



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN



PRODUCCION DE NAD POR VIA FERMENTATIVA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO EN ALIMENTOS

P R E S E N T A

REFUGIO GONZALO / MARTINEZ ESTRADA

Asesor: Q: F. B. Susana Patricia Miranda Castro

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1994

TEESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

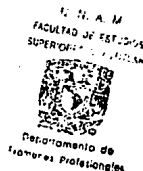
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN
AV. PUEBLA 11
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
SECRETARIA ACADEMICA
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N:

Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

_____ Producción de NAD por vía fermentativa _____

que presenta el pasante: Refugio Gonzalo Martínez Estrada
con número de cuenta: 8301647-1 para obtener el TITULO de:
Ingeniero en Alimentos

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 12 de mayo de 1994

PRESIDENTE	<u>I.B.Q. Francisco Montiel Sosa</u>
VOCAL	<u>O.F.B. Susana Patricia Miranda Castro</u>
SECRETARIO	<u>O.F.B. Ma. Esther Revuelta Miranda</u>
PRIMER SUPLENTE	<u>M. en C. Stella Maris Benítez Rivera</u>
SEGUNDO SUPLENTE	<u>M. en C. Rubén Darío Franco Torres</u>

Agradezco a mi asesor de tesis profesora Patricia Miranda Castro todo el apoyo otorgado para la realización del presente trabajo.

Con cariño a mis padres :

Pedro y Catalina.

a todos mis hermanos

a todos mis amigos

a mi novia Magda

PRODUCCION DE NAD POR VIA FERMENTATIVA

RESUMEN

CAPITULO 1 . - INTRODUCCION

GENERALIDADES.

Proceso de fermentación..... (1)

Microorganismos empleados en las fermentaciones

Levaduras..... (3)

Hongos (5)

Bacterias (6)

Coenzimas (8)

GENERALIDADES DEL NAD.

Caraterísticas físicas, químicas, usos, obtención y espectro del NAD..... (11)

Microorganismo productores de NAD (14)

Producción de NAD por *Brevibacterium ammoniagenes*..... (14)

Producción de NAD por Levaduras (15)

Producción de NAD por *Aspergillus* (17)

Producción de NAD por *Bacillus sp.* (19)

JUSTIFICACION...... (20)

OBJETIVOS

Objetivo General (22)

Objetivos Particulares (22)

CAPITULO 2 . - METODOLOGIA.

Metodología (23)

EXPERIMENTOS.

Crecimiento del *Bacillus sp.* en medio Luria-Bertrani..... (25)

Crecimiento del <i>Bacillus sp.</i> en medio mínimo.....	(26)
---	------

Crecimiento del <i>Bacillus sp.</i> en medio mínimo variando la concentración de la fuente de carbono.....	(26)
--	------

Crecimiento del <i>Bacillus sp.</i> en medio mínimo variando la concentración de la fuente de nitrógeno.....	(27)
--	------

Crecimiento del <i>Bacillus sp.</i> en medio mínimo adicionando pulsos de dextrosa	(27)
---	------

Crecimiento del <i>Bacillus sp.</i> en medio mínimo adicionando pulsos de dextrosa- sulfato de de amonio.	(28)
--	------

Crecimiento del <i>Bacillus sp.</i> en el fermentador	(28)
--	------

CAPITULO 3 . - RESULTADOS Y DISCUSION.

RESULTADOS	(29)
------------------	------

DISCUSION	(46)
-----------------	------

CAPITULO 4 . - CONCLUSIONES

CONCLUSIONES	(49)
--------------------	------

CAPITULO 5 . - ANEXOS

ANEXOS	(52)
--------------	------

CAPITULO 6 . - BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA	(64)
--------------------	------

INDICE DE FIGURAS

NUMERO	NOMBRE	Pág
1	Espectro de absorción del NAD Y NADH2.....	(13)
2	Mecanismo de la síntesis de NAD por <i>Brevibacterium Ammoniagenes</i>	(15)
3	Mecanismo de la síntesis de NAD por <i>Aspergillus</i>	(18)
4	Crecimiento del <i>Bacillus sp.</i> en medio Luria-Bertrani.....	(29)
5	Crecimiento del <i>Bacillus sp.</i> en medio mínimo.....	(30)
6-10	Crecimientos del <i>Bacillus sp.</i> variando la concentración de la fuente de carbono.....	(31-33)
11-15	Crecimiento del <i>Bacillus sp.</i> variando la concentración de la fuente de nitrógeno.....	(35-37)
16-17	Crecimiento del <i>Bacillus sp.</i> adicionando pulsos de dextrosa.....	(39-40)
18-19	Crecimiento del <i>Bacillus sp.</i> adicionando pulsos de dextrosa-sulfato de amonio	(41)
20	Crecimiento del <i>Bacillus sp.</i> en el fermentador.....	(43)
21	Consumo de dextrosa en el fermentador	(44)
22	Producción de NAD en el fermentador.....	(25)
23	Curva estandar de dextrosa.....	(58)
24	Curva estandar de NAD.....	(60)

INDICE DE CUADROS

NUMERO	NOMBRE	Pág
1	Funciones que desempeñan las levaduras en algunos procesos.....	(4)
2	Algunos productos derivados de hongos.....	(6)
3	Productos y procesos en los que se emplean bacterias.....	(7)
4	Síntesis de las funciones y fuentes de algunas coenzimas.....	(9)
5	Algunos microorganismos productores de NAD.....	(14)
6	Velocidad de crecimiento, densidad optica y tiempo de duplicación obtenidos de los crecimientos variando la concentración de la fuente de carbono.....	(34)
7	Velocidad de crecimiento, densidad optica y tiempo de duplicación obtenidos de los crecimientos variando la concentración de la fuente de nitrógeno.....	(38)
8	Resultados promedio de los experimentos realizados a nivel matraz.....	(42)
9	Componentes del medio Luria-Bertrani	(52)
10	Componentes del medio mínimo.....	(53)
11	Medio sólido de crecimiento.....	(54)

RESUMEN

Se trabajo sobre la optimización del medio de cultivo del *Bacillus sp*^{MR} sobreproductor de NAD.

Considerando el medio de cultivo original en donde el microorganismo expresa la producción de NAD, se hicieron variaciones en la concentración de la fuente de carbono y de nitrógeno, así como en la forma de adición de estos nutrientes.

A nivel fermentador de 14 litros, se logró obtener una velocidad de crecimiento de 1.02 hr^{-1} comparada con 0.298 hr^{-1} que originalmente se tenía. La producción de biomasa se vió incrementada en un 40 % de la original, y se obtuvo una producción de NAD de 809.12 mg/l .

INTRODUCCION

GENERALIDADES

PROCESO DE FERMENTACION 16

Desde el punto de vista industrial, los procesos de fermentación se definen como, todos aquellos procesos que bajos condiciones controladas, se destinan a la producción de compuestos bioquímicos, los cuales se obtienen a partir de la acción de los microorganismos sobre determinados sustratos. Así, las reacciones generales de esos procesos se puede representar de la siguiente manera:

$$\begin{array}{l} \text{Condiciones} \\ \text{fisicoquímicas} \\ \text{controladas.} \end{array} + \begin{array}{l} \text{Medio de} \\ \text{crecimiento} \\ \text{(incluye el sustrato)} \end{array} + \text{Microorganismo} =$$

Microorganismo + Productos (intra y extracelulares).

Es decir, para que una fermentación se realice es necesario tener: un microorganismo de características idóneas para el proceso y/o producto en particular, proveer un medio de cultivo adecuado (que contenga todos los nutrientes indispensables en las proporciones y cantidades óptimas de producción) y finalmente, establecer y controlar las condiciones fisicoquímicas necesarias para el desarrollo de la fermentación.

Como resultado se obtendrá una cantidad de microorganismos mayor que la inicial y diversos productos (antibióticos, esteroides, enzimas, ácidos orgánicos, etc). Todas estas variables son las que interaccionan y deben optimizarse para lograr un proceso adecuado. Sin embargo, no debe olvidarse, que un proceso de fermentación comprende, en un sentido más amplio, no sólo de las reacciones

bioquímicas efectuadas por el microorganismo y/o por la enzima sino que también considera las características físicas y de operación del recipiente en donde se lleva a cabo y las operaciones que se efectúan antes y después de la fermentación.

Además para que éste sea practicable a nivel industrial debe cumplir con ciertos requisitos, los cuales se mencionan a continuación:¹¹

- a) El microorganismo que se emplee deberá ser capaz de producir o transformar grandes cantidades del producto y tener características bastante estables. También capacidad de desarrollo y no ser patógeno.
- b) El medio, incluyendo el sustrato del cual el microorganismo producirá el nuevo producto, deber ser barato y fácilmente obtenible en grandes cantidades. En muchas ocasiones, por ejemplo, se ha encontrado practicable aprovechar los desperdicios que contienen material nutritivo de la industria lechera (suero), de la industria del papel (líquido de desecho que resultan del cocinado de la madera, líquidos de desecho con sulfitos) y otras operaciones comerciales.
- c) El producto formado por el metabolismo de los microorganismos está en una mezcla heterogénea formada de la enorme cosecha de las células microbianas, los componentes poco comunes del medio, y algunos productos del metabolismo distintos a los que se planea obtener. Esto, cuando se hace a gran escala, exige poner en marcha métodos de recuperación y purificación para lograr un buen producto final.

MICROORGANISMOS EMPLEADOS EN LAS FERMENTACIONES.

Los microorganismos empleados en la industria para el proceso de fermentación son:

LEVADURAS. El uso más importante y conocido de las levaduras es la producción de alcohol etílico a partir de materiales que contengan carbohidratos. Este proceso es el usado en cervecerías, destiladoras, panaderías, vinaterías, laboratorios químico, manufacturas domésticas y muchas otras industrias.

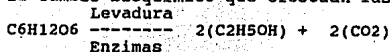
Los aspectos microbiológicos del proceso para obtener alcohol etílico se resume de la siguiente manera:¹¹

a) Sustrato. Se puede conseguir alcohol etílico de cualquier carbohidrato fermentable por levaduras. Cuando se usan como material crudo almidones, el maíz y otros carbohidratos complejos, es necesario primero hidrolizarlos a azúcares simples. La hidrólisis se realiza con enzimas de malta de cebada u hongos, o tratando con calor el material acidificado. Los materiales crudos que se emplean más frecuentemente son maíz, melazas, mieles azucaradas, patatas y uvas.

b) El microorganismo. Comúnmente se emplea cepas seleccionadas de *Saccharomyces* para la fermentación. Es necesario que el cultivo se desarrolle vigorosamente, tolere al alcohol y sea capaz de producirlo en grandes cantidades. Se ha puesto mucha atención en seleccionar y desarrollar cepas de levaduras que reúnan esas característica.

c) La reacción.

El cambio bioquímico que efectúan las levaduras.



Carbohidrato fermentable.	Alcohol Etilico	Dióxido de Carbono
------------------------------	--------------------	-----------------------

Del segundo paso de la fermentación por levaduras resulta alcohol etílico que es un producto muy usado por la industria (Cerveza, vinos, whisky, ron y ginebra).

En el cuadro 1 se resumen las funciones que desempeñan las levaduras en algunos de estos procesos donde se utilizan.

Cuadro 1

PRODUCTO	MICROORGANISMO	FUNCION DE LOS M.O.
Cerveza.	<i>S. cerevisiae</i> o <i>S. carlbergensis</i>	Transforma azúcar en alcohol y dióxido de carbono; produce cambios en las proteínas y otros constituyentes menores que modifican el sabor.
Ron.	<i>S. cerevisiae</i> u otras levaduras.	Transforma azúcar en alcohol, el cual después por destilación.
Whisky escocés	<i>S. cerevisiae</i> .	Produce alcohol y sustancias congénereas (ácidos, ésteres, varios alcoholes) que con la malta carbonosa dan el sabor al whisky escocés.
Bourbon	<i>S. cerevisiae</i> .	Lo mismo que para el whisky escocés, pero el sabor es característico del bourbon.
Vino.	<i>S. ellipsoideus</i> , varias cepas	Transforma el azúcar en alcohol y también produce - produce cambios en los componentes menores que modifican el sabor y el bouquet.

FUENTE: De W.S. Spector (ed.) Handbook of Biological Data, Saunder, Filadelfia, 1956.

HONGOS. Los hongos son utilizados en la fabricación de productos alimentarios tales como:¹³

Penicillium para la maduración de quesos fermentados (*Geotridum candidum*), en la fabricación de quesos (intervienen en las primeras etapas de maduración del coágulo y se utilizan como agentes de aromatización) y para la fabricación del choucroute.

Los mohos pueden ser utilizados como agentes de fermentación. Mientras en Occidente la fabricación de bebidas alcoholizadas se hace con levaduras, en el Lejano Oriente emplean mohos. El sake japonés es fabricado a partir de arroz. La hidrólisis de almidón precedente a la fermentación se realiza por amilasa de los mohos de la especie *Aspergillus orizae* del cual las esporas se siembran en el arroz cocido al vapor.

Las industrias químicas y farmacéuticas fabrican sustancias complejas , muy importante, por biosíntesis.

- vitaminas (vit. B12).
- Enzimas (proteasa, pectinasas, amilasas de *Aspergillus*)
- Ácidos orgánicos (ácido cítrico por *Aspergillus niger*)
- Antibióticos.

En el cuadro 2 se mencionan algunos productos industriales (diferentes a los antibióticos) derivados de los hongos.

Cuadro 2

PRODUCTO	MICROORGANISMO	USOS
Acido cítrico. <i>Aspergillus niger</i>		Producto alimenticios, ci - tratos medicinales.
Acido Fumárico. <i>Rhizopus nigricans</i> .		Manufactura de resinas alki- dicales, agentes humectantes
Acido glucónico. <i>A. niger</i> .		Productos farmacéuticos, tex- tiles, curtido de cuero, fo- tografía.
Acido itacónico. <i>A. terreus</i> .		Manufactura de resinas alki- dicales, agentes humetantes.
Pectinasas. <i>A. wentii</i> o <i>A. aures</i> .		Agentes clarificantes en la industria de jugos de frutas
Acido giberélico <i>Fusarium moniliformes</i>		Guarnición de frutas, produ- cción de semillas.
Acido láctico. <i>R. oryzae</i>		Alimentos y productos farma- céuticos.

FUENTE: De W.S. Spector (ed.) Handbook of Biological Data, Saunder, Filadelfia, 1956.

BACTERIAS. En la industria se emplean varias tipos de bacterias como ejemplo tenemos:¹³

a) Las bacterias acéticas, las cuales se utilizan para la oxidación del alcohol etílico a ácido acético en la elaboración del vinagre. También se utilizan en la elaboración del vino y la sidra, también oxidan el Sorbitol (polialcohol) a sorbosa durante la síntesis de la vitamina C.

b) Bacterias lácticas. Se encuentran en los vegetales(uvas, cereales) y son algunos de los contaminantes en la fabricación del vino y de la cerveza.

Estas bacterias participan en la preparación de productos lácteos fermentados y así también en las dos etapas de la fabricación del queso (en la formación del coágulo y en su maduración).

c) Bacterias butíricas. Se utilizan en la fermentación de azúcares para producir acetona y butano básicamente. Otros de los productos y procesos en los que se emplean las bacterias se muestran en el cuadro 3 .

Cuadro 3

PRODUCTO	MICROORGANISMO	USOS
Butano acetona	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Solventes, manufactura química y otros.
2,3 Butano	<i>Bacillus polymixa</i> , <i>Ent. aerogenes</i> .	Solventes, humectantes, intermediarios químicos.
Dihidroxiacetona	<i>Gluconobacter suboxydans</i>	Químico fino.
Acido 2-cetoglucónico	<i>Pseudomonas sp.</i>	Intermediario para ácido D-araboascórbico.
Acido 5-cetoglucónico	<i>G. suboxydans</i> .	Intermediaria para el ácido tartárico.
Acido láctico	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Productos alimenticios, textiles y manufactura química, lavandería, curtido de pieles.
Aмилаsa bacteriana	<i>Bacillus subtilis</i>	Modificador de almidones, en colado de papel y descolado de textiles.
Proteasa bacteriana	<i>Bacillus subtilis</i>	Laminados de pieles, descolado de fibras, quita manchas, ablandadores de carnes.
Dextrán	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Estabilizador de productos alimenticios, sustituto del plasma san-

FUENTE: De W.S. Spector (ed.) Handbook of Biological Data, Saunder, Filadelfia, 1956.

COENZIMAS 23

Muchas reacciones enzimáticas requieren la acción concomitante de coenzimas. Estos son transportadores de electrones, de átomos de hidrógeno o de grupos químicos, que se distinguen de los grupos prostéticos en que no están permanentemente unidos a la proteína del enzima, sino que se combinan con ella sólo transitoriamente durante la reacción enzimática. Muchas reacciones de oxidorreducción comprenden las coenzimas NAD (dinucleótido de nicotinamida adenina) o NADP (NAD-fosfato). Estas coenzimas quedan oxidados o reducidos alternativamente, donando o aceptando dos electrones y dos átomos de hidrógeno. Cuando el NAD y el NADP son reducidos, uno de los átomos de hidrógeno se combina con la coenzima. El otro átomo de hidrógeno queda en solución como un ion hidrógeno, H^+ , pero tomará parte en todas las oxidaciones siguientes. Así, la forma reducida de NAD se escribe $NAD + H^+$, aunque a menudo en los esquemas la forma reducida se escribe simplemente $NADH_2$.

Otro coenzima que tiene un importante papel en el metabolismo energético es el trifosfato de adenosina (ATP). El ATP funciona como un transportador de fosfato y también de energía debido al hecho de que los dos grupos fosfatos terminales están unidos al resto de la molécula por los llamados enlaces fosfatos ricos en energía. Durante muchas reacciones de oxidorreducción de la célula se sintetiza ATP a partir del difosfato de adenosina (ADP), y la energía procedente de la oxidorreducción es conservada en los enlaces ricos en energía. La energía del ATP puede utilizarse para las funciones celulares que la requieren, tales como biosíntesis y

crecimiento. En el cuadro 4 se presentan una síntesis de las funciones y fuentes de algunas coenzimas.

Cuadro 4

**F U N C I O N E S M E T A B O L I C A S Y
F U E N T E S D E C O E N Z I M A S .**

COENZIMA	FUNCION	FUENTE
NAD	Transporte de hidrógeno y electrones.	Acido nicotínico
NADP	Transporte de hidrógeno y electrones.	Acido nicotínico
FLAVIN MONONUCLEOTIDO	Transporte de hidrógeno y electrones.	Riboflavina
FAD	Transporte de hidrógeno y electrones.	Riboflavina
PIRROQUINOLINA	Transporte de hidrógeno y electrones.	-
QUINONA	Transporte de hidrógeno y electrones.	-
COENZIMA Q	Transporte de hidrógeno y electrones.	-
MENAQUINONA-6	Transporte de hidrógeno y electrones.	-
ACIDO LIPOICO	Transferencia de hidrógeno y acyl.	-
CITOCROMOS	Transporte de electrones.	-
FERREDOXINAS	Transporte de electrones y activación de hidrógeno.	-
TIOREDOXINAS	Transporte de hidrógeno.	-
S-ADENOSIL METIONINA	Transmetilación.	Vitamina B12
METILCOBALAMINA	Transmetilación.	
COENZIMA M	Transferencia de Metil.	

Ref: no. 5

Continua Cuadro 4

COENZIMA	FUNCION	FUENTE
ACIDO TETRAHIDROFOLICO Y CONJUGADOS	Transferencia de formil, hidroxil-metil y grupo metil.	Acido fólico
COENZIMA A	Transacilación, etc.	Acido Pantoténico.
4-FOSFOPANTOTENICO	Transferencia de acil y grupos ácido amino, etc.	Acido Pantoténico.
COENZIMAS DIFOSFATO NUCLEOSIDO	Transferencia de azúcares y fosforilcolina.	
PIRIDOXAL 5-FOSFATO	Transaminación. descarboxilación, etc.	Vitamina B6
BIOTIN (CO2-BIOTIN ENZIMAS)	Carboxilación, transcarboxilación, etc.	Biotina
TIAMINA PIROFOSFATO	Transferencia de CO2	Tiamina
ADENOSIN 3-FOSFATO-5-FOSFOSULFATO	Transferencia de sulfato.	
ATP	Fosforilación, pirofosforilación y transferencia del grupo adenosil.	
5-DEOXIADENOSILCOBALAMINA.	Carboxil	Vitamina B12
UDP-AZUCARES, ETC.	Isomerización de azúcares.	

Ref: no. 5

GENERALIDADES DEL NAD

CARACTERISTICAS FISICAS, QUIMICAS, USOS, OBTENCION Y ESPECTRO.

El Nicotín Adenín Dinucleótido (NAD) antes conocido como PDN o difosfopiridina, es una coenzima importante en muchos sistemas oxidantes y reductores. Es un compuesto constituido de adenina ligado a un residuo de D-ribosa que lleva dos radicales fosfatos ligados a la nicotinamida mediante otro residuo de D-ribosa ¹⁷. Su formula condensada es C₁₂ H₂₇ N₇ O₁₄ P₂ y su peso molecular es igual a 663.4 gramos ²².

En los organismos vivos el NAD sirve como coenzima en reacciones de oxido-reducción, las cuales se representan a continuación:

Substrato⁻ 1 + NAD⁺ ---- Substrato oxidado 1 + NADH + H⁺..... (1)

Esta ecuación representa la transferencia de dos electrones con un núcleo de hidrógeno y la coenzima reducida, además como se puede observar la coenzima esta sirviendo como un aceptor de electrones, pero como en el tejido hay otras enzimas y aceptores de electrones la coenzima reducida pasa a otra enzima y transfiere los electrones a otro substrato el cual se reduce. Lo anterior esta representado por la ecuación número 2 .

Substrato oxidado 2 + NADH⁺⁺⁺ --- Substrato reducido + NAD⁺... (2)

En este caso, la coenzima esta sirviendo como un donador de electrones la cual nuevamente puede ser reducida. Así el NAD es usado cíclicamente.

En el caso del proceso de fermentación el último aceptor de electrones puede ser una molécula orgánica, la cual es sólo reducida, es decir no es metabolizada ni tampoco se acumula como producto de la fermentación ¹⁸.

Industrialmente el NAD es producido por la extracción de células de *Saccharomyces cerevisiae* cultivadas en medio suplementado con nicotinamida y adenina, o por fermentación directa (síntesis a partir de nicotinamida o ácido nicotínico), utilizando *Brevibacterium ammoniagenes* ⁶.

Entre los productos comerciales de NAD que actualmente se venden los más comunes son: ²

- a) Beta- Nicotín Adenín Dinucleótido.
- b) Beta- Nicotín Adenín Dinucleótido de Sodio.
- c) Beta- Nicotín Adenín Dinucleótido de Litio.
- d) Alfa- Nicotín Adenín Dinucleótido.

Principales características del beta y alfa NAD :

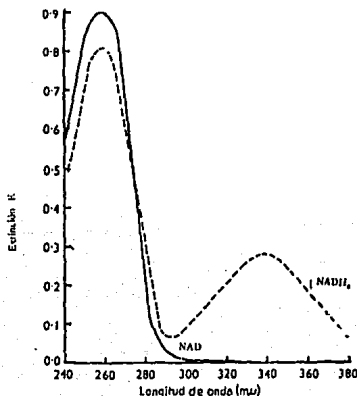
- a) En algunos casos se utiliza para la fermentación alcohólica de la glucosa utilizando levadura de fresca de panadería.
- b) Es un polvo de color blanco, muy higroscópico.
- c) Las soluciones acuosas preparadas con las coenzimas, son estables a pH cercados a 7, además con calentamiento y pH ácidos se da su descomposición.
- d) Precipitan como sales de Plata, Cobre, Litio etc.
- e) Es estable al calor (120 ° C durante 30 minutos).

Estos productos se aplican básicamente en pruebas de diagnóstico de laboratorio para la identificación de los diferentes tipos de *Haemophilus* ¹.

Su espectro de absorción se mide utilizando un espectrofotómetro de luz ultravioleta. Este se muestra en figura 1 conjuntamente con el de la forma reducida (NADH₂). Aquí puede observarse que ambas formas (NAD Y NADH₂) presentan un máximo de absorción alrededor de 260 nm , característico de su estructura nucleótida, pero el espectro de la forma reducida presenta una banda de absorción más pequeña alrededor de 340 nm que no tiene la forma oxidada. Esta diferencia de comportamiento es la base de un método para el estudio de las reacciones de óxido-reducción en las que interviene el NAD ⁴.

fig. 1

Espectro de absorción del NAD oxidado y reducido



MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE NAD

El cuadro 5 se muestran algunos microorganismo productores de NAD.

Cuadro 5

MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE NAD

MICROORGANISMOS	CANTIDAD OBTENIDA
<i>Clostridium weichii</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella aerogenes</i> , <i>Staphylococcus albus</i> , y <i>Pseudomona aeruginosa</i> .	4-14 umol/g célula 25
Mutante de <i>E. coli</i>	60 um 27
Bacteria láctica	3-8 mg/g célula 21
<i>Arpergillus oryzae</i>	1-2 umol/g célula 8
<i>Brevibacterium ammoniagenes</i>	2.3 mg/ml 12

Ref: No. 5

PRODUCCION DE NAD POR *Brevibacterium ammoniagenes*¹²

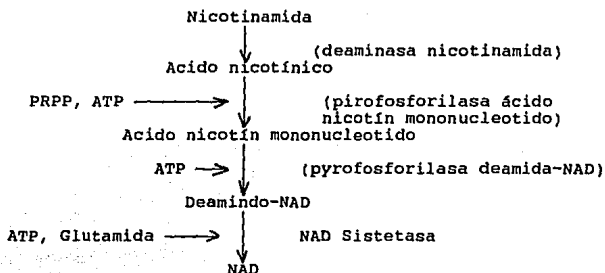
Nakayama et al (1968), reportaron un proceso enzimático muy provechoso para realizar la biosíntesis de NAD.

Ellos establecieron que una gran cantidad de NAD se acumulaba en el medio cuando la *Brevibacterium ammoniagenes* fue incubada en un medio que contenía adenina y nicotinamida o ácido nicotínico. Una vez que los precursores fueron adicionados al medio y después de 120 horas de incubación, la cantidad de NAD en el medio alcanzó 2.3 mg/ml.

El mecanismo involucrado en la producción de NAD (ver figura 2) ha sugerido que la adenina y la nicotinamida son primeramente ribotizadas hasta producir ATP y nicotinamida mononucleótido, los cuales son entonces condensadas por la pyrofosforilación a la forma NAD .

Fig. 2

Biosíntesis de NAD a partir de ácido nicotínico o nicotinamida en *Brevibacterium ammoniagenes*.



PRODUCCION DE NAD POR LEVADURAS

Sakai et al. ²⁵ reportaron un método para aumentar la cantidad de NAD en levadura de panadería por incubación de la levadura con precursores (nicotinamida, ácido nicotínico y adenina). Las condiciones óptimas incluyeron un segundo crecimiento durante 72 hr con aeración en un medio que contenía 0.3 % de adenina y 0.6 % de nicotinamida en 0.2 M de K₂HPO₄ (se agregó 50 % de células de levadura fresca) a un pH de 4.5. La cantidad de NAD en las

células de la levadura aumentó cerca de 12 mg/g de célula seca (correspondiente a 2.0 mg/ml, cerca de 20 veces el contenido inicial.

Sakai et al ²⁴ observaron que para una eficiente acumulación de NAD en levaduras, en particular la *Saccharomyces carlsbergensis*, la cual acumuló relativamente una gran cantidad de NAD en las células, pero no en el medio.

Ellos buscaron las condiciones óptimas para la acumulación de NAD usando la *Saccharomyces carlsbergensis* y establecieron que la adición de pantotenato, inositol iones zinc y ácidos grasos (estático, mirístico, palmítico y oleico) fue buena.

Establecieron también que el NAD acumulado fue casi completamente liberado en el medio con la adición de un surfactante anionico. Un nuevo método para la producción de NAD fue desarrollado, consistiendo en la acumulación de NAD en las células de la levadura para posteriormente ser liberado en el medio. La *Saccharomyces carlsbergensis* fue sembrada en un medio que contenía 5 g de glucosa, 1.5 de caseína hidrolizada, 0.5 K₂HPO₄. 0.5 MgSO₄ 7H₂O, 0.12 mg ZnSO₄ 7H₂O. 1 mg Ca-Pantotenato, 0.5 mg de tiamina-HCl y 10 mg de inositol en 100 ml de agua deionizada, con un pH de 5 durante 24 horas. La Adenina y la nicotinamida fueron entonces agregadas con una concentración final de 0.3 % y el crecimiento fue continuado. Después de 28 horas fue adicionado sulfato cerril de sodio (SCS) y un surfactante hasta

una concentración final de 0.2 %. El NAD se incrementó linealmente después de la adición de adenina y nicotinamida.

El NAD acumulado fue liberado con la adición del SCS, el cual no inhibió el crecimiento de las células. Finalmente, NAD acumulado fue completamente liberado en el medio y después de 72 horas de crecimiento, cerca de 75 mg/100 ml de NAD fue acumulado.

La ruta biosintética de NAD propuesta a partir de ácido nicotínico y nicotinamida para la *Brevibacterium ammoniagenes* es la misma que se propuso para las levaduras que aquí se mencionan.

PRODUCCION DE NAD POR *Aspergillus fungi* ⁹

El *Aspergillus fungi* ha sido utilizado en la industria de alimentos para la producción de enzimas, alcoholes, alimentos fermentado, ácidos orgánicos y otros.

Este hongo se caracteriza por la producción de enzimas extracelulares tales como amilasas y proteasas.

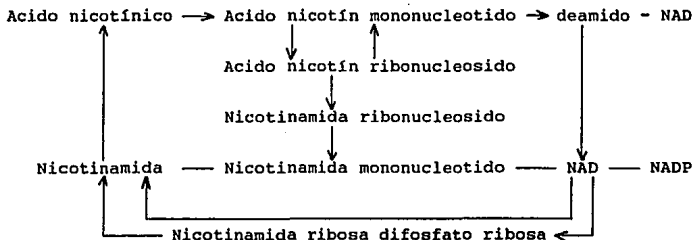
La excreción de estas enzimas es favorable para el *Aspergillus fungi* cuando se utilizan sustratos con componentes de alto peso molecular.

En 1982 Masaaki Kuwahara et. al , realizaron un experimento en el que hicieron crecer por separado, a diferentes tipos de *Aspergillus* en un medio de glucosa-peptona que contenía:

5 % (w/v) de glucosa, 0.5 % peptona, 0.3 % extracto de levadura, 0.2 % de KH_2PO_4 , 0.2 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 0.05 % de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, el pH del medio fue ajustado a 6 con HCl. Los hongos fueron crecidos en 6 ml de medio en un tubos de ensayo con agitación y una temperatura de 28°C .

A partir del experimento ellos reportaron un contenido de coenzimas piridinas del orden de 1.14 a 2.15 u mol por gramo de célula seca, excepto para el *Aspergillus oryzae*, el cual contenía una menor cantidad de coenzima oxidada. Este mismo experimento mostró que el *A. oryzae*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. wamori* y *A. usami* sintetizan el NAD a partir de ácido nicotínico (ver figura 3).

Fig. 3
Biosíntesis de NAD a partir de ácido nicotínico
en *Aspergillus fungi*.



PRODUCCION DE NAD POR *Bacillus* sp. 10

En 1979 investigadores de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC), aislaron un microorganismo que producía Nicotín Adenín Dinucleótido (NAD) cuando se hacía crecer bajo las siguientes condiciones:

1) Medio que contenía 2.5 g/l de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, 4.0 g/l de K_2HPO_4 , 0.1 g/l de MgSO_4 , 0.01 g/l de FeSO_4 , 0.001 g/l de CuSO_4 , 0.001 g/l de MnSO_4 y dextrosa al 1%, con pH de 7 o medio con 10 g/l de peptona de caseína, 5 g/l de extrato de levadura y 5 g/l de sal, con un pH entre 7.2 - 7.4. Estos medios se conocen como medio mínimo y medio Luria-Bertrani.

2) Incubación del medio a una temperatura de 37 °C y agitación de 200 rpm.

Además a partir de pruebas bioquímicas y cinéticas de crecimiento donde midieron la cantidad de NAD producido, determinaron que el microorganismo productor pertenece al género *Bacillus* y que el NAD es un metabolito de tipo primario, debido a la similitud detectada entre la curva de crecimiento y la de producción.

Por último en pruebas de satelitismo de *Haemophilus pleuropneumoniae* donde utilizaron el sobrenadante del medio, obtuvieron resultados similares que los obtenidos con *Staphylococcus aureus*.

J U S T I F I C A C I O N

Desde hace muchos años, se ha empleado el término "microorganismos fastidiosos" para denotar una serie de géneros bacterianos con requerimientos particularmente especiales para su crecimiento.

Dentro de estos géneros se tiene al género *Haemophilus* el cual demanda para su crecimiento la presencia de los factores V y/o X . En el caso del factor X, que es hematina o hemina, éste se requiere en cantidades muy limitadas, menos de 1 mg por litro, y frecuentemente se encuentra, éste o alguno de sus precursores, en cantidades suficientes en los medios de cultivos usuales.

En cuanto al NAD a diferencia de la hemina, es termolábil, por lo tanto no se encuentra en los medios de cultivo comerciales, ni siquiera los productos de degradación que pudieran sustituirlo, son resistentes al proceso, y el ácido nicotínico, presente en los extractos de levadura comerciales no es transformable a NAD por los *Haemophilus*. Más aún, los requerimientos de este cofactor son mayores que aquellos de hemina.

Por este motivo, los medios se vuelven caros y complejos en su manejo, como el mismo agar sangre, los medios de infusión cerebro-corazón, o agar chocolate, todos ellos suplementados.

Además de las ya conocidas dificultades de manejar medios como sangre, o muy ricos, se une el requerimiento por NAD. Este producto no se produce en nuestro país y, aunque se ofrecen varios tipos de esta coenzima, sólo aquellas formas de más alta pureza

son utilizables para estos fines, cotizándose a más de N\$ 228.00 el gramo (15)(2).

O B J E T I V O S

OBJETIVO GENERAL.

Optimizar el medio de cultivo de una cepa de *Bacillus* sp. sobreproductora de Nicotín-Adenin-Dinucleótido (NAD).

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Determinar la concentración óptima de la fuente de Carbono empleada en el medio de cultivo, para obtener la mayor concentración celular y la mayor cantidad de NAD producido a nivel matraz.

- Determinar la concentración óptima de la fuente de Nitrógeno empleada en el medio de cultivo, para obtener la mayor concentración celular y la mayor cantidad de NAD producido a nivel matraz.

- Encontrar la mejor forma de adición de la fuente de Carbono y Nitrógeno (pulsos) para incrementar la masa celular y el metabolito NAD.

- Probar las concentraciones y forma de adición más adecuadas determinadas a nivel matraz, en un fermentador de 14 litros con aereación, temperatura, pH, y agitación controlada.

METODOLOGIA

M E T O D O L O G I A

Los primeros pasos del trabajo experimental fue la obtención del inoculo y el crecimiento del microorganismo en medio mínimo (ver anexo A). Dicho crecimiento sirvió como control para la producción de NAD.

Posteriormente se determinó en que concentración de fuente de carbono y nitrógeno se obtenía el máximo crecimiento del microorganismo (mayor densidad óptica). Una vez determinadas se utilizaron en los siguientes experimentos.

Después se procedió a determinar que era más favorable para aumentar el crecimiento del microorganismo (poco después de que éste alcanzara la fase estacionaria en el medio) la adición solo de pulsos de fuente de carbono ó adición de pulsos de carbono y nitrógeno.

Posteriormente se realizó una comparación entre los resultados obtenidos (velocidad de crecimiento, tiempo de duplicación y máxima producción del metabolito) en el crecimiento control y las variaciones de las fuentes.

Por último se realizó un experimento en un fermentador de 14 litros utilizandose las concentraciones determinadas como óptimas, tanto para la fuente de carbono, como para la de nitrógeno, además de la adición de pulsos de ambas fuentes.

En este experimento se midió la producción de NAD y el crecimiento del microorganismo.

El análisis estadístico realizado fue el análisis de varianza por bloques (14)(20) , donde la variable de respuesta fue la velocidad de crecimiento, misma que fue determinada mediante la herramienta estadística de regresión lineal.

En el análisis estadístico se utilizó una $P = 0.5$ y además la prueba de Tukey para determinar que promedios de velocidad de crecimiento eran diferentes.

Cabe señalar que durante la determinación de las concentraciones óptimas de crecimiento y mejor forma de adición de la fuente de carbono y nitrógeno, no se determinó la concentración de NAD, debido a que se consideró la observación de que "La curva de crecimiento del microorganismo es similar a la curva de producción" ¹⁰, por lo tanto a mayor crecimiento mayor producción de NAD.

EXPERIMENTOS EN MATRAZ.

CRECIMIENTO DEL *Bacillus sp* EN MEDIO LURIA-BERTRANI (cultivo semilla).

El crecimiento se realizó en matraces de 500 ml de volumen, que contenían 100 ml del medio Luria-Bertrani, estéril.

Para iniciar el crecimiento, se inocularon cada uno de los matraces con una suspensión de células que previamente fueron sembradas e incubadas en tubos con agar inclinado, posteriormente se incubaron a una temperatura de 37 °C en un agitador orbital a 200 rpm. Después se hizo el seguimiento del crecimiento, tomando muestras del caldo de cultivo cada hora y determinando su densidad óptica a 590 nm, en un espectrofotómetro de luz visible. Esto se realizó hasta obtener una densidad óptica constante por varias horas.

Con los datos obtenidos se determinó el tiempo requerido por el microorganismo para alcanzar la máxima densidad celular en este medio. Asimismo se determinó su velocidad específica de crecimiento y el tiempo de duplicación. además se elaboró la curva de crecimiento del microorganismo en este medio.

CRECIMIENTO DEL *Bacillus sp* EN MEDIO MINIMO (crecimiento de control).

Este crecimiento se realizó por duplicado y en matraces de un litro que contenían 200 ml de medio mínimo original (ver anexo A) con 1% de dextrosa estéril.

Posteriormente se adicionó 20 ml del cultivo semilla como inóculo en cada matraz, se incubaron los matraces a una temperatura de 37 C y 200 rpm en un agitador orbital.

El crecimiento para cada matraz se siguió tomando muestras cada hora y determinando su densidad óptica a 590 nm. Esto se realizó hasta obtener una densidad óptica constante.

Con los datos obtenidos se procedió a la elaborar la curva de crecimiento del microorganismo. Asimismo a determinar la velocidad específica y el tiempo de duplicación.

CRECIMIENTO DEL *Bacillus sp* EN MEDIO MINIMO VARIANDO LA CONCENTRACION DE LA FUENTE DE CARBONO.

Se siguió el mismo procedimiento que para la crecimiento de control, pero en este ocasión se varió la concentración de dextrosa y se mantuvieron los demás nutrientes constantes en la fórmula original.

Las concentraciones utilizadas fueron 0.5, 1.5, 2.0, 2.5, y 3.0 %.

CRECIMIENTO DEL *Bacillus sp* EN MEDIO MINIMO VARIANDO LA CONCENTRACION DE LA FUENTE DE NITROGENO.

De igual manera se procedió como en el crecimiento de control. En este caso se varió la concentración de Sulfato de amonio en 1.25, 2.5, 3.5, 5.0, 6.5 y 7.5 g/ml. La concentración de dextrosa se mantuvo constante considerando la mejor concentración obtenida en el experimento anterior.

CRECIMIENTO DEL *Bacillus sp* EN MEDIO MINIMO ADICIONANDO PULSOS DE DEXTROSA.

El crecimiento se llevó a cabo de la misma manera que el crecimiento control, solo que en este se adicionaron pulsos de dextrosa, una vez que el microorganismo alcanzó la fase estacionaria y posteriormente cuando alcanzaba nuevamente la misma fase.

La concentración de dextrosa utilizada tanto en el medio de crecimiento como en la adición de los pulsos fue la obtenida como óptima en el primero experimento.

En cuanto a la concentración de sulfato de amonio, esta correspondió a la determinada como óptima en el segundo experimento.

CRECIMIENTO DEL *Bacillus sp* EN MEDIO MINIMO ADICIONANDO PULSOS DE DEXTROSA Y SULFATO DE AMONIO SIMULTANEAMENTE

Este crecimiento se llevó a cabo de la misma forma que el anterior, solo que este se adicionaron pulsos de dextrosa y sulfato de forma simultánea.

La concentración de la dextrosa en los pulsos adicionados fue la misma que se utilizó en el experimento anterior, y la del sulfato de amonio la determinada como óptima en el segundo experimento.

CRECIMIENTO DEL *Bacillus sp* EN EL FERMENTADOR.

Esta cinética se realizó en un fermentador New Brunswick de 14 litros de capacidad, a una temperatura de 37 C, pH de 7, agitación de 400 rpm y aereación de 5 vvm.

El volumen inicial fue de 8 litros con un 10% de inóculo.

Durante la cinética se adicionaron 3 pulsos de dextrosa al 0.5% y 1.25 g/l de sulfato de amonio. Se tomaron muestras del caldo de cultivo cada hora hasta llegar a la fase estacionaria.

Con las muestras tomadas se hicieron determinaciones de fuente de carbono consumida y producción de NAD. Para determinar la fuente de carbono se utilizó la técnica de fenol sulfúrico de Dubois (anexo B), y para la cuantificación de NAD producido, se determinó por espectrofotometría a 260 nm de longitud de onda (anexo C).

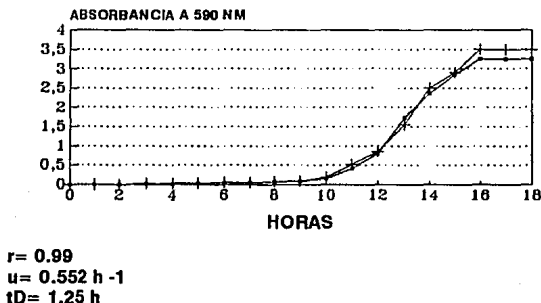
RESULTADOS Y DISCUSION

RESULTADOS

CRECIMIENTO EN MEDIO LURIA- BERTRANI.

El crecimiento en medio Luria-Bertrani se presenta en la figura 4. Como puede observarse se logra tener una alta concentración celular en 18 horas. La velocidad específica de crecimiento (U) del *Bacillus sp* en este medio es de 0.552 h^{-1} y un tiempo de duplicación de 1.25 h. Se utilizó este medio para obtener biomasa que sirvió como inóculo para la obtención de NAD en medio mínimo.

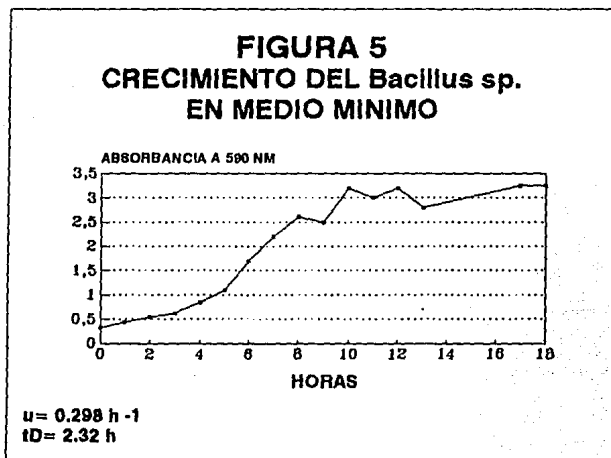
FIGURA 4
CRECIMIENTO DEL *Bacillus sp.*
EN MEDIO LURIA



CRECIMIENTO EN MEDIO MINIMO (CRECIMIENTO CONTROL).

La figura 5 presenta la curva de crecimiento del microorganismo en medio mínimo para la producción de NAD. Es evidente que en este medio de cultivo el microorganismo pierde velocidad de crecimiento teniendo una (μ) de 0.298 h^{-1} y un aumento en el tiempo de duplicación de 2.32 h. En este medio de cultivo se obtuvo una densidad óptica máxima de 3.25.

Este crecimiento sirvió como control para mejorar la producción de NAD.



VARIACION DE LA CONCENTRACION DE LA FUENTE DE CARBONO.

Como punto de partida se varió la concentración de dextrosa en el medio mínimo, originalmente el medio contenía una concentración de dextrosa de 0.5 % y se varió a 1.5 %, 2.0 %, 2.5 % y 3 %. Como se observa en las figuras 6, 7, 8, 9 y 10.

FIGURA 6
CRECIMIENTO DEL *Bacillus* sp.
VARIANDO LA CONCENTRACION DE LA FUENTE DE CARBONO

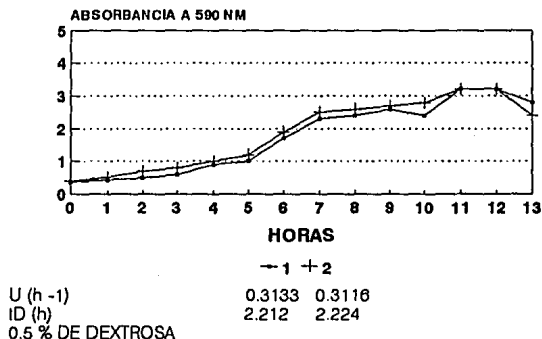


FIGURA 7
CRECIMIENTO DEL *Bacillus* sp.
VARIANDO LA CONCENTRACION DE LA FUENTE DE CARBONO

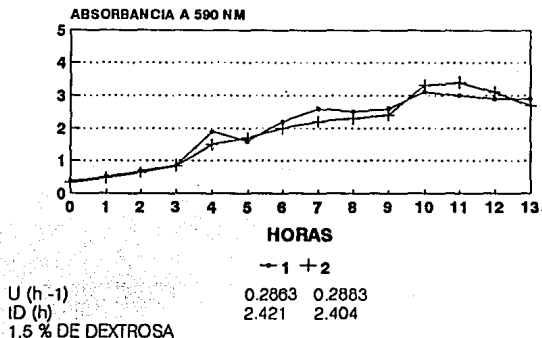


FIGURA 8
CRECIMIENTO DEL *Bacillus* sp.
VARIANDO LA CONCENTRACION DE LA FUENTE DE CARBONO

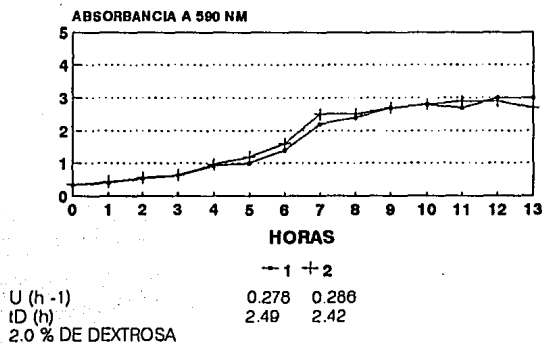


FIGURA 9
CRECIMIENTO DEL *Bacillus* sp.
VARIANDO LA CONCENTRACION DE LA FUENTE DE CARBONO

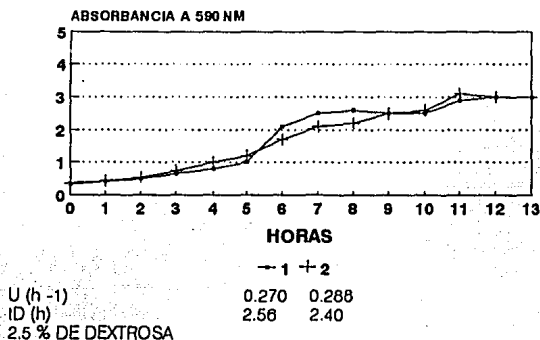
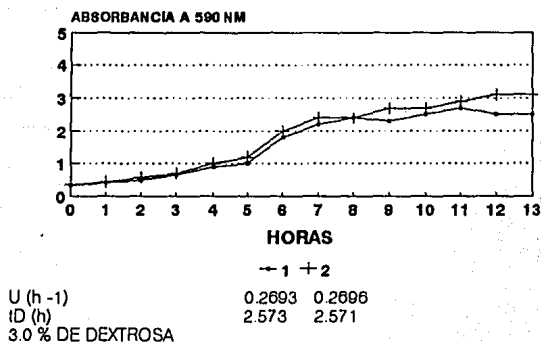


FIGURA 10
CRECIMIENTO DEL *Bacillus* sp.
VARIANDO LA CONCENTRACION DE LA FUENTE DE CARBONO



Los promedios de la velocidad de crecimiento, tiempo de duplicación y máxima densidad ópticas obtenidas se muestran en el cuadro 6.

Cuadro 6

Conc. de dextrosa (%)	0.5	1.5	2.0	2.5	3.0
Letras	A	B	B	B	B
Vel. de crecimiento (h ⁻¹)	0.312	0.287	0.282	0.279	0.269
Tiempo de duplicación (hrs)	2.22	2.41	2.45	2.48	2.57
Máxima densidad óptica	3.2	3.25	2.95	3.05	2.9
Letras diferentes = diferencia significativa					

Como se observa, con la concentración de 0.5 % de dextrosa como fuente de carbono, se obtiene la mayor velocidad de crecimiento, sin embargo el valor de la máxima densidad óptica se obtiene con una concentración de 1.5 %.

La concentración de 0.5 % se utilizó en los demás experimentos por que representa un menor costo, además se obtiene una cantidad de células similar a la que se obtiene con 1.5 %, pero esta en un menor tiempo.

VARIACION DE LA CONCENTRACION DE LA FUENTE DE NITROGENO.

El siguiente experimento fue variar la concentración de nitrógeno en forma de sulfato de amonio. La concentración original fue de 1.25 g/l y las variaciones fueron 3.5 g/l, 5 g/l, 6.5 g/l y 7.5 g/l. Para todos los casos se mantuvo constante la concentración de dextrosa en 0.5 % .

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 11, 12, 13, 14, y 15.

FIGURA 11
CRECIMIENTO DEL *Bacillus* sp.
VARIANDO LA CONCENTRACION DE LA FUENTE DE NITROGENO

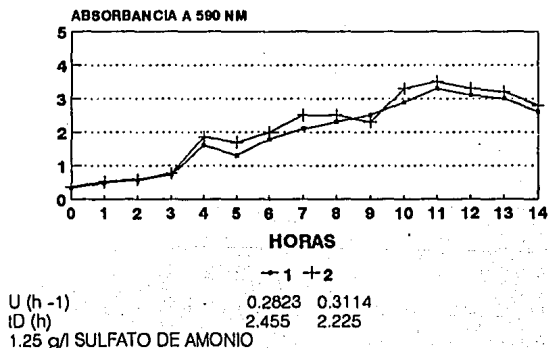


FIGURA 12
CRECIMIENTO DEL *Bacillus* sp.
VARIANDO LA CONCENTRACION DE LA FUENTE DE NITROGENO

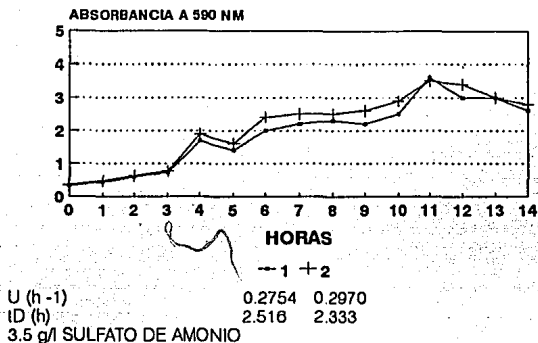


FIGURA 13
CRECIMIENTO DEL *Bacillus* sp.
VARIANDO LA CONCENTRACION DE LA FUENTE DE NITROGENO

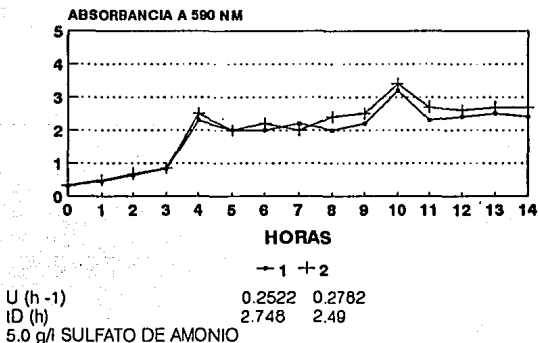


FIGURA 14
CRECIMIENTO DEL *Bacillus* sp.
VARIANDO LA CONCENTRACION DE LA FUENTE DE NITROGENO

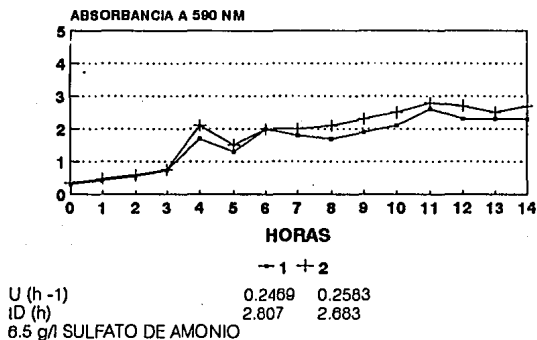
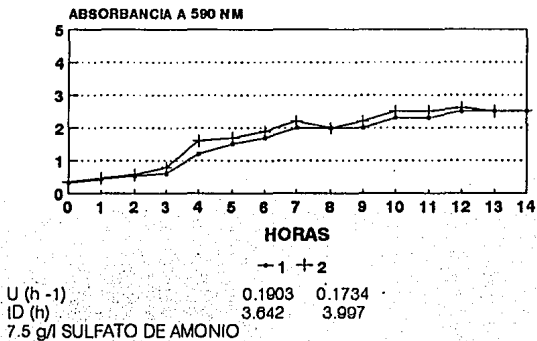


FIGURA 15
CRECIMIENTO DEL *Bacillus* sp.
VARIANDO LA CONCENTRACION DE LA FUENTE DE NITROGENO



Los promedios de la velocidad de crecimiento, tiempo de duplicación y máxima densidad óptica obtenidas se muestran en el cuadro 7.

Cuadro 7.

Conc. de sulfato de amonio (g/l)	1.25	3.5	5.0	6.5	7.5
Letras	A	A	A	A	A
Vel. de crecimiento (h^{-1})	0.296	0.287	0.265	0.252	0.181
Tiempo de duplicación (hrs)	2.34	2.41	2.61	2.78	3.82
Máxima densidad óptica	3.4	3.55	3.30	2.70	2.55
Letras diferentes = diferencia significativa					

La mayor velocidad de crecimiento alcanzada fue con una concentración de 1.25 g/l, sin embargo la máxima densidad óptica se obtuvo con una concentración de 3.5 g/l.

La concentración de 1.25 g/l se utilizó en los demás experimentos por que representa un menor costo, además se obtiene una cantidad de celulas similar a la que se obtiene con 3.5 g/l, pero esta en un menor tiempo.

ADICION DE PULSOS DE DEXTROSA.

Los siguientes resultados que se muestran en las figuras 16 y 17, son las curvas de crecimiento del microorganismo en el medio mínimo, al cual se le adicionaron pulsos de dextrosa al 0.5 % una vez que ha alcanzado la fase estacionaria, y un nuevo pulso cuando por segunda ocasión entraba a la fase estacionaria.

Como se puede observar se alcanzó una densidad óptica (D.O.) de 3.85.

FIGURA 16
CRECIMIENTO CON ADICION DE PULSOS
DE DEXTROSA AL 0.5 %

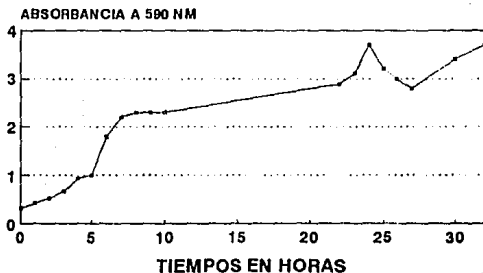
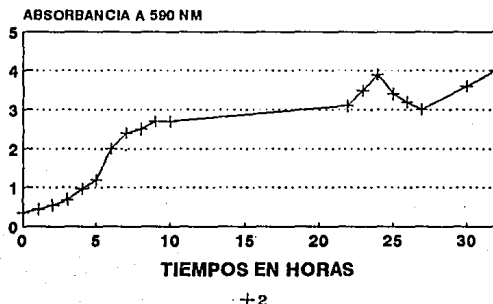


FIGURA 17 **CRECIMIENTO CON ADICION DE PULSOS** **DE DEXTROSA AL 0.5 %**



ADICION DE PULSOS DE DEXTROSA - SULFATO DE AMONIO.

En las figuras 18 y 19 se tienen los resultados obtenidos del crecimiento del *Bacillus sp* en el medio mínimo, con la adición de pulsos de dextrosa al 0.5 % ~ 1.25 g/l de sulfato de amonio. Como se puede observar se alcanzó una densidad óptica de 4.7 en 30 horas.

FIGURA 18
CRECIMIENTO CON ADICION DE
DEXTROSA AL 0.5% Y SULFATO DE AMONIO AL 1.25 g/l

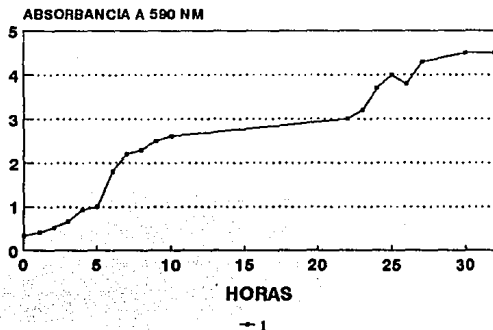
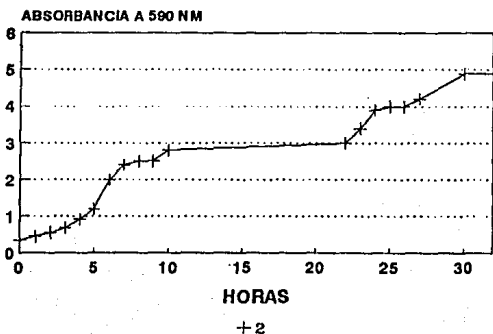


FIGURA 19
CRECIMIENTO CON ADICION DE
DEXTROSA AL 0.5% Y SULFATO DE AMONIO AL 1.25 g/l



COMPARACION DE RESULTADOS OBTENIDOS DE LOS EXPERIMENTOS REALIZADOS.

En el cuadro 8 se muestran los resultados promedio de los experimentos realizados a nivel matraz.

Cuadro 8

Experimentos	Velocidad de crecimiento (h^{-1})	Tiempo de duplicación (hrs)	Densidad óptica máxima
Crecimiento control	0.298	2.32	3.25
Crecimiento variando fuente de carbono	0.312	2.22	3.2
Crecimiento variando fuente de nitrógeno	0.296	2.34	3.4
Adición de pulsos de fuente de carbono	0.0853	8.12	3.85
Adición de pulsos de ambas fuentes.	0.1209	5.73	4.7

Como se puede observar la máxima densidad óptica se obtiene con la adición de pulsos de ambas fuentes. Las densidades ópticas obtenidas variando la fuente de carbono y nitrógeno son similares a la obtenida en el crecimiento control.

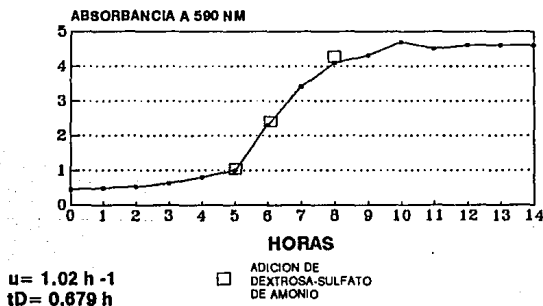
RESULTADOS DE ANALISIS ESTADISTICO.

Los resultados del análisis estadístico se muestran en el anexo D.

CINETICA DE CRECIMIENTO EN FERMENTADOR CON ADICION DE PULSOS

Bajo las condiciones de cultivo antes mencionadas, fue preparado el cultivo que sirvió de inóculo para el fermentador de 14 litros de capacidad, en donde se obtienen los resultados que se observan en la fig. 20

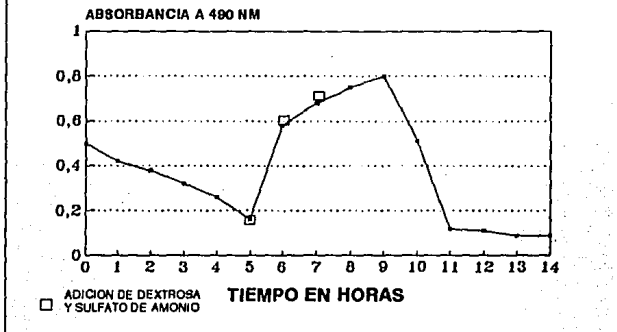
FIGURA 20
CRECIMIENTO DEL *Bacillus* sp.
EN EL FERMENTADOR



A las 10 hrs de crecimiento se obtiene la mayor concentración celular de 4.7 de densidad óptica, habiendose dado hasta esas horas, 3 pulsos combinados de dextrosa 0.5 % y 1.25 g/l de sulfato de amonio. Se tiene una velocidad de crecimiento (U) de 1.02 h^{-1} y un tiempo de duplicación (tD) de 0.679 h. según figura 20 .

Se llevó a cabo el monitoreo de consumo de dextrosa durante la cinética de crecimiento en el fermentador y se observó lo que se muestra en la figura 21.

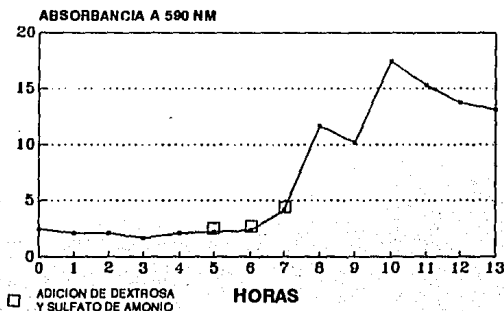
FIGURA 21
CONSUMO DE DEXTROSA EN EL CRECIMIENTO DEL
Bacillus sp. EN EL FERMENTADOR.



Habiendo transcurrido las primeras 5 horas, el consumo de dextrosa había sido del 68 %. En ese momento se dió un pulso combinado de dextrosa y sulfato de amonio. Se dieron otros dos pulsos a las 6 y 8 horas, hasta elevar la concentración un 60 % por encima de la concentración inicial.

La figura 22 resumen los resultados obtenidos en cuando a la producción de NAD. Se nota un incrementó en la producción del metabolito cuando se le adiciona el primer pulso de dextrosa-sulfato de amonio, y sigue incrementandose la producción a medida que hay más carbono y nitrógeno disponible, alcanzandose a las 10 horas una concentración de 809.12 mg/l de NAD.

FIGURA 22
PRODUCCION DE NAD EN EL CRECIMIENTO DEL
Bacillus sp. EN EL FERMENTADOR.



DISCUSION

Crecimiento del *Bacillus sp* en medio mínimo (crecimiento control). De los resultados obtenidos (velocidad de crecimiento de 0.298 h^{-1} , tiempo de duplicación de 2.32 h y máxima densidad óptica de 3.2) se observa que el microorganismo en el medio mínimo presenta una menor velocidad de crecimiento que en el medio Luria-Bertrani.

Esto es debido a que el medio mínimo esta compuesto básicamente de sales minerales y dextrosa como fuente de carbono, lo cual provoca que el microorganismo no tenga disponible todas las moléculas orgánicas necesarias para su crecimiento, teniendo que utilizar diferentes mecanismos enzimáticos para sintetizarlos a partir de los nutrientes disponibles (sales minerales y dextrosa). En cambio el medio Luria-Bertrani es mucho más rico, ya que dichas moléculas orgánicas son proveídas por el extracto de levadura y la peptona de caseína.

Variación de la concentración de la fuente de carbono.

Los resultados que se muestran en el cuadro 6 nos determinan que la velocidad de crecimiento disminuye conforme aumenta la concentración de la fuente de carbono, además los mayores crecimientos se obtienen en concentraciones cercanas a la original (1 %).

Lo anterior tal vez se debe a que la fuente de carbono a concentraciones mayores al 1% modifica el equilibrio osmótico entre el medio de crecimiento que la contiene y las células microbianas aumentando la presión osmótica exterior.

Este aumento en la presión osmótica provoca que las células se encogan (plasmólisis), modificando la velocidad de penetración de los solutos y a su vez la duplicación de las células microbianas.

Variación de la concentración de la fuente de nitrógeno.

El cuadro número 11 nos muestra que estadísticamente no hay diferencia significativa entre las velocidades de crecimiento obtenidas, por lo tanto no importa poner más cantidad de la fuente de nitrógeno en el medio de crecimiento.

Adición de pulsos de dextrosa y dextrosa - sulfato de amonio.

Los resultados en estos experimentos nos indican que el máximo crecimiento del microorganismo (medido en densidad óptica) se obtiene con la adición de fuente de dextrosa y sulfato de amonio, que a su vez se ve reflejado en la producción de NAD; esto es debido a que el microorganismo una vez que alcanza la fase estacionaria, la adición de pulsos de dextrosa y sulfato de amonio promueve la prolongación de la fase logarítmica.

Crecimiento en el fermentador adicionando pulsos de dextrosa-sulfato de amonio.

En este experimento se determinó el consumo de dextrosa, la producción de NAD y el crecimiento del microorganismo (determinación de densidad óptica).

Con respecto al consumo de dextrosa, se puede observar en la figura 21 que durante el crecimiento del microorganismo se dió una

caída de la fuente de carbono debido a que durante este tiempo se presentó la fase logarítmica de crecimiento, por lo tanto la mayor utilización de carbono para la producción de células.

Con respecto a la segunda disminución de la fuente de carbono (9 a las 11 horas) es debido a la producción de células y mayor producción de NAD. Esto se puede observar comparando las figuras 20 y 22, con lo que se corrobora la afirmación de que el crecimiento se relaciona directamente con la producción de NAD (metabolito primario); es decir que a medida que se lleva a cabo la duplicación de las estructuras individuales, organelos y componentes celulares como resultado del metabolismo del microorganismo, también se produce el metabolito.

Análisis estadístico.

En los cuadros 10 y 11 se muestran los resultados obtenidos del análisis de estadístico realizado.

Estos se debe a que el carbono disponible en el medio de cultivo se distribuye principalmente en la formación de células, producción de CO_2 como producto final de la oxidación de las moléculas orgánicas y a la formación del metabolito (NAD).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

La utilización de un medio de cultivo rico como lo es el medio Luria-Bertrani al inicio del experimento, se hizo con la finalidad de obtener una cantidad de biomasa mayor para que éste sirviera de inóculo en el medio de cultivo mínimo, donde el microorganismo expresa la producción del metabolito NAD.

A pesar de que el inóculo representa un 10 % de la cantidad total del medio de cultivo, este presenta una fase de adaptación de aproximadamente de 3 horas, esto se debe principalmente a la transferencia del microorganismo a un medio pobre como lo es el medio mínimo.

Uno de los objetivos que persiguió el trabajo fue optimizar la fuente de carbono en el medio de cultivo mínimo, con el fin de obtener una mayor cantidad de biomasa, y esto se logró observando las variaciones de concentración de dextrosa, determinandose que a una concentración total de 1.5 %, se obtiene el máximo crecimiento del microorganismo, siendo éste de 3.25 de densidad óptica medida a 590 nm, y que la máxima velocidad de crecimiento se da, en concentraciones de dextrosa de 0.5 %, siendo ésta de 0.312 h⁻¹ y un menor tD de 2.22 h en relación a las demás concentraciones empleadas.

Otro de los objetivos fue optimizar la fuente de nitrógeno en el medio mínimo, para lo cual se hicieron variaciones de la concentración de sulfato de amonio y se encontró que a la concentración de 3.5 g/l se obtenía el máximo crecimiento, siendo éste de 3.55 de densidad óptica, y que la máxima velocidad de crecimiento se obtiene empleando una concentración de 1.2 g/l.

Habiendo optimizado las dos fuentes principales del medio de cultivo carbono y nitrógeno y siendo estas elementos constituyentes del metabolito NAD, el objetivo siguiente que se persiguió fue aumentar la cantidad de biomasa producida, para lo cual se realizaron dos experimentos, en los que se dieron pulsos de ambas fuentes (carbono y nitrógeno) y pulsos de la fuente de carbono en forma individual, determinandose que el máximo crecimiento se obtiene con la adición de ambas fuentes (dextrosa al 0.5 % y de sulfato de amonio al 1.25 g/l), llegandose obtener 4.7 de densidad óptica como una medida de la concentración celular.

Para mejorar todo el proceso en general y observar el comportamiento del microorganismo a una escala mayor, con algunas variables controlables como pH, temperatura, agitación y aireación, se realizó la cinética de crecimiento en un fermentador de 14 litros de capacidad, con el medio de cultivo optimizado, una adición de pulsos y bajo las condiciones de crecimiento establecidas para este microorganismo. Aquí se logró aumentar la velocidad de crecimiento del microorganismo de 0.298

h^{-1} original a $1.02 h^{-1}$, lo que representa 3.4 veces la velocidad de crecimiento del *Bacillus sp.* original.

En cuando al comportamiento del microorganismo reflejado en la producción de biomasa se logró un 40 % más de la obtenida originalmente.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO A (MATERIALES Y EQUIPO)

MEDIOS DE CRECIMIENTO

Como todos los seres vivos, los microorganismos para poder crecer y reproducirse, necesitan encontrar en el medio donde se encuentren, los nutrientes y la fuente de energía dispensable para su crecimiento.

Para este caso se utilizaron dos medios de crecimiento, el Luria y medio mínimo. El primero se utilizó como medio semilla y el segundo como medio mínimo. En los cuadros 9 y 10 se presentan los componentes de ambos medios.

Cuadro 9

Medio de crecimiento Luria-Bertrani

Peptona de caseína.....	10 g / L
Extracto de levadura	5 g / L
NaCl	5 g / L
pH	7.2 - 7.4

Cuadro 10

Medio de crecimiento mínimo

Solución A		
(NH ₄) ₂ SO ₄		25 g / L
K ₂ HPO ₄		40 g / L
pH		7.4
Solución B		
MgSO ₄		1 g / L
FeSO ₄		100 mg / L
CuSO ₄		10 mg / L
MnSO ₄		10 mg / L

MICROORGANISMO

La cepa utilizada para el desarrollo de este trabajo fue una cepa de *Bacillus sp* sobreproductora de NAD, la cual fue proporcionada por el laboratorio de biotecnología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Sus principales características son:

- Pertenece a la especie *Bacillus sp*.
- Se puede utilizar como cepa nodriza, en pruebas de satelitismo de *Haemophilus*.
- Crece abundantemente en medios mínimos de crecimientos como el Robinson y el Luria ¹⁰.

MANTENIMIENTO DEL MICROORGANISMO

La conservación del *Bacillus sp* se realizó en un medio sólido, compuesto de infusión de cerebro de corazón y agar como sustancia solidificante. En el cuadro 11 se muestran las proporciones de ambos componentes.

Cuadro 11

Medio sólido de crecimiento

Fusión de cerebro de corazón	37 g /L
Agar	15 g / L

El medio sólido, una vez disuelto en agua, se esterilizó a 15 lb/in durante 15 minutos. Luego se dejó enfriar y por último se vació en caja de petri. De ésta manera se tuvo el medio sólido, en el cual se sembró el *Bacillus sp* para posteriormente conservarse en refrigeración.

PREPARACION DE MEDIOS DE CRECIMIENTO Y DEXTROSA AL 20%.

A) MEDIO LURIA-BERTRANI.

Para obtener un volumen de 100 ml se pesó:

1 gr de peptona de caseína, 0.5 gr de extracto de levadura, y 0.5 gr de cloruro de sodio.

Después todas las sustancias se disolvieron en agua destilada, posteriormente se aforó a 100 ml y se ajustó el pH de la solución

entre un valor de 7.2 y 7.4. Por último se esterilizó a 15 Ib/in durante 15 minutos.

b) MEDIO MINIMO.

Se pesaron las cantidades indicadas en el cuadro 10 para cada uno de las sustancias que componen el medio, posteriormente se disolvieron por separado. En el caso de la solución A, una vez disueltos sus componentes, se le ajustó el pH a un valor de 7.4. Después mezclaron ambas soluciones para obtener una solución stock de medio Robinson, la cual por último se esterilizó a 15 Ib/in durante 15 minutos.

c) SOLUCION DE DEXTROSA AL 20%.

Se pesaron 20 gramos de dextrosa, se disolvieron en agua destilada y después se aforó a 100 ml, posteriormente se esterilizó a 10 Ib/in durante 10 minutos.

MATERIAL Y EQUIPO

Durante el desarrollo del trabajo experimental se utilizó el siguiente material y equipo:

- Pipetas graduadas de 1, 5, 10 ml.
- Cajas de petri.
- Cartuchos para esterilizar pipetas.
- Matraces Erlenmeyer de 100, 250, 500 ml y matraces de 1, 4 litros.
- Matraces aforados de 25, 50, 100, 250 y 1000 ml.
- Espátulas.
- Autoclave.
- Espectrofotómetro de luz visible (Marca Baush and Lomb, modelo Spectronic 20).
- Espectrofotómetro de luz ultravioleta (Marca Beckman, modelo Spectrophotometer 25).
- Fermentador con capacidad de 14 litros (Marca New Brunswick).
- Balanza analítica.
- Balanza granataria.

A N E X O B

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE CARBOHIDRATOS

A. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE CARBOHIDRATOS METODO DE FENOL (DUBOIS).

PROCEDIMIENTO.

a.1 De la muestra problema tomar una alícuota de 1 ml y llevarla a 2 ml, utilizando agua destilada.

a.2 Adicionar 1 ml de fenol al 5 % y 5 ml de ácido sulfúrico concentrado, agitar y dejar reposar 10 minutos a temperatura ambiente y después 20 minutos a 30 °C.

a.3 Determinar la absorbancia de la muestra a 490 nm, e interpolar el dato obtenido en una curva estándar de glucosa (ver figura 23) para determinar la concentración.

B. ELABORACION DE LA CURVA ESTANDAR DE GLUCOSA.

PROCEDIMIENTO.

b.1 Preparar soluciones de glucosa con concentraciones entre 0 - 100 mg/ml o bien entre 0 - 100 microgramos/ml según sea el caso.

b.2 Tomar una alícuota de 1 ml de la primera solución y llevarla a 2 ml, utilizando agua destilada.

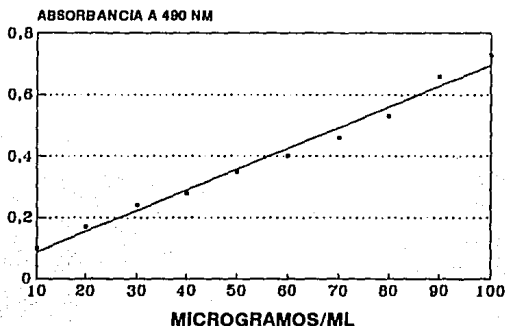
b.3 Adicionar 1 ml de fenol al 5 % y 5 ml de ácido sulfúrico concentrado, agitar y dejar reposar 10 minutos a temperatura ambiente y después 20 minutos a 30 °C.

b.4 Determinar la absorbancia de la solución a 490 nm.

b.5 Repetir el mismo procedimiento para las otras soluciones.

b.6 Elaborar con los datos obtenidos una gráfica de Concentraciones contra Absorbancia.

FIGURA 23
CURVA ESTANDAR DE DEXTROSA



A N E X O C

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE NAD

A. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE NAD.
PROCEDIMIENTO.

a.1 Tomar 1 ml de la muestra problema y diluirlo en 4 ml de agua destilada (dilución 1:5).

a.2 Adicionar la muestra diluida en una celda de cuarzo.

a.3 Determinar la absorbancia de la muestra a 260 nm, utilizando un espectrofotómetro de luz ultravioleta e interpolar la lectura obtenida en una curva estándar de NAD (ver figura 24) para determinar la concentración.

B. ELABORACION DE LA CURVA ESTANDAR DE NAD.

PROCEDIMIENTO.

b.1 Preparar una solución de NAD con una concentración de 0.1 mg/ml.

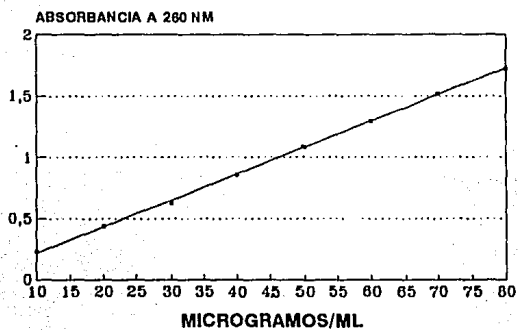
b.2 Tomar de la solución preparada alícuotas de 5, 10 , 15 , 20, 25, 30, 35 y 40 ml e ir las adicionando en forma individual en matraces de 50 ml.

b.3 Realizar el aforo de cada matraz utilizando agua destilada.

b.4 Determinar la absorbancia de cada matraz a 260 nm, utilizando un espectrofotómetro de luz ultravioleta.

b.5 Realizar con los datos obtenidos una gráfica de concentraciones contra absorbancia.

FIGURA 24
CURVA ESTANDAR DE NAD



A N E X O D

ANALISIS ESTADISTICO

1) Variación de la concentración de la fuente de carbono.

Cuadro 10
ANAVA

FUENTE DE VARIACION	gl	SC	CM	FC	FT (0.5)
BLOQUES	$(r-1) = 1$	8×10^{-5}	8×10^{-5}	4.57	7.71
TRATAMIENTOS	$(t-1) = 4$	2.5×10^{-3}	5.12×10^{-4}	29.25	6.39
ERROR	$(r-1)(t-1) = 4$	8×10^{-5}	1.75×10^{-5}		

CONCLUSIONES:

a) Para bloques, se acepta H_0 , es decir no hay diferencia significativa entre los promedios de las velocidades de crecimiento.

b) Para tratamientos, se acepta H_a , es decir si hay diferencia significativa entre los promedios de las velocidades de crecimiento.

Prueba de Tukey.

Concentración (%)	media de la velocidad de crecimiento (h^{-1})
0.5	X_1 0.312
1.5	X_2 0.287
2.0	X_3 0.282
2.5	X_4 0.279
3.0	X_5 0.269

Número de comparaciones = $a(a-1)/2$ a = no. de tratamientos

Número de comparaciones = $5(5-1)/2 = 10$

- | | |
|----------------|-----------------|
| 1. $X_1 - X_2$ | 6. $X_2 - X_4$ |
| 2. $X_1 - X_3$ | 7. $X_2 - X_5$ |
| 3. $X_1 - X_4$ | 8. $X_3 - X_4$ |
| 4. $X_1 - X_5$ | 9. $X_3 - X_5$ |
| 5. $X_2 - X_3$ | 10. $X_4 - X_5$ |

Calculo de W.

W = diferencia minima significativa.

W = $q_\alpha SX$ $SX = (S^2/n)^{1/2}$ $S^2 = CM \text{ ERROR}$
 q_α se calcula con $a =$ no. de tratamientos $n =$ no. de repeticiones
 y los GL del ERROR.

- | | |
|--------------------------------|--------------------------------|
| 1. $X_1 - X_2 = 0.025 > 0.018$ | 6. $X_2 - X_4 = 0.008 < 0.018$ |
| 2. $X_1 - X_3 = 0.03 > 0.018$ | 7. $X_2 - X_5 = 0.018 = 0.018$ |
| 3. $X_1 - X_4 = 0.033 > 0.018$ | 8. $X_3 - X_4 = 0.003 < 0.018$ |
| 4. $X_1 - X_5 = 0.043 > 0.018$ | 9. $X_3 - X_5 = 0.013 < 0.018$ |
| 5. $X_2 - X_3 = 0.005 < 0.018$ | 10. $X_4 - X_5 = 0.01 < 0.018$ |

Conclusión.

La única diferente es la concentración de 0.5 %

2) Variación de la concentración de la fuente de nitrógeno.

Cuadro 11
ANAVA

FUENTE DE VARIACION	gl	SC	CM	FC	FT (0.5)
BLOQUES	(r-1)= 1	5×10^{-4}	5×10^{-4}	0.119	7.71
TRATAMIENTOS	(t-1)= 4	1.3×10^{-4}	3.25×10^{-5}	7.73×10^{-3}	6.39
ERROR	(r-1)(t-1)= 4	0.0168	4.2×10^{-3}		

CONCLUSIONES:

a) Para bloques y tratamientos se acepta H_0 , por lo tanto no hay diferencia significativa entre los promedios de las velocidades de crecimiento.

3) Estimación de la confiabilidad de las conclusiones.

formula $CV = \left(\frac{CM \text{ DEL ERROR}}{M} \right)^{1/2}$ $M = X/an$ donde:

M = Suma total de las observaciones.
a = No. de tratamientos.
n = No. de repeticiones.

3.1 Para la variación de la concentración de la fuente de carbono se tiene:

$$M = 2.858 / (5) (2) = 0.2858$$

$$CV = \left((1.75 \times 10^{-5})^{1/2} / 0.2858 \right) \times 100 = 1.463$$

3.2 Para la variación de la concentración de la fuente de nitrógeno se tiene:

$$M = 2.5654 / (5) (2) = 0.2565$$

$$CV = \left((4.2 \times 10^{-3})^{1/2} / 0.2565 \right) \times 100 = 25.26$$

BIBLIOGRAFIA

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

1. Adrián N. C. de LAAT. Microbiología General. 2a. edición. México. Nueva editorial Interamericana S. A. de C. V. 1983. Págs 190, 193.
2. Catalago Sigma. Biochemicals Organic Compounds for Research and Diagnostic Reagents. Pág 1420 .
3. David W. Martin. Bioquímica de Harper. 6a. edición. México D.F. . El Manual Moderno, S.A. DE C.V. 1978 . Págs 52, 53 .
4. E. A. Dawes . Problemas cuantitativos. 4a. edición. Zaragoza España. Editorial Acribia. Pág 204 .
5. H.J.Rehn and G. Reed. Biotechnology. Vol. 4 Microbial Products 2 1986. Pág. 160 .
6. H.J.Rehn and G. Reed. Biotechnology. Vol. 72 Enzyme Technology Pág. 621 .
7. John, G. Holt. The Shorter Bergey's Manual of Determinative Bacteriology". 8a. edition. 1978. Págs 201, 208 .
8. Kuwahara, M. Tshida and Miyagama. J. Ferment Technol. Vol. 60 . 1982 . Pág. 399 .
9. Masaaki Kuwahara. Biosynthesis Of Pyridinecoenzymes by *Aspergillus fungi*. J. Ferment. Technol. Vol. 60, no. 5. 1982. Págs. 339-404.
10. Memorias de la segunda reunión de investigación Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan. Estudio de una cepa de *Bacillus* productora de NAD. 1979.
11. Michael J. Pelczar, JR. Microbiología. 2a. edición. México. Editorial Mc Graw-Hill de Máexico. 1982. Págs 736, 740.

12. Nakayama et. al.. Producción de NAD y ácido nicotínico mononucleótido con *Brevibacterium Ammoniagenes*. Agric. Biol Chem 32 No. 11. 1968. Pág 1331.
13. Rene Scriban. Biotecnología. México. 1985. Editorial El Manual Moderno. Pág. 27.
14. Robert G. D. Stell. Bioestadística Principios y procedimientos. 2a. edición. México D.F. Editorial McGraw-Hill Interamericana. 1990. Págs 191 -193
15. Jaime Alvarez de la Cuadra Jacobs et al. No más fastidio con los fastidiosos. No. 160. Vol. XIII. Año 13. 1990. Págs 67, 71.
16. Rodolfo Quintero Ramirez. Ingeniería Bioquímica. 1a. edición .Editorial Alhambra Mexicana, S.A. 1981. Págs 15, 18 y 20.
17. Roland A. Mcallister. Las enzimas. 2a. México D.F.. Editorial El Manual Moderno, S. A.. Págs 14, 15 .
18. Roger J. Williams. The Encyclopedia Of Biochemistry. Reimpresión 1977. New York. Publicada por Reinhold, N.Y. Págs 579, 581.
19. R.E. Buchanan and N.E Gibbons. Bergey's manual of determinative bacteriology. 8a. edición. Editorial Board. 1974. Págs 529-532.
20. Pedro Reyes Castañeda. Bioestadística aplicada. 4a. edición. México D.F.. Editorial Trillas. Págs 92 -112
21. Takebe, I and Kitahara. J. Gen Appl. Volumen 9. Pág 31 .
22. THE MERK INDEX 9 EDICION. EDITOR BUDAVARIS. Pág 1002 .
23. Thomas D. Brock. Biología de los microorganismos. Barcelona. Editorial Omega S.A. 1973. Págs 94, 95 .
24. SAKAI T. UCHIDA AND I. CHIBATA, AGRIC. BIOL. CHEM Vol 37 Pág 1041 (1973) .

25. SAKAI T. UCHIDA AND I. CHIBATA, AGRIC. BIOL. CHEM Vol 37 Pág 1049 (1973) .

26. WIMPENNY J. W. T AND FIRTH, A. (1972). JOURNAL BACTERIOL, Vol 111, Pág. 24 .

27. WITHOLT, B (1972). J. BACTERIOL, Vol 109 , Pág 350.