursores de la molécula de vitamina (cobalto, benzimidazol, ac. aminolevulinico (117) etc.

Por lo que se refiere a la micobacteria se ha estudiado la capacidad de producción de vitamina B<sub>12</sub>. Se pueden sin-

tetizar también un pigmento carotenoide, riboflavina, ácido fólico, ácido nicotínico, ácido paraaminobénzoico, biotina, tiamina, ácido pantoténico, pirodoxina, inositol y aneurina.

**Materiales y Métodos.-** Cepa de Micobacterium perteneciente a la colección del laboratorio de Microbiología del Instituto Superior de Sanidad.

**Medio de Cultivo.-** Se empleo un medio de Sauton, que contiene Tween 80 al 70% y una infusión de papa, glicerina y peptona (100).

**Extracción.-** Para extraer la vitamina el caldo de fermentación se lleva a la ebullición adicionado, con una solución estabilizadora de ácido acético-acetato de sodio (pH 4.6) durante 30 min.

**Resultados.-** Cantidad de vitamina presente normalmente en las muestras incubadas durante los 30 primeros días:

Vit B <sub>12</sub> ( g/l)		Vit B <sub>12</sub> ( g/l)	
Mycobacterium battaglini		Myc. phlei	
cepa Battaglini .....	-	cepa B 10 .....	30
" Butter .....	-	" Fleol Lausanne..	60
" Lanterna .....	25	" 619 .....	140
		" Moeller .....	25
		" Timoteo .....	30
Myc. lactiocola:		" Vip 27 .....	30

cepa Brinckerhoff .....	30	Myc. smegmatis:	
" Grassbacillus .....	45		
" Korn .....	16	cepa Smegma 19 .....	25
" Milch .....	18	" Smegmatis 53 .....	30
		" Smegmatis USA .....	35
Myc. marianum:		Myc. sp.:	
cepa Chauvire .....	14	Cepa Clegg I .....	50
		" Serpent S 20 .....	18
		" Zironi .....	18
Myc. minetti:			
cepa Enteritidis C 42 .....	20		

La vitamina se titula después de 20 días de crecimiento, el medio (Sauton) contiene 10 mg/l de  $\text{CoCl}_2$ ,

En la siguiente tabla se reportan los resultados obtenidos. Dos cepas (Mycobacterium batteglini y butter) no produjeron cantidades apreciables de vitamina  $\text{B}_{12}$ , 4 cepas (Myc. laticola, cepa brinckerhoff y grassbacillus; Myc. phlei cepa Fleol Lausanne Myc. smegmatis, cepa smegmatis USA) produjeron menos de 100  $\mu\text{g}/\text{l}$ . Los demás varían los valores de 120  $\mu\text{g}/\text{l}$  -- (Myc. marianum cepa chauvire) a 700  $\mu\text{g}/\text{l}$  (Myc. laticola cepa Korn)

Vit B<sub>12</sub> ( $\mu$ g/l)

Myc. battaglini	-
cepa Battaglini .....	-
" Butter .....	-
" Lanterna .....	170
Myc. lacticola	
cepa Brinckerhoff .....	60
" Grössbacilus .....	60
" Korn .....	700
" Milch .....	500
Myc. marianum	
cepa chauvire .....	120
Myc. minetti	
cepa Enteritidis C 42 .....	675

Vit B<sub>12</sub> ( $\mu$ g/l)

Myc. phlei	
cepa B 10 .....	580
" Fleol Lausanne...	45
" L 619 .....	350
" Moeller .....	400
" Timoteo.....	420
" Vip 27 .....	390
Myc. smegmatis	
cepa Smegma 19 .....	190
" Smegmatis 53 .....	225
" Smegmatis USA.....	45
Myc. Sp.	
Cepa Clegg I .....	200
" Serpent S 20 ..	500
" Zironi .....	220

En el curso de esta prueba se efectuó una titulación al 30o. día obteniéndose resultados superiores a los del 20o. día (ver tabla siguiente). En particular con la cepa Milch se ha logrado la cantidad máxima de vitamina B<sub>12</sub>.

Myc. lacticola	Vit B <sub>12</sub> (ug/l)
cep Milch -----	2150
Myc. phlei	
cepa L 619 -----	675
Myc. amegmatis	
cepa Smegma 19 -----	310
" Smegmatis USA -----	310
Myc. sp.	
cepa Serpent S 20 -----	1350

Estos datos demostraron que la Myc. lacticola cepa - Milch da la más alta producción de vitamina B<sub>12</sub> condicionada por la presencia del ión cobalto (Co<sup>++</sup>) y cianuro (CN<sup>-</sup>) en un terreno sintético de Tween 80 y un infusión de papa-glicerinato. Ambos medios permitieron un rápido crecimiento de la micobacteria.

Se ha comprobado que un medio al que no se adiciona Co<sup>++</sup> la cantidad de vitamina producida es de 50 µg/l y no -- aumenta sensiblemente con el tiempo. Con adición de 10 mg/l de CoCl<sub>2</sub> en el medio de crecimiento, después de 4 días la vitamina producida aumenta cerca de 4 veces y después de 6 días cerca de 7 veces de la cantidad producida sin cobalto.

---

dfas	Vit. B <sub>12</sub> µg/l	
	Sin Co <sup>++</sup>	Con Co <sup>++</sup>
4	50	210
6	60	420

---

La adición de  $\text{CN}^-$  al medio de crecimiento pudo aumentar el rendimiento de vitamina  $\text{B}_{12}$

Medio	Día	Vit. $\text{B}_{12}$ ug/l	
		sin $\text{CN}^-$	Con $\text{CN}^-$
Sin $\text{Co}^{++}$	6	60	69
con $\text{Co}^{++}$	6	420	460
sin $\text{Co}^{++}$	13	55	55
con $\text{Co}^{++}$	13	825	840

Se estudió la relación sobre el tiempo y la concentración de  $\text{Co}^{++}$  del medio mediante una serie de cultivos sumergidos. El  $\text{Co}^{++}$  adicionado en concentraciones de 0 a 300  $\mu\text{g}/\text{cc}$ .

Los resultados se enlistan en la tabla en los que se demuestra que el  $\text{Co}^{++}$  aumenta la producción de vit.  $\text{B}_{12}$  la concentración óptima de  $\text{Co}^{++}$  está comprendida entre 80 y 150  $\mu\text{g}/\text{cc}$ .

Con $\text{Co}^{++}$ $\mu\text{g}/\text{cc}$	5 días	Vit $\text{B}_{12}$ $\mu\text{g}/\text{l}$	
		8 días	10 días
0	50 (pH 7.4)	50 (pH 7.8)	50 (pH 8)
10	125 ( " 7.2)	260 ( " 7.4)	380 ( " 7.6)
20	125 ( " 7.2)	350 ( " 7.2)	440 ( " 7.4)
40	140 ( " 7 )	350 ( " 7.2)	590 ( " 7.2)
80	160 ( " 7 )	425 ( " 6.8)	705 ( " 7 )
150	160 ( " 7 )	350 ( " 7 )	705 ( " 7 )
300	180 ( " 6.8)	420 ( " 6.8)	600 ( " 6.8)

### 3.6 PRODUCCION DE VITAMINA B<sub>12</sub> POR PSUDOMONAS DENTRIFICANS.

Este proceso de fermentación reduce el costo de producción de Vitamina B<sub>12</sub> en un proceso continuo (86). Es conducida en un medio nutriente acuoso bajo condiciones aerobias. De acuerdo con esta patente el caldo de fermentación tiene una actividad de Vitamina B<sub>12</sub> de más de 3000  $\mu$ g/l después de --- 48 hrs. de fermentación lo que corresponde a una producción --- similar aproximadamente de 60  $\mu$ g de actividad por litro por hora.

El medio nutriente contiene carbón y nitrógeno asimilables y varias sales minerales. El medio es esterilizado antes de la inoculación.

El proceso de fermentación empleando Psudomonas dentrificans se efectúa en cultivo sumergido, con agitación y aereación; la temperatura se mantiene entre un intervalo de 25 a --- 37°C preferiblemente a 30°C, el máximo de producción de Vitamina B<sub>12</sub> se logra entre 48 y 96 hrs, el pH se ajusta entre --- 7.1 y 7.5. Todas las sustancias con actividad de Vitamina B<sub>12</sub> aumenta con el tratamiento con cianuro (U.S. Patent No. ---- 2,530,416).

En una técnica de fermentación continúa el proceso se --- realiza en un fermentador de 1000 litros que se carga con los siguientes nutrientes.

Gr.

Melaza de remolacha.....25,200



$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ .....	840
$\text{NH}_4\text{NO}_3$ .....	2,100
$\text{Na}_2\text{SO}_4$ .....	840
$\text{KCl}$ .....	336
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	210
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ .....	63
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	8.4
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	8.4
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .....	16.8
Agua hasta 378 L.	

El pH se ajusta 7.5 y el contenido del fermentador se -- esteriliza a 125°C durante 3/4 de hr.; posteriormente se enfría y se inocula con 42 l, del gene productor de vitamina B<sub>12</sub> de - Pseudomonas dentrificans, el cual se prepara previamente en un tanque de cultivo en un medio nutriente de la misma composi--- ción. La temperatura del fermentador se mantiene a 29°C, la co rriente de aire a 4 l-hr. y se agita con un impulsor Mixco a - 135 rev/min.

El aceite de frijol de soya se va añadiendo conforme se- va necesitando para controlar la espuma; el pH del fermentador se mantiene en un rango de 6.8 a 7.2 añadiendo hidróxido de so dio.

Se deja crecer el cultivo durante 24 hrs. y al final de- este tiempo, se introduce en el fermentador un medio nutriente con la misma composición a una velocidad de 466.6 cc/min. ----

6 281/h al mismo tiempo el caldo del fermentador es removido a la misma velocidad para que el volumen del fermentador se mantenga constante. A esta velocidad de flujo el volumen total del fermentador (420 l) fué sacado aproximadamente en 15 hrs., este tiempo fue llamado tiempo de transferencia.

Este procedimiento fue continuado hasta completar 7 transferencias aproximadamente en 15 hrs. El promedio de la producción de Vitamina B<sub>12</sub> fue de 2.3 µg/ml de caldo.

Se compara esta fermentación continua con una intermitente en un fermentador similar, cargado con los mismos nutrientes y siembra durante un período de 30 hrs. En dicho tiempo el máximo de producción de Vitamina B<sub>12</sub> fue de 2.4 µg/ml.

Cuando el caldo de fermentación se saca debe ser de nuevo lavado, cargado y esterilizado antes de fermentar otro lote ésto se efectúa aproximadamente durante 6 hrs., por lo que el tiempo total de cada lote es de 36 hrs. Consecuentemente, para completar el tiempo de 105 hrs. de 7 lotes, se necesiten 3 lotes para completar 108 hrs. Se encuentra que con el proceso de fermentación continua se obtienen el doble de sustancias activas de la vitamina B<sub>12</sub> que en el proceso de lotes, como se demuestra en la siguiente tabla.

Proceso	Tiempo de Fermentación	Actividad de Vit. B <sub>12</sub> por ml. microgramos	Volumen total litros	Producción total de actividad de B <sub>12</sub> microgramos.

---

Continuo	105 Horas	2.3.	2,940	6,780
	(7 transferencias).			
Lote	108 Horas	2.4	1,260	3,020
	( 3 lotes )			

---

### 3.7 PRODUCCION DE VITAMINA B<sub>12</sub> POR MICROMONOESPORA.

La producción de Vitamina B<sub>12</sub> producida por Micromono - espora (145), bajo condiciones aerobicas. Entre estas se encuentra la M. purpurea ( NRRL2953) M. echinospora ( NRRL 2985) M. echinospora var ferruginea ( NRRL 2995) M. echinospora var pallida ( NRRL 2996) M. carbonacea (NRRL 2997) M. halophytica (NRRL 2998) y M. sp (ATCC 10026) M. fusca (GBS 6 NRRLB-943) M. chalcea ( ATCC 12452) y otras.

La Vitamina B<sub>12</sub> es producida en fermentaciones relativamente cortas de tiempo y en concentraciones suficientes altas, el microorganismo es fermentado en un período de 1 a 7 días a una temperatura de 25 a 40°C, preferiblemente bajo condiciones aeróbicas en un medio nutriente acuoso.

cuando el medio nutritivo es sintético y altamente purificado es necesario la adición de nutrientes minerales tales como sales de potasio, azufre y fósforo, trazas de zinc, hierro, magnesio, manganeso y cobalto y precursores tales como el 5,6, dimetilbencimidazol o iones cianuro.

La Vitamina B<sub>12</sub> se separa del caldo resultante de la -- fermentación por una separación preliminar que se efectúa acidificando todo el caldo y filtrando para remover toda la pasta. El filtrado se neutraliza; el caldo neutralizado se pasa a través de una columna de intercambio catiónico ( tal como - Amberlite IRC-50 en forma sódica) o agitando el lote con la - resina; el filtrado de la resina se extrae con un solvente -- inmiscible en agua, tal como cloroformo .

El caldo libre contiene los antibióticos. Este se trata con - carbón activado (preferiblemente de 20 a 40 mallas) sobre las - cuales se absorbe la vitamina B<sub>12</sub>.

El carbón activado que contiene la Vitamina B<sub>12</sub> absorvida se separa por filtración y la Vitamina B<sub>12</sub> se separa del - carbón por agitación con una base orgánica, preferiblemente - piridina. De esta base se transfiere la vitamina a una solu-- ción en alcohol bencílico, se absorbe sobre alúmina activada, eluyendo con metanol y posteriormente precipitando con aceto- na-eter.

Empleando Micromonospora purpurea se sigue la siguien- te técnica.

Germinación.- Se añade un cultivo liofilizado de M. pur purea en un matraz con agitador de 300 ml. conteniendo 100 ml. del siguiente medio esteril.

Extracto de carne (BACTO)	g	3
Triptosa	g	5
Dextrosa	g	1
Almidón (soluble)	g	24
Extracto de Levadura	g	5
Agua de la llave hasta-completar.	ml.	1000

Cultivado en frasco durante 5 días a 37°C sobre un agitador rotatorio (280 rpm).

Preparación del cultivo.- Se transfiere 25 ml. del cultivo de germinación a 4 matraces de 2,1 conteniendo cada uno --- 500 ml. (del mismo medio empleado en la germinación). Se mantienen los matraces durante 5 días a 28°C se usa el siguiente medio:

Harina de Soya	g	30
Dextrosa (Cerelesa)	g	40
Carbonato de Calcio	g	1
Agua de la llave	ml.	1000

Fermentación.- Los 10 l que se obtienen de la preparación del cultivo se transfieren a un fermentador de 250 litros en el que se tienen 200 l. del siguiente extracto:

Extracto de carne	g	600
Bacto Triptosa	g	1000
Dextrosa (cerelesa)	g	200
Almidón (soluble)	g	4800

Extracto de Levadura	g	1000
Anti-espumante G E 60	ml.	100
Agua hasta completar	l	200

Se ajusta el pH de 6.9 a 7.0 después de la esterilización. Se fermenta aeróbicamente durante 20 a 30 hrs., bajo las siguientes condiciones:

Temperatura	37°
Aire esteril	150 lt/min.
Presión,,	0.05 kg/cm <sup>2</sup> arriba de la atmosférica.
Agitación	180 rpm.

Se transfiere el caldo de fermentación a un fermentador 3000 lt. que contenga 1800 lt. del siguiente medio:

Extracto de Levadura	Kg.	17
Dextrosa	Kg.	17
Carbonato de Calcio	Kg.	17
Anti-espumante G.E. 60	ml.	500
Agua hasta completar	l.	1800

Se fermenta a 35°C por una agitación de 120 rpm, el aire a 0.03 Kg/cm<sup>2</sup> arriba de la atmosférica y 100 cc/min., durante 24-26 hrs.

Separación de la substancias antibióticas.- Se acidifica el caldo de fermentación con ácido sulfúrico 12N a pH2. Se añaden 25 kg. de carbón y se filtra. Se neutraliza el filtrado con sosa 12N; se añaden 14 kg. de ácido oxálico, con agitación;

se vuelve a neutralizar con sosa 12N; se agita durante 24-48 - hrs. y se filtra, se pasa el filtrado a través de una columna de absorción de intercambio catiónico ( Amberlite I R C - 50) - en forma sódica 18-20 l).

El filtrado se concentra y purifica para obtener la Vitamina- B<sub>12</sub> en forma cristalina.

### 3.8.- PRODUCCION DE VITAMINA B<sub>12</sub> DEL DRENAJE MUNICIPAL.

Durante las investigaciones realizadas sobre la oxidación biológica de los desperdicios se encontró vitamina B<sub>12</sub> (123) en el lodo aerado de una planta de tratamiento del drenaje municipal (67). Para probarlo se emplea una técnica de destrucción alcalina de la vitamina y por una separación cromatográfica, sobre papel, de los otros materiales, se probó que estimulaba el crecimiento de organismos (152). La cantidad de vitamina B<sub>12</sub> obtenida por el proceso de desnutrición alcalina se muestra en la tabla (fig. XVII).

1	2	3	4
Muestra	B <sub>12</sub> µg/g aparente.	Factores de crecimiento estables alcali (como B <sub>12</sub> µg/g)	Vitamina B <sub>12</sub> (por diferencia µg/g)
Lodo de desperdicios del queso. -- Húmedo.	9.8	1.5	7.3
Lodo del drenaje municipal			
Húmedo	9.7	0.4	9.3
Liofilizado	6.7	.4	6.3
Secado durante 24hr. a 105°C	4.0	.4	3.6
Secado durante 24 hr. a 70°C con circulación de aire	7.0	.4	6.6
Secado a vacío en su secador de tambor	2.7	.3	2.4
Producto comercial			
Muestra A	3.2	0.4	2.8
Muestra B	6.4	2.0	4.4

Fig. XVII.- Contenido de vitamina B<sub>12</sub> en el lodo activado.



Se ha empleado como suplemento alimenticio, un contenido de Vitamina B<sub>12</sub> de 3.3. µg/ g.

La materia prima es un extracto acuoso de Milorganite- el cual se prepara de acuerdo con el método de Minr y Wolnak - (92a). El Milorganite es el lodo activado resultante de los - tratamientos microbilógicos del drenaje municipal.

El milorganite se extrae para obtener el concentrado - acuoso que contiene la Vitamina B<sub>12</sub>. Este concentrado acuoso - se purifica tratándolo con una resina de intercambio iónico -- (140).

El extracto acuoso de milorganite se combina con nitrógeno de sodio y cianuro de potasio. La solución resultante se -- ajusta a con pH 4.0 con ácido clorhídrico y se calienta a ebullición; Esta solución se filtra a través de una resina de intercambio iónico Amberlite X E-97 con:

- (1) Una solución acuosa de HCl 0.1N
- (2) Una solución acuosa de HCl 0.N
- (3) Una solución acuosa al 85% de acetona

Se diluye con una solución .ocupa al 60% de dioxano -- que contiene HCl 0.1N y se recolecta la porción colorida.

Para extracción se probaron varios procesos de filtración, para obtenerlo lo más claro posible, en una planta piloto con agua caliente bajo agitación (78a). El filtrado así obtenido fue purificado posteriormente con carbón activado o resinas de intercambio. El proceso de filtración se facilita adi

cionando algunos precipitantes. Se encontró que se pierde Vitamina B<sub>12</sub> por el agua de lluvia cuando se emplea el proceso de evaporación solar del lodo durante el verano, por lo cual se emplea otro método de extracción (4). No se emplea calentamiento sino inmersión o lavados en agua caliente, así se logró un rendimiento de 3.5 µg/ml equivalente a 200 µg/g de extracto deshidratado.

4.- C O N C L U S I O N E S .

Debido a que los procedimientos citados para la obtención de Vitamina B<sub>12</sub> requieren métodos microbiológicos, en los cuales la industria de la fermentación juega al factor principal, es recomendable ampliar nuestros conocimientos tanto en la rama de la microbiología industrial, como de la bioingeniería, para facilitar la manipulación de los microorganismos, así como al manejo de los fermentadores y accesorios que requieren estos aparatos.

Ya que los microorganismos productores de la Vitamina B<sub>12</sub> solo la sintetizan en pequeñas cantidades en forma de un subproducto; es posible incrementar la producción mediante el uso de técnicas depuradas, como lo son:

- Conservación de la cepa productora, no permitiendo cambios genéticos, que puedan ocasionar una baja en el rendimiento del producto deseado.
- Investigación continua con objeto de mejorar, mediante mutaciones irreversibles, el rendimiento del producto deseado.
- Investigación de tiempo de fermentación, temperatura óptima; pH óptimo, medio de cultivo apropiado y uso de precursores y activadores.
- Modificaciones, a los fermentadores, tales como aereación, velocidad de agitación, tipo de propela uso de deflectores, antiespumantes apropiados todas ellas con el fin de aumen-

tar la producción de biomasa y, como consecuencia, del producto deseado. Puede llegar el caso de que se obtenga una cepa de algún microorganismo que sea capaz no sólo de dar mejores rendimientos de la Vitamina B<sub>12</sub> sino también pueda conducir a métodos por los cuales su obtención sea más económica .

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Antonello Antonelli, Ren.Ins.Super. Sanita 25,417 (1962)
- 2.- Alicino;J. Amer. Chem Soc. 1951,73,4051
- 3.- Barer R. Cole. A.R.H. y Thompson H.W., Nature 163,198(1949)
- 4.- R.M. Bakaeva, Trudy Leningrad Khim.Farm.Inst.1960,9,119;  
C.A. 56 5216H (1962)
- 5.- Baldwin, Lowry y Harrington, J.Amer. Chem. Soc. 78 64968  
(1951).
- 6.- Barker F.A. Boley A.E. y Shonk C.E. Anal Chem 26,1146 (1954).
- 7.- Barker H.A. y Colaboradores J. Biol. Chem 235, 181 (1969)
- 8.- Baeven y Colaboradores, J. Pharm. Pharmacol. 1957. (1949)
- 9.- Baeven y Colaboradores, Pharm. Pharmacol, 2,773:944 (1950)
- 10.- Bernhauer y Friedrich, Angew. Chem 66,776 (1954)
- 11.- Bernhauer y Friedrich, Chem. Ber. 89,2030 (1956)
- 12.- Bonnett y Col, J. Chem.Soc. 1148 (1957)
- 12a.-Bonnett y Col, J. Chem.Soc. 1158 (1957)
- 13.- Boos, Rosenblein y Woodbury, J. Amer. Chem. Soc.73,5446 (1951)
- 14.- Boxer G.E. y Rickars J.C. Arch Biochem 29,75 (1950)
- 15.- Boxer G.E. y Rickars J.C. Arch Biochem 30,382 (1951)
- 15a.-Boxer G.E. y Rickars J.C.,Arch. Biochem 30,392 (1951)
- 16.- Boxer G.E. y Rickars J.C.,Arch.Biochem 39,281 (1952)
- 17.- Bradley J. E. y Colaboradores, Lancet II,476 (1954)
- 18.- Brink & Folkers, J. Amer. Chem.Soc.72,4442 (1950)
- 19.- Brink y Folkers, J. Amer. Chem.Soc. 74,2856 (1952)
- 20.- Brink & Folkers, Science 112,354 (1950)

- 21.- Brink y Colaboradores, J. Amer. Chem.Soc. 71, 1854 (1949)
- 22.- Brown, F. y Colaboradores, Biochem. J. 59-82 (1955)
- 23.- Bruening C.F. y Colaboradores, J.Am.Pharm.Assoc. 46, 66 (1957).
- 24.- Buchanan y Colaboradores, J. Chem Soc. 1950, 2845.
- 25.- Burkholder P.R. Science, 114,459 (1951)
- 26.- Chincin Gygyyszer es Vegyszeti Termekek Gyera RT (Hung 151, Ol9, Dec. 1963 App. May 16 (1962) C.A.74:11345b (1964).
- 27.- Chaiet L. Miller T. y Boley A.E.J. Agr. Food Chem 2, 784 (1954).
- 28.- Chaiet L. RosenBlum A. y Woodbury D.T.Science 111,601 (1950)
- 29.- Chargaff, Levine, Green y Krean, Experientia 6, 229 (1950)
- 30.- Cohn y Colaboradores, J. Biol. Chem 77, 325 (1928).
- 31.- Cooley y Colaboradores, J. Pharm Pharmacol, 5, 257 (1953)
- 32.- Cooley y Colaboradores J. Pharm Pharmacol, 3, 271 (1951)
- 33.- Darken, Botan, Rev. 19, 99 (1953)
- 34.- Diehl, Morrison, Sealock, Experientia 7.60 (1951)
- 35.- Diehl, Vander, Haar y Sealock, J. Amer.Chem.Soc. 72, 5312 (1950).
- 36.- Duggan D.E. y Colaboradores, Arch Biochem. Biophys 68, 1 (1957)
- 37.- Dulaney E.L. y Williams P.L., Mycologia 45, 345 (1953)
- 38.- Eichhorn, G.L.U, Tetrahedron, 13, 208 (1961)
- 39.- Ellis, Petrow y Snook, J.Pharm Pharmacol, 1.60 (1949)
- 40.- Emerson G.S., Proc.Soc. Expe.Biol. Med.70, 392 (1949)
- 41.- Emery W.B. y Parker L.F.J., Biochem J.40, iv. (1946)
- 42.- Fantes K.H.Ireland D.M. y Green N., Biochem J.46 (1950).

- 43.- Fantes y Colaboradores S.L., Proc. Roy.Soc. B, 136, 592 (1949)
- 44.- Farmacopeia Primer Supplement, P.I. (1956).
- 45.- Fausel y Humfel, Jour Bact. 52, 229, (1946)
- 46.- Fisher R.A., J. Agr. Food Chem, 1, 951 (1953)
- 47.- Ford J.E., Brit. J. Nutr. 7, 299 (1953)
- 48.- J. Ford y Hunter, Vit. & Horm. 13, 101 (1955)
- 49.- Ford J.E. y Porter J.W.G., Brit. J.Nutr. 7, 326 (1953)
- 50.- Frost D.V. Friche H.H. y Spruth H.C., Proc.Soc.Exp.Biol. Med. 72, 102 (1949)
- 51.- Garbers y Colaboradores, Helv.Chim.Acta 36, 65 (1953)
- 52.- Garbers y Colaboradores, Helv.Chim.Acta 38, 1490 (1955)
- 53.- Greene R.D. Brook A.J. y McCormack R.B., Biol.Chem. 178, 990 (1949).
- 54.- Grün y Menassé, Experientia VI/7, 263 (1950)
- 55.- Garibaldi y Feeny, Ind.Eng.Chem. 41, 432 (1949)
- 56.- Garibaldi y Colaboradores, Ind. & Eng. 45, 838 (1953)
- 57.- Hall H.H. Benediot R.G. Wiesen C.E. Smith C.E. y Jackson R.W., Appl. Microbiol. 1 (3) 124 (1953).
- 58.- Heinrich H.C. Z. Anal Chem. 135, 251 (1952)
- 58a.-Hester A.S. y Ward G.E. Ind.Eng.Chem 46, 238 (1954)
- 59.- Hoff-Jorgensen E.J. Biol.Chem, 178, 525 (1959)
- 60.- Hodking D.C. y Colaboradores, Nature 176, 325 (1955)
- 61.- Hodking D.C. y Colaboradores, Proc.Roy Soc. (London) A, 242, 228, (1957).
- 62.- Hodking D.C. y Colaboradores, Proc.Roy.Soc. (London) A, 266, 440, (1962).

- 63.- Hodking D.C. y Colaboradores Proc.Roy.Soc. (London) A, 226,449 (1962).
- 64.- Hodking D.C. y Colaboradores, Proc.Roy.Soc. (London) B, 136,609 (1949).
- 65.- Hoffman C.E. et. al. J. Biol. Chem 181,635 (1949)
- 66.- Holly, Peel, Chill, Lavinge & Folkers J.Amer.ChemSoc. - (1952).
- 67.- Sam R. Hboree, Lenore B. Jasewicz Science, 114,213 (1951)
- 68.- Humfeld H. Jour Bact. 54 (6) 689 (1947)
- 69.- IUPAC, J. Chem Soc. 1951, 3526
- 70.- J. Amer. Chem Soc. 82,5582 (1960)
- 71.- G.W. Jackson, G.B. Whilfield J. Amer Chem. Soc. 73,337 (1951).
- 72.- Janicki J. Pawelkiewics J. Stawicki S.Zodriw K. Anal.- Abster 1,1110 (1954).
- 73.- Janicki J. Pawelkiewics y Colaboradores Prozem, Chem.- 9,385 (1953).
- 74.- Janicki J. y Colaboradores, Przem. Chem. 32,509 (1953)
- 74a.-Jones K.L.Jour Boct. 56,141 (1949)
- 75.- Jukes y Colaboradores (J.Biol.Chem. 180,647 (1949).
- 76.- Kaczka y Colaboradores J. Amer Chem Soc.71,1514 (1949).
- 76a.-Kaczka y Colaboradores, Science 112,354 (1950)
- 77.- Kaczka, Wolf, Kuehl & Foljers J. Amer Chem.Soc.73,3569 (1951).
- 78.- Kaczka, Heyl, Jones & Folkers, J. Amer Chem.Soc.74,5549 (1952).
- 79.- Kometani Kiyomasa, Bitamin (Kyoto) 23(2) III (1961)
- 80.- M. Kliewer y Evans Nature 194,108 (1962): 195,828.



- 81.- I.V. Konova y A.I. Borisova, Mykrobiologiya xxx, 1, 27 (1961).
- 82.- I.V. Konova L.L. Lisenkova G. Mykrobiologiya 33, 528 (1964).
- 83.- Peter G. Lim U.S. Patente 3,411,991 (1968).
- 84.- Lees K.A. y Tootill J.R.P. Analyst 80, 95 (1955)
- 85.- Lees K.A. y Tootill J.R.P. Analyst 80, 110 (1955).
- 86.- Long. Robert A., Parlin N.J. U.A. Patent 3,018,225 (1962).
- 87.- Lemberg y Legge "Heamatin Compounds and Bile Pigments" Interscience Publ. New York 1949 p. 72
- 88.- Levin A.P. H.B. Funk y M.D. Tendler, Science 120, 784 (1954).
- 89.- E.N. Ligtfoot Jr. y R.J. Taylor U.S. Patent 2,787,578 Abr. 1957 C.A. 51, 14210 (1957).
- 90.- Marsh M.N. Y Kuzel N.R., Anal Chem 2, 1773 (1951)
- 90a.- McConnell, Duerell, Petrow y Sturgcon, J. Pharm, Pharmacol 5, 179 (1953)
- 91.- McLaughlin J.M. Rogers C.G. Midelenton E.J. y Campbell J.A. Can. J. Biochem Physiol 36, 195 (1958)
- 92.- Methods of Analysis of the Association of Association - of Official Agricultural Chemists 9th Edition 1.665 (1960)
- 92a.- Minr & Wolnak U.S. Patent No. 2,646,386
- 93.- Muir y Neuberger, Biochem J. 45, 163 (1949)
- 94.- Muir y Neuberger, Biochem 47, 97 (1950)
- 95.- Natham H.A. Barker H. y Frank ) O. Nature 188, 35 (1960)
- 96.- Natham H.A. y Funk H.B. Proc. Soc. Biol. Meid. 109, 213 (1960)
- 97.- Otto W.H. Rickers E.L. y Wood T.R.J. Biol. Chem. 174, 1047. (1948).

- 98.- Ya G. Papova y M.N. Beshkov. Nauchni Tr Vissh. Inst. -  
Kharanteln Vkusova Pro. Plovdiv 10,63-70 (1963) C.A. -  
61,11295 (1964).
- 99.- Pealer H.T. Yacowits H. Morris L.C. Proc.Soc.Exp.Biol..  
Med. 72,515 (1949).
- 100.-Penso G. Rend., Ins. Sanita Pubbl. 337 (1940).
- 101.-Petrov y Colaboradores J. Pharm Pharmacol 5,60 (1953)
- 102.-Pfeiffer R.T. Vojnocich C., y Reger E.N. Ind.Eng.Chem.  
46,843 (1954).
- 103.-Prescott S. y Gordon C.Industrial Microbiology New York  
Mc. Gram Hll 3th ed. (1962).
- 104.-Price, Page, Stokstard y Jukes, J. Amer. Chem Soc.71,2952  
(1949).
- 105.- I.V.Price y A.C. Page y Colaboradores J. Amer Chem.Soc.  
72,2615 (1950).
- 106.-Rester A.S. y Ward G.E. (Ind.Eng.Chem. 6,238 (1954).
- 107.-Rickes y Colaboradores (Science 107,396) (1948)
- 108.- Rickes y Colaboradores (Science 108,134) (1948).
- 109.-Rickes y Colaboradores (Science 108,634) (1948)
- 110.-Rickes E.L.Rahway y Wood R.T. (U.S. Patent, 2,703,303;  
2,703,02.
- 111.-Rilay y Abraham Leviton y Hargrove H.E., Ind. & Eng.Chem  
44,2651 (1962).
- 112.-Robbins,W.J. y Colaboradores, Science 112,255 (1950).
- 113.-Rudkin G.O. Jr. y Taylor R.J. (Anal Chem. 24,1155) (1962).
- 114.-Hernan Rudy, Johann Raych, Karl R. Dietrich y Crista -  
Constabel U.S. 3,085,049 (Cl.195-80) Apr 9,1963 Ger.Appl.  
Oct. 13,1955 C.A. 59,5441 (1963).
- 115.-Russell-UCLAF Brit. 867,537 Ol,007g CKK May 10 (1961)  
Fr Appl Feb 15, (1957) C.A. 60.12635 (1964).

- 116.- Rydon y Smith Nature, 169,922 (1952).
- 117.- Schemin D. Corcoran J.W. Rosenblum C. Miller I.M.Science 124,272 (1956)
- 118.- Schindler O.Helv. Chem. Acta 34,1356 (1951)
- 119.- O. Schinder y T. Reichstein, Helv. Chem. Acta 35,307 (1952).
- 119a.-Shaposhkikov V.N. y Colaboradores Mikrobiologiya 31,716 (1948) (1962).
- 120.- Shieve W. Ravel J.M. y Eakin R.E. J Amer Chem. Soc. - 20,2614 (1948).
- 121.- Shmed, Ebnöther y Kerrer Helv. Chem Acta 36,65 (1953)
- 122.- Shorb M.S. Science 107,397 (1948)
- 123.- Skeggs H.R. Nepple H.M. Valentik K.A. Huff J.W. y Wright L.D.J. Biol. Chem 184,211 (1950).
- 124.- Smith Vitamin B<sub>12</sub>
- 125.- Smith E.L. Biochem, Soc. Symposia (Cambridge Eng.13,3 (1955).
- 126.- Lester Smith, Bill & Ireland, Biochem J. 1952, 52395
- 127.- Smith E.L.Hockenull D.J.D. y Quilter A.R.J. Biochem J. 52,387 (1952).
- 128.- Lester, Smith, Rantes, Ball, Waller, Emery, Anslow y Walker, Biochem J. 1952,52,389.
- 129.- Lester Smith y Colaboradores Naure, 161,638 (1948)
- 130.- Lester Smith y Colaboradores Nature 162,144 (1949)
- 131.- Lester Smith y Colaboradores. Proc. Roy Soc.B.L. 6,592 (1949).
- 132.- John D. Speedie, Bebington, Wirral y Geoffrey U.S. Patente 2,51,017 (1960).
- 133.- Speedie J.B. y Hull G.W. U.S. Patente 2,951,01 (1960)

- 134.- Shemin D. Science, 124,272 (1956).
- 135.- Snell E.E. Kitay E. y McNutt W.S. J. Biol. Chem 175,143 (1948).
- 136.- Snell E.E. Kitay E. y McNutt W.S. J. Biol.Chem 177,993 (1948).
- 137.- Stokstad E.L. Jukes T.R. Pierce J. Page A.C. Jr y Franklin A.L. J. Biol. Chem 180,647 (1949).
- 138.- Thompson H.T. Dietrich L.S. y Elvehjem C.A. J. Biol. - Chem. 184,175 (1950).
- 139.- Van Melle P.J. J. Am. Pharm Assoc. Sci. Ed. 45,25 (1956)
- 140.- Van Melle P.J. U.S. Patent 3,059851 Oct. 9 (1962).
- 141.- L.I. Vorobbeva y V.S. Kuznetsova. Mikrobiologiya 33,1,26 (1964).
- 142.- L.V. Vorob'eva L.F. Kozyreva y L.L. Lisenkova, Mikrobiologiya 36,410 (1967).
- 143.- V.A. Utenkove A.V. Zalenshchkova y M. Ya Kalyuzhnyi. Vitamin Resursy i ikh Ispolzakad Nauk SSSR Inst. Berkin Sb 1961 No. 5,74-81. C.A. 57,6419 (1962).
- 144.- Wallmann. Cunnigham y Calvin Science 1951,113,55.
- 145.- Weinstein Maevia. U.S. Patent 3,169 100 Feb. 1965.
- 146.- Weygand F. Klebe H. Trebst A. Z. Nature Forsch 9B, 449 (1954).
- 147.- Whilmarsh J.M. Briytish Fermentation Industries, London I Pitman (1958) p. 1333
- 148.- Wittenburg y Shemin J. Biol. Chem. 1950,185.103
- 149.- Wittenburg y Shemin J. Biol. Chem. 1951,192,315.
- 150.- Wright L.D. Skeggs H.R. y Huff J.W. J. Biol. Chem 175, 475 (1948).
- 151.- Wolf, Jones, Valiant & Folkers, J. Amer, Chem, Soc. - 72,2820 (1950).
- 152.- Yacowitz H. Norns L.C. y Heuser CF. Proc.Soc.Expt. l Biol. Med 71,387 (1949)