

25A
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
Escuela Nacional de Estudios Profesio-
nales "Zaragoza"

CINETICA DE CRECIMIENTO DE PROPIONIBACTE-
RIUM SHERMANII EN UN SUBPRODUCTO DE LA --
INDUSTRIA DEL LIMON "MEXICANO".

TESIS:

Que Presenta

LOURDES ARACELI SANTANA CASTILLO

Para obtener el título de

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

México, D.F.

1985

1985



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.

CONTENIDO

	Pág.
I. INTRODUCCION	1
II. FUNDAMENTACION DEL TEMA	7
II.1. - Crecimiento microbiano	7
II.1.1. Definición de crecimiento	7
II.1.2. Métodos para medir crecimiento microbiano	8
II.1.3. Curva de crecimiento	11
II.1.4. Crecimiento en respuesta al -- medio ambiente	13
II.1.4a. Medio ambiente físico	14
II.1.4b. Medio ambiente químico	15
II.1.5. Diseño del medio de crecimiento	16
II.1.5a. Requerimientos nutricionales	16
II.1.5b. Requerimiento energético	16
II.1.5c. Requerimiento ambiental	17
II.1.5d. Consideraciones técnicas y económicas	18
II.1.6. Crecimiento del microorganismo en presencia de una sola fuente de carbono, más de una fuente - de carbono y en un medio complejo	18
II.1.7. Crecimiento del microorganismo en relación a su suministro de energía.	21
II.2. Cinética de fermentación	24
II.2.1. Velocidad volumétrica	24
II.2.2. Velocidad específica	24
II.3. Clasificación de las fermentaciones	30
II.4. Productividad	32

	Pág.
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	35
IV. OBJETIVO E HIPOTESIS	36
V. MATERIALES Y METODOS	37
V.1. Microorganismo, reactivación y conservación	37
V.2. Preparación de los medios de fermentación	37
V.3. Preparación del inóculo	40
V.4. Condiciones de fermentación	40
V.5. Tratamiento de la muestra fermentada	42
V.6. Determinación del crecimiento microbiano	42
V.7. Métodos analíticos	45
VI. RESULTADOS Y DISCUSION	53
VI.1. Pruebas específicas para <u>Propionibacterium shermanii</u> ATCC 13673	53
VI.2. Pruebas de estabilidad y producción de vitamina B ₁₂ en <u>Propionibacterium shermanii</u> ATCC 13673 bajo condiciones prolongadas de aeración	55
VI.3. Pruebas preliminares	59
VI.4. Experimentos a nivel fermentador	64
VI.4.1. Experimentos utilizando glucosa como fuente de carbono	64
VI.4.1a. Fermentación bajo condiciones anaeróbicas	65
VI.4.1b. Fermentación bajo condiciones aeróbicas	65
VI.4.1c. Fermentación bajo condiciones anaeróbicas-aeróbicas.	72

	Pág.
VI.4.1d. Fermentación bajo condiciones anaeróbica-aeróbica con adiciones periódicas de glucosa	76
VI.4.1e. Rendimientos y productividades	82
VI.4.2. Experimentos utilizando jugo cocido de limón como fuente de carbono	88
VI.4.2a. Fermentación bajo condiciones anaeróbicas	88
VI.4.2b. Fermentación bajo condiciones aeróbicas	91
VI.4.2c. Fermentación bajo condiciones anaeróbica-aeróbica	98
VI.4.2d. Fermentación bajo condiciones anaeróbica-aeróbica con adiciones periódicas de jugo cocido de limón	101
VI.4.2e. Rendimientos y productividades	107
VII. CONCLUSIONES	112
VIII. RECOMENDACIONES	117
IX. ANEXOS	118
X. BIBLIOGRAFIA	134

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
1. Diagrama de flujo para la industrialización del limón mexicano.	3
2. Esquematación de los diferentes métodos - para medir el crecimiento microbiano.	9
3. Curva típica de crecimiento microbiano en - una fermentación por lote.	12
4. Crecimiento microbiano en presencia de dos fuentes de carbono.	19
5. Crecimiento microbiano en presencia de varias fuentes de carbono y en medio complejo.	20
6. Clasificación de las fermentaciones, modelo - de Gaden.	31
7. Representación de la productividad en una fer ^{mentación} por lote.	33
8. Diagrama de bloques del desarrollo experimental.	38
8a. Preparación del inóculo, en medio control de - glucosa y en medio a base de jugo cocido de -- limón.	41
9. Unidad de fermentación modelo 19 New Brunswick Scientifica (Co., instrumentado).	44
10. Curva estandar, D.O. vs peso seco de <u>P. shermanii</u> ATCC 13673 en un medio a base de jugo cocido de limón.	46
11. Curva estandar, D.O. vs peso seco de <u>P. shermanii</u> ATCC 13673 en un medio control de glucosa.	47

	Pág.
12. Curva estandar, D.O. vs concentración de azúcares reductores totales.	48
13. Curva estandar, altura del pico vs concentración de ácido cítrico.	50
14. Curva estandar, altura del pico vs concentración de ácido láctico.	51
15. Curva estandar, altura del pico vs concentración de ácido succínico.	52
16. Micrografía electrónica de <u>P. shermanii</u> ATCC - 13673 bajo condiciones prolongadas de aeración.	58
17. Curva concentración contra tiempo en la fermentación anaeróbica de un medio control de glucosa con <u>P. shermanii</u> ATCC 13673.	67
18. Velocidades específicas de crecimiento, $\mu(h^{-1})$ de <u>P. shermanii</u> ATCC 13673 en un medio control de glucosa bajo diferentes condiciones de aeración.	68
19. Velocidades específicas en la fermentación anaeróbica de un medio control de glucosa con <u>P. shermanii</u> ATCC 13673.	69
20. Curva concentración contra tiempo en la fermentación aeróbica de un medio control de glucosa con <u>P. shermanii</u> ATCC 13673.	71
21. Velocidades específicas en la fermentación aeróbica de un medio control de glucosa con <u>P. shermanii</u> ATCC 13673.	73
22. Curva concentración contra tiempo en la fermentación anaeróbica-aeróbica de un medio control de glucosa con <u>P. shermanii</u> ATCC 13673.	75
23. Velocidades específicas en la fermentación anaeróbica-aeróbica de un medio control de glucosa con <u>P. shermanii</u> ATCC 13673.	77

	Pág.
24. Curva concentración contra tiempo en la fermentación anaeróbica-aeróbica/adiciones de un medio control de glucosa con <u>P. shermanii</u> ATCC 13673.	79
25. Velocidades específicas en la fermentación anaeróbica-aeróbica/adiciones de un medio control de glucosa con <u>P. shermanii</u> ATCC 13673.	81
26. Generación de ATP por mol de glucosa en la vía metabólica de las Propionibacterias.	84
27. Curva concentración contra tiempo de la fermentación anaeróbica de un medio a base de jugo cocido de limón con <u>P. shermanii</u> ATCC	90
28. Velocidades específicas de crecimiento, μ (h ⁻¹) de <u>P. shermanii</u> ATCC 13673 en un medio a base de jugo cocido de limón bajo diferentes condiciones de aeración.	92
29. Velocidades específicas en la fermentación anaeróbica de un medio a base de jugo cocido de limón con <u>P. shermanii</u> ATCC 13673.	93
30. Curva concentración contra tiempo en la fermentación aeróbica de un medio a base de jugo cocido de limón con <u>P. shermanii</u> ATCC 13673.	95
31. Velocidades específicas en la fermentación aeróbica de un medio a base de jugo cocido de limón con <u>P. shermanii</u> ATCC 13673.	97
32. Curva concentración contra tiempo en la fermentación anaeróbica-aeróbica de un medio a base de jugo cocido de limón con <u>P. shermanii</u> ATCC 13673.	100
33. Velocidades específicas en la fermentación anaeróbica-aeróbica de un medio a base de jugo cocido de limón con <u>P. shermanii</u> ATCC 13673.	102

34. Curva concentración contra tiempo en la fermentación anaeróbica-aeróbica/adiciones de un medio a base de jugo cocido de limón con P. shermanii ATCC 13673. 104
35. Velocidades específicas en la fermentación anaeróbica-aeróbica/adiciones de un medio a base de jugo cocido de limón con P. shermanii ATCC 13673. 105

LISTA DE TABLAS

	Pág.
I. Composición química del jugo cocido de limón.	5
II. Producción de vitamina B ₁₂ por diferentes cepas.	6
III. Condiciones de fermentación a nivel fermentador bajo diferentes condiciones de aeración.	43
IV. Propiedades específicas para <u>P. shermanii</u> ATCC 13673 bajo condiciones anaeróbicas y aeróbicas.	54
V. Expresión fenotípica de <u>P. shermanii</u> ATCC 13673 bajo condiciones prolongadas de aeración.	56
VI. Pruebas físicas y bioquímicas de las colonias aisladas de <u>P. shermanii</u> ATCC 13673	57
VII. Determinación de vitamina B ₁₂ al final de las fermentaciones en un medio de glucosa y en otro con jugo cocido de limón.	57
VIII. Determinación de glucosa, nitrógeno y vitamina B ₁₂ en las fermentaciones utilizando agua de cocimiento de maíz-cloruro de cobalto y jugo cocido de limón-cloruro de cobalto.	60
IX. Determinación de glucosa, nitrógeno y vitamina B ₁₂ en las fermentaciones donde los -	62

- constituyentes de los medios se esterilizaron por separado.
- X. Determinación de glucosa, nitrógeno y -- vitamina B₁₂ en las fermentaciones donde los constituyentes de los medios se esterilizaron juntos. 63
- XI. Resultados obtenidos en la fermentación anaeróbica de un medio control de glucosa con P. shermanii ATCC 13673. 66
- XII. Resultados obtenidos en la fermentación aeróbica de un medio control de glucosa con P. shermanii ATCC 13673. 70
- XIII. Resultados obtenidos en la fermentación anaeróbica-aeróbica de un medio control de glucosa con P. shermanii ATCC 13673. 74
- XIV. Resultados obtenidos en la fermentación anaeróbica-aeróbica/adiciones de un medio control de glucosa con P. shermanii ATCC 13673. 78
- XV. Rendimientos de P. shermanii ATCC 13673 bajo diferentes condiciones de aeración en un medio control de glucosa. 85
- XVI. Velocidades volumétricas de P. shermanii ATCC 13673. 87
- XVII. Resultados obtenidos en la fermentación anaeróbica de un medio a base de jugo cocido de limón con P. shermanii ATCC 13673. 89
- XVIII. Resultados obtenidos en la fermentación aeróbica de un medio a base de jugo cocido de limón con P. shermanii ATCC 13673. 94

	Pág.
XIX. Resultados obtenidos en la fermentación anaeróbica-aeróbica de un medio a base de jugo cocido de limón con <u>P. shermanii</u> -- ATCC 13673.	99
XX. Resultados obtenidos en la fermentación - anaeróbica-aeróbica/adiciones de un medio a base de jugo cocido de limón con -- <u>P. shermanii</u> ATCC 13673.	103
XXI. Rendimientos de <u>P. shermanii</u> ATCC 13673 - bajo diferentes condiciones de aeración - en un medio a base de jugo cocido de limón.	109
XXII. Velocidades volumétricas de <u>P. shermanii</u> - ATCC 13673 bajo diferentes condiciones de aeración en un medio a base de jugo cocido de limón.	111

I. INTRODUCCION

En la utilización e industrialización de productos -- agrícolas se generan volúmenes importantes de residuos que son desaprovechados o aprovechados en forma parcial y que -- a la postre representan serios riesgos de contaminación ambiental, tales residuos provenientes de fuentes renovables representan un gran potencial de utilización para la obtención de diversos productos importantes a las industrias: -- Alimentaria, Química, Química Farmacéutica y de Alimentos -- Balanceados entre otras.

Por otro lado, el Sistema Alimentario Mexicano (SAM) - plantea una serie de estrategias y actividades diseñadas -- para solventar la carencia de alimentos y alcanzar la auto-suficiencia alimentaria. Sin embargo, desde el punto de -- vista nutricional, realizar una dieta balanceada involucra la necesaria incorporación de factores de crecimiento (vitaminas, aminoácidos esenciales, etc.) que permiten obtener -- alimentos enriquecidos de alto valor nutritivo tanto para -- consumo humano como animal.

La producción de éstos factores a partir de residuos orgánicos constituye un sector nulo o de escaso desarrollo en nuestro país, no obstante de contar con la infraestructura humana y de equipo para llevarse a cabo, por ésta razón amerita un mayor impulso o apoyo para desarrollar tecnologías tendientes a eliminar la importación de éstos productos. Y hacer que lo que se ha considerado desperdicio agroindustrial deban ser vistos como materia prima aprovechable, y con ello resolver, en parte, algunos problemas -- de contaminación y la obtención de productos industrialmen

te importantes (42).

Dentro de los residuos y/o subproductos agroindustriales que han sido y están siendo motivo de estudio se pueden mencionar: la pulpa del henequén, cuyos constituyentes la hacen, una vez complementado, un buen medio fermentecible para aumentar su contenido protéico (34); utilización de bagazo de caña en la producción de lignosulfonatos para suspensiones, paja de trigo o bagazo de caña para la producción de furfural, melazas de caña en la producción de levadura y/o alcohol, por fermentación de almidón de la mandioca (huacamote) producción de etanol o por la fermentación de la melaza de caña (42); a partir de recursos celulósicos la obtención de proteína unicelular (35); fermentación de jugos cítricos para la obtención de levadura alimenticia y etanol (30); y actualmente se pretende utilizar el subproducto de la industria del limón mexicano para obtener vitamina B₁₂ (32).

En la industrialización del limón mexicano y específicamente en la obtención de aceite esencial destilado (Figura 3, proceso 2), se origina un subproducto llamado "Jugo Cocido" cuyo volumen residual le confiere una importancia extraordinaria en la industrialización integral del fruto.

Si se considera que para producir un tambor (180 Kg) de dicho aceite se utilizan 45 toneladas de limón y que aproximadamente el 50% es jugo cocido, es decir, 22,500 litros por tambor de aceite esencial y que en el año de 1980 se produjeron en México aproximadamente 3,500 tambores de aceite esencial destilado. Esto representa a nivel nacional 78,750,000 litros de jugo cocido por año (32).

El jugo cocido se ha utilizado industrialmente para la obtención de ácido cítrico por precipitación con hidróxido de calcio, proceso que ha pasado a ser obsoleto porque compete desventajosamente con la producción de ácido cítrico por fermentación, a pesar del bajo costo del mencionado --

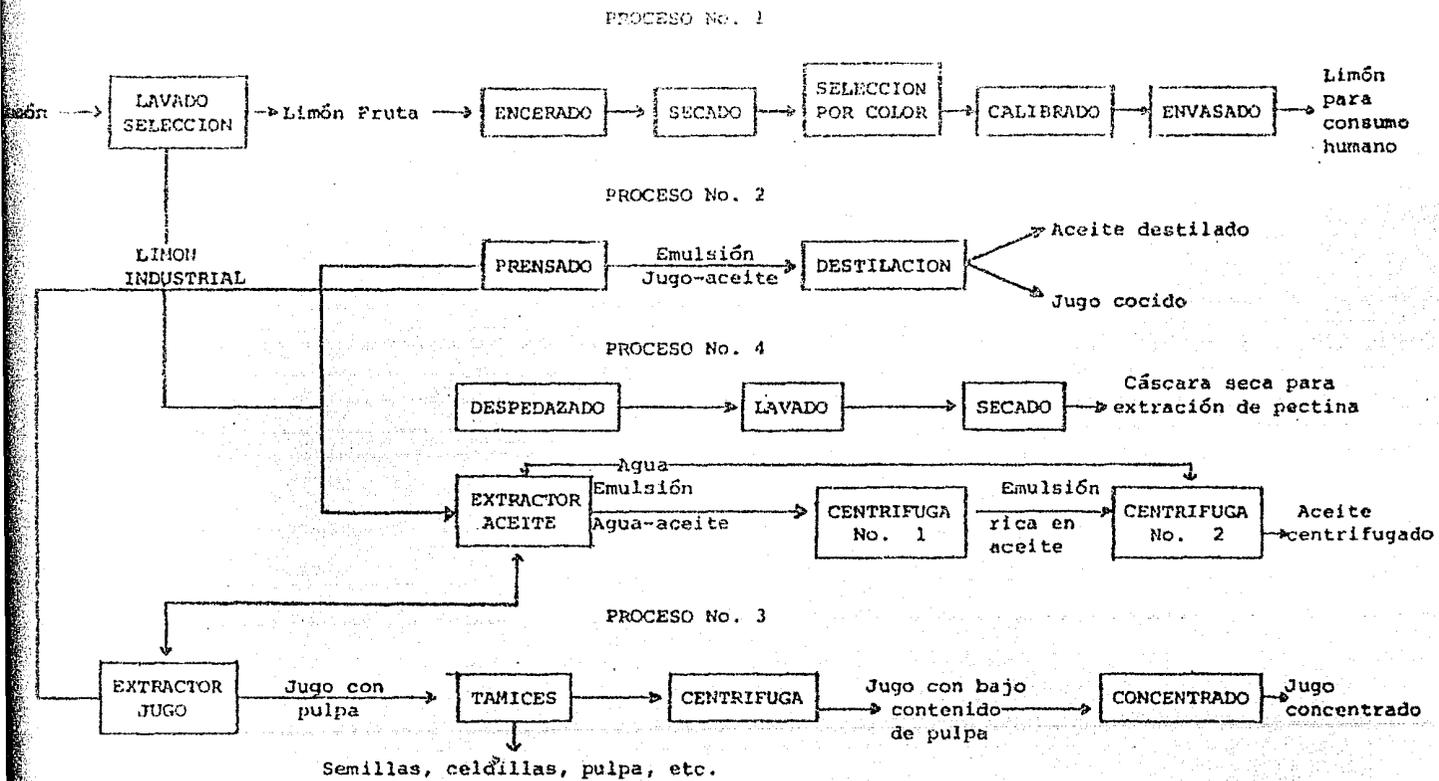


Figura 1. Diagrama de flujo para la industrialización del Limón Mexicano

subproducto. El volumen de éste queda íntegro y actualmente ocasiona serios problemas para su eliminación, desalojarlo al drenaje aumenta la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) debido a la gran cantidad de material orgánico ahí presente, su eliminación en el campo destruiría la flora natural, y si se deposita en pozos la infiltración puede contaminar los mantos acuíferos subterráneos.

En parte para contribuir a la solución de éstos problemas y por su composición química (Tabla I) ha sido posible emplearlo como constituyente de un medio de fermentación para la producción de vitamina B₁₂ (32) utilizando al microorganismo Propionobacterium shermanii lográndose hasta ahora un rendimiento de 29,000 mcg/l, cantidad que compete con la obtenida por sustratos convencionales (Tabla II). Este proyecto de investigación se está realizando desde 1979 en el departamento de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM).

El empleo cada vez mayor de la vitamina B₁₂ como factor de crecimiento en las industrias de Alimentos, Alimentos balanceados y en la industria Farmacéutica confieren a su producción relevante importancia, además de su alto valor comercial. México no la produce, la importa, en especial de Inglaterra e Italia como polvo de fermentación del cual se aísla y purifica, calculándose el valor de ésta importación, en 1980 en 8 millones de dólares (20).

Por éstas razones se considera de importancia producirla en México por vías fermentativas en cantidades industriales, que al principio satisfaga la demanda del mercado interno, y por consiguiente, evitar la fuga de divisas por éste concepto.

TABLA I

COMPOSICION QUIMICA DEL JUGO COCIDO DE LIMON

Manganeso	1.5	ppm
Cobre	0.85	ppm
Magnesio	8.0	ppm
Hierro	16.85	ppm
Cinc	4.2	ppm
Cromo	3.0	ppm
Fósforo	15.95	mg/100 ml
Azúcares totales (método de Ting)	1.5	%
Nitrógeno (método de Kjeldhal)	0.0661	g/100 ml
Acidez (ácido cítrico)	5.426	%
Aceite esencial	0.02	%
Grado Brix (refracción)	8.06	%
pH	2.5	

Fuente: Referencia (32)

TABLA II

PRODUCCION DE VITAMINA B₁₂ POR DIFERENTES CEPAS

Cepa	Fuente de carbono	(mg/l)	Referencias
<u>Micromonospora</u> sp.	Glucosa	11.5	Wagman <u>et al.</u> (1969)
<u>Nocardia rugosa</u>	Glucosa-melazas de caña	14	Farmacaceutic Italia (1971a)
<u>Propionibacterium freudenreichii</u>	Glucosa	25	Uclaf (1960)
<u>Propionibacterium shermanii</u>	Glucosa	23	Speedie and Hull (1960)
<u>Propionibacterium shermanii</u>	Glucosa	28	Chinoim-Gyogyszer (1965)
<u>Propionibacterium shermanii</u>	Jugo codio de limón	29	Pérez Mendoza (1981)
<u>Propionibacterium shermanii</u>	Glucosa	39	Pierrel S.p.A. (1965b)
<u>Propionibacterium vannielli</u>	Glucosa	25	Pliva T.F.K.P. (1964)
<u>Pseudomonas denitrificans</u>	Melazas de remolacha	59	Merck and Co., Inc., (1971)
<u>Streptomyces olivaceus</u>	Glucosa-lactosa	8.5	Terada <u>et al.</u> (1959)
fixed methanogenic bacteria	Metanol	35	Richter Gedeon V.G. (1975a,b)
<u>bacterium EM-02T</u>	Metanol	2.6	Toraya <u>et al.</u> (1975)
<u>Methanobacillus omelianskii</u>	Metanol	8.8	Paniskhava and Bykhovskiy (1966)
<u>Proteaminobacter ruber</u>	Metanol	2.5	Kojima <u>et al.</u> (1976)
<u>Corynebacterium and Rhodopseudomonas</u>	n-parafinas	2.3	Nakao <u>et al.</u> (1974)
<u>Nocardia gardneri</u>	Hexadecano	4.5	Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd. (1970)

Fuente: Referencia (32)

II. FUNDAMENTACION DEL TEMA

II.1 Crecimiento Microbiano

El crecimiento de los microorganismos junto con sus actividades fisiológicas se da como una respuesta al medio ambiente físico y químico.

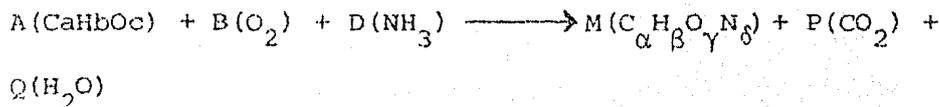
La respuesta microbiana al medio ambiente es frecuentemente interactiva alterándolo como consecuencia de sus actividades de crecimiento, y en algunos casos para mejorar sus ventajas competitivas contra otros microorganismos.

Existen patrones generales para el crecimiento microbiano ejemplificado por bacterias, levaduras, hongos y virus; siendo éstos: fisión binaria, gemación, ramificación y el último cuyo crecimiento no sigue un patrón normal pues requiere de un organismo huésped para duplicarse (9,43).

II.1.1 Definición de Crecimiento

En un microorganismo como sistema biológico, el crecimiento puede definirse como un incremento ordenado de todos sus constituyentes químicos. Esto no quiere decir que un aumento en la masa celular refleje un incremento en el número de microorganismos, ya que puede ser un resultado de la síntesis y acumulación de material de reserva celular (por ejemplo: glicógeno ó poli- β -hidroxibutirato). Es decir, el crecimiento es el resultado de la multiplicación celular o un incremento de las células individuales.

El crecimiento microbiano puede ser visto como una serie de reacciones químicas dirigido hacia la síntesis de masa celular (37,44).



donde:

A, B, D y P son las moles de los componentes respectivos.

CaHbOc es la fuente de carbono y energía

M son las moles de una unidad celular ($\text{C}_\alpha\text{H}_\beta\text{O}_\gamma\text{N}_\delta$).

II.1.2 Métodos para Medir Crecimiento Microbiano

Para todo proceso fermentativo es esencial cuantificar el crecimiento microbiano, el cuál puede ser determinado en base a dos diferentes parámetros: masa celular y número celular, tomando en cuenta que no son necesariamente equivalentes. En primer lugar, la masa de la célula individual puede variar, en segundo lugar, la masa celular aumenta cuantitativamente con el tiempo, mientras que el incremento en el número de células es discontinuo, -- ocurriendo como un resultado de divisiones celulares sucesivas a intervalos de tiempos fijos. Su diferencia es importante en crecimiento sincronizado, pero generalmente la multiplicación en una población celular grande es no sincronizado, por lo tanto, el incremento en la masa celular y el número de células son equivalentes para todos los propósitos prácticos. Los métodos pueden ser clasificados en métodos directos de masa celular, métodos directos de número de células y métodos indirectos de crecimiento (Figura 2). (9, 38, 39, 43).

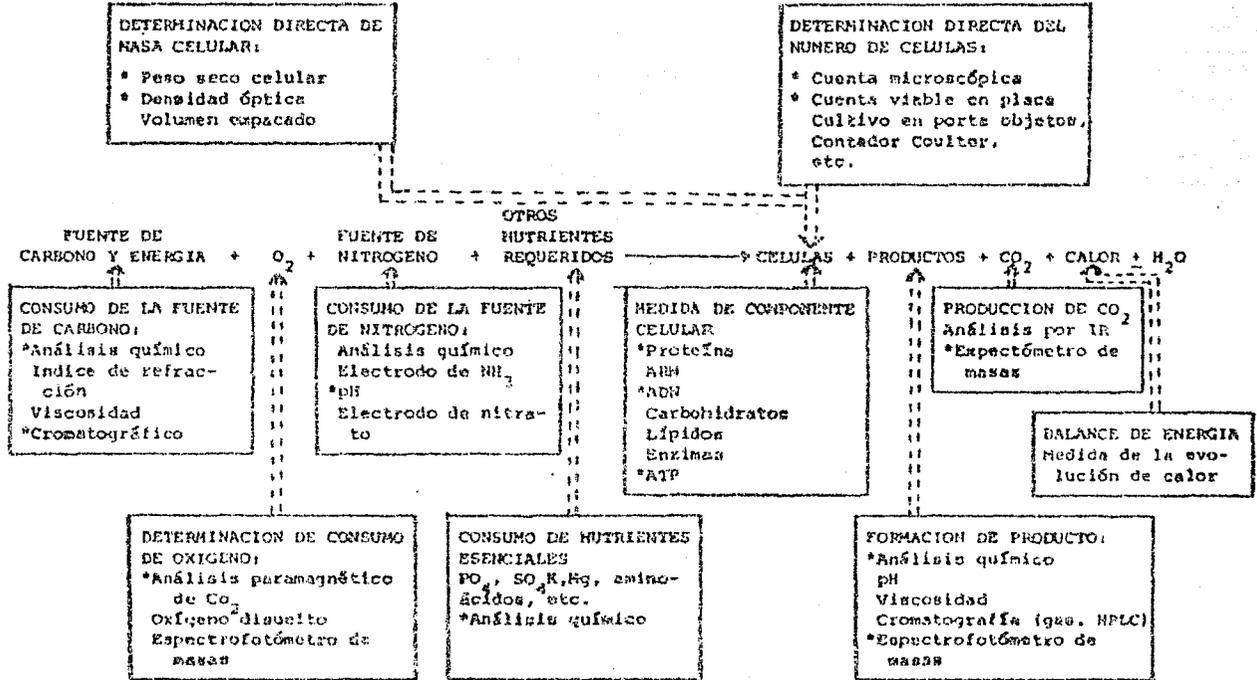
FIGURA 2

ESQUEMATIZACION DE LOS DIFERENTES METODOS EMPLEADOS PARA MEDIR EL CRECIMIENTO MICROBIANO

MÉTODOS DIRECTOS E INDIRECTOS

MÉTODOS DIRECTOS

MÉTODOS INDIRECTOS



*Métodos más comunes.

a - Medida del número de células. Puede llevarse a cabo por el método de cuenta microscópica con la ayuda de una cámara de conteo, utilizando muy poca suspensión celular, se cuentan tanto células vivas como muertas. La cuenta viable en placa es el método más común para la medida de células viables, consiste en hacerlas crecer en un medio nutritivo sólido donde cada célula esparcida en la placa dará una colonia. Un tercer método es el contador Coulter basado en la diferencia de conductividad eléctrica entre la célula y el fluido al atravesar un orificio muy fino. Otro es el cultivo en portaobjetos que se basa en una combinación de los métodos de cuenta viable y cuenta microscópica con la ventaja de diferenciar células viables y no viables en un corto periodo de tiempo de incubación.

b - Medida de masa celular. El peso seco celular es el método generalmente empleado, utilizando un volumen de suspensión celular fijo, el cual se centrifuga o se filtra lavando las células con agua destilada, solución isotónica o solución amortiguadora, secando posteriormente a 80°C por 24 hr ó a 110°C por 8 hr, es un método muy usado para normalizar los datos de las fermentaciones. Otro método ampliamente usado es el turbidimétrico, el cual se basa en que la intensidad de la luz transmitida es proporcional a la concentración de masa celular (Ley de Beer), determinando su densidad óptica con la ayuda de un espectrofotómetro o fotocolorímetro. Un tercer método es por volumen empacado, utilizado como método de rutina en plantas industriales para seguir el crecimiento celular; en éste método se utiliza un tubo cónico graduado manteniendo un volumen de suspensión celular, un tiempo y velocidad de centrifugación fijos.

c - Determinación indirecta de crecimiento. Estos métodos se utilizan generalmente cuando el medio de crecimiento contiene sólidos no celulares. Se basan en la medida de un nutriente, producto o componente celular cuyo consumo, producción o existencia está relacionada estequiométricamente a la cantidad de masa celular o a la medida de alguna propiedad física.

Por consumo de nutriente puede determinarse: fuente - de carbono, nitrógeno, oxígeno y algunos factores de crecimiento específico (aminoácidos o vitaminas).

Por medida de componente celular, puede determinarse: proteínas, ADN o ARN.

Por formación de producto: productos catabólitos como CO_2 por ejemplo; metabolitos primarios y secundarios.

Por calor de fermentación o cambio de entalpía.

Por viscosidad del medio

II.1.3 Curva de Crecimiento

El crecimiento microbiano está limitado por agotamiento de nutrientes o por la acumulación de productos metabólicos tóxicos producidos por ellos mismos, siendo éstos -- los factores principales que determinan la forma típica de la curva de crecimiento en una fermentación por lote cuyas fases están caracterizadas por variación en la velocidad de crecimiento (Figura 3), (1,9,39,43).

Generalmente solo se manejan 4 etapas de la curva de crecimiento que son:

- Fase lag o fase de adaptación (a), su duración puede - variar considerablemente y ocurre cuando el microorganismo proviene de un medio de composición diferente o de un medio viejo ya que tiene que organizar sus compo- nentes micro y macromoleculares (ARNm, enzimas, compo- nentes estructurales). En ésta fase la masa celular - puede cambiar sin aumento en el número de células, su característica principal es presentar una velocidad de

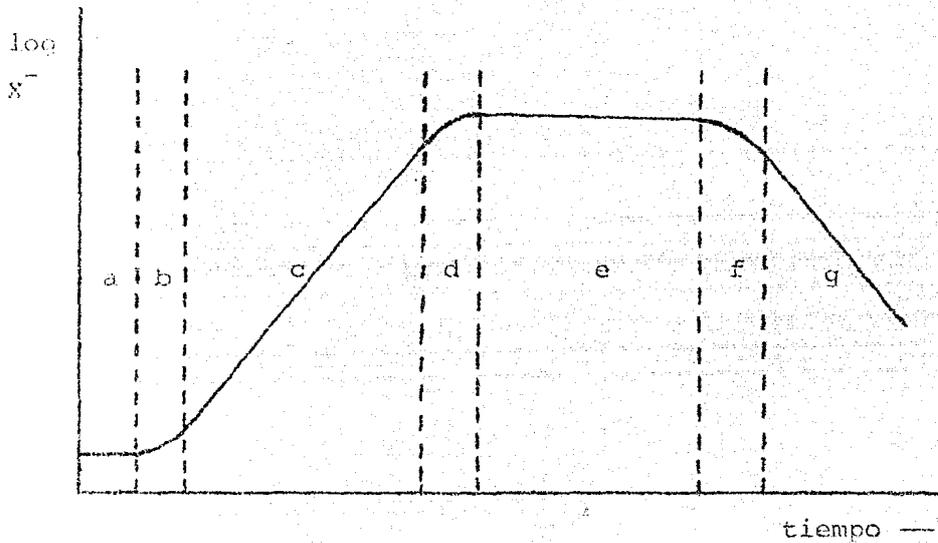


Figura 3. Curva típica de crecimiento microbiano en una fermentación por lote, cuyas fases de crecimiento son: a) Fase lag o fase de adaptación; b) fase de aceleración; c) fase logarítmica; d) fase de retardación; e) fase estacionaria; f) fase de desaceleración y g) fase de muerte.

crecimiento nula ($\mu = 0$). Posterior a ésta y más breve es la fase de aceleración (b) donde incrementa la velocidad de crecimiento ($\mu_{\text{máx}} > \mu > 0$), esta se presenta antes de entrar a la fase logarítmica.

- Fase logarítmica o exponencial ($\mu = \mu_{\text{max}}$) (c), está caracterizada por una línea recta si se grafica logaritmo natural del crecimiento ($\ln X$) contra tiempo. - La velocidad específica de crecimiento (μ) es constante e independiente de la concentración del sustrato. La composición macromolecular celular por unidad de paso permanece constante. Casi todas las células son viables y de tamaño constante, la masa celular y el número de células aumentan paralelamente. Posteriormente la velocidad de crecimiento disminuye entrando de ésta manera a la fase de retardación (d) antes de pasar a la siguiente etapa.

- Fase estacionaria (e), se presenta ésta fase ya sea porque algún nutriente se ha agotado o por la acumulación de algún metabolito tóxico. La división celular se ha detenido y las células viables alcanzan un equilibrio con las células muertas. La velocidad de crecimiento específico es por lo tanto nula ($\mu = 0$).

- Fase de muerte (g), ésta se presenta después de pasar por una fase de desaceleración. La muerte de las células no frecuentemente va acompañada por lisis, de tal forma que la masa celular puede permanecer constante. La población viable declina, la cinética de muerte de la población bacteriana es exponencial, la velocidad de crecimiento es por lo tanto negativo.

II.1.4 Crecimiento en Respuesta al Medio Ambiente

Todo organismo se encuentra capacitado genéticamente para producir determinado producto y para crecer adecuada--

mente al proporcionarle las condiciones físicas y químicas adecuadas a su medio ambiente y de ésta manera obtener un desarrollo fermentativo óptimo.

II.1.4a - Crecimiento en respuesta a su ambiente físico.

Efecto de la temperatura. Como ya se dijo anteriormente el crecimiento microbiano se considera una serie de reacciones químicas y como tales necesitan una temperatura óptima para realizarse. El microorganismo mediante su sistema enzimático cataliza dichas reacciones, donde la eficiencia de la conversión de la fuente de carbono y energía a material celular y con ello la velocidad de crecimiento, así como la formación de producto dependen grandemente de la temperatura, de ésta forma, se pueden clasificar a los microorganismos en base a sus temperaturas óptimas de crecimiento: psicrófilos obligados (10-18°C) y facultativos (25-30°C), mesófilos (30-45°C) y termófilos (55-75°C).

El efecto de la temperatura sobre la velocidad de crecimiento específico está regida por la ecuación de Arrhenius:

$$\mu = A e^{-E_a/RT} \quad (1)$$

donde:

- A = Constante de Arrhenius
- E_a = Energía de activación (Kcal/mol)
- R = Constante universal de los gases
- T = Temperatura absoluta

II.1.4b - Crecimiento en respuesta a su ambiente químico.

Al igual que la temperatura, el pH y la concentración

de nutrientes tienen un efecto primordial en la velocidad de crecimiento y formación de producto. Siendo el pH un factor muy importante en la fermentación es necesario controlarlo; primero para obtener una velocidad de crecimiento óptima, segundo para obtener el máximo de producto deseado y tercero para evitar que el medio se contamine con otros microorganismos. Para ello se ha generalizado la dependencia que tiene el crecimiento y formación de producto con respecto al pH, pudiendo decir que las bacterias crecen en un rango de pH de 4-8 unidades, las levaduras de 3-6, los hongos de 3-7 y las células eucariotas superiores de 6.5-7.5, siendo este mismo rango el óptimo para las bacterias. El control de pH en una fermentación se puede realizar agregando una solución amortiguadora o bien empleando un controlador de pH. La concentración de los nutrientes de un medio de fermentación es otro de los factores importantes que afecta la velocidad de crecimiento microbiano y formación de producto. Los sustratos pueden ser: -- fuente de carbono-energía, nitrógeno, sales minerales o/y factores esenciales de crecimiento. Tomando en cuenta en este caso las fuerzas iónicas que pudieran presentarse en el medio. La inhibición por concentración de sustrato puede ser explicado por fenómenos de osmolaridad sobre la célula microbiana. La cantidad de glucosa que comunmente se utiliza es al 10% y de ión amonio al 0.5% como ejemplo de los principales componentes de fermentación (9).

La velocidad de crecimiento, como en una reacción química depende de la concentración de los nutrientes, esta dependencia está expresada en la ecuación de Monod:

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S} \quad (2)$$

donde:

- μ = Velocidad de crecimiento específico (hrs⁻¹)
- μ_m = Velocidad máxima de crecimiento (hrs⁻¹)
- S = Concentración de sustrato (g/l)
- K_s = Valor de la concentración de sustrato a $\mu = 0.5 \mu_m$.

II.1.5 - Diseño de un medio de crecimiento

Dentro del proceso de fermentación es importante diseñar un medio de crecimiento y producción cuyos puntos importantes a considerar (9) son:

II.1.5a - Requerimientos nutricionales.

Para el proceso de optimización de un medio hay que tomar en cuenta las características químicas de cada uno de los constituyentes para evitar reacciones no deseadas entre ellos, y permanecer de ésta manera libres para poder ser utilizados por el microorganismo. Así como una examinación de la composición celular.

Para lograr la mínima cantidad de nutrientes elementales se hace uso de la estequiometría, pero no es necesariamente suficiente para estimar la mínima concentración requerida para masa celular, producto(s) y energía para síntesis y mantenimiento.

Fuente de Carbono + Fuente de Nitrógeno + minerales +
Factores de Crecimiento



Masa celular + Producto(s) + CO_2 + H_2O

Muchos microorganismos requieren de nutrientes específicos como consecuencia de su incapacidad para sintetizarlos (vitaminas, aminoácidos, nucleótidos), requiriéndolos en el orden de mg/l. Se pueden satisfacer sus necesidades usando medios complejos, como: extracto de levadura, casas aminoácidos, licor de maíz, entre otros.

II.1.5b - Requerimiento energético.

La serie de reacciones complejas que realiza la célula

la (biosíntesis, mantenimiento de la estructura celular, -- transporte activo de moléculas, establecimiento de los gradientes de concentración de la célula y en algunos casos -- para su movilidad) requieren gastos de energía, ésta energía la obtiene en la mayoría de los casos de la oxidación -- de la(s) fuente(s) de carbono en forma de trifosfato de adenosina (ATP). En los microorganismos aeróbicos, el oxígeno es el aceptor más común de los electrones en el cuál hay -- producción de ATP de la fosforilación oxidativa. Por lo -- tanto, el metabolismo del oxígeno, la utilización de la fuente de carbono y la producción de energía (ATP) son eventos relacionados. En organismos anaeróbicos, los aceptores de electrones son usualmente compuestos derivados de la fuente de carbono.

Se debe proporcionar al microorganismo suficiente fuente de carbono para que la utilice para material celular y energía, ambas características quedan incluidas en el coeficiente de rendimiento celular, $Y_{x/s}$:

$$Y_{x/s} = \frac{X_{m\acute{a}x.} - X_0}{S_0 - S} \quad (3)$$

donde:

- X_0 = Concentración celular a tiempo cero (g/l)
- $X_{m\acute{a}x.}$ = Concentración celular máxima (g/l)
- S_0 = Concentración inicial de sustrato, a tiempo cero (g/l)
- S = Concentración de sustrato al máximo crecimiento (g/l)
- $Y_{x/s}$ = sus unidades son gramos de célula producida/ gramo de sustrato utilizado.

II.1.5c - Requerimiento ambiental.

Los requerimientos o necesidades ambientales para que un microorganismo se reproduzca y forme el producto deseado, se pueden considerar: pH, temperatura, concentración -

de nutrientes, fuerza iónica, oxígeno disuelto y presión parcial de dióxido de carbono, como se menciona en (9,43).

II.1.5d - Consideraciones técnicas y económicas.

Para un proceso fermentativo el objetivo principal es encontrar el mínimo costo por unidad de producto, tomando en cuenta que de un 10-60% del costo de la fermentación se debe a los nutrientes, siendo el mayor costo el de la fuente-energía, seguido en costo el de la fuente de nitrógeno. Las operaciones unitarias en fermentación (esterilización, agitación, aeración, separación). Demanda en el mercado nacional. Uso de materias primas nacionales.

II.1.6 - Crecimiento de microorganismos en presencia de -- una sola fuente de carbono, mas de una fuente de carbono y en un medio complejo.

Todo microorganismo cuyo crecimiento dependa sólo de una fuente de carbono-energía se esperará siempre un comportamiento como se presenta en la Figura 3, donde su velocidad de crecimiento dependerá de la naturaleza del sustrato (9). Mientras que, cuando el microorganismo se encuentra con un medio conteniendo dos fuentes de carbono diferentes, presenta un comportamiento diauxico (Figura 4), -- presentando dos velocidades específicas de crecimiento --- características de cada fuente de carbono asimilado. Cuando el medio de crecimiento contiene más de dos fuentes de carbono-energía utiliza primero la más fácilmente asimilable y así sucesivamente presentando con ello diferentes -- velocidades específicas de crecimiento, las cuales son cada vez menores (Figura 5). De igual forma es el comportamiento del microorganismo cuando éste crece en un medio -- complejo, con la diferencia de que no sólo se va a encontrar con diferentes fuentes de carbono, sino también de una amplia variedad de otros compuestos, tales como: vitaminas, a.a., nucleótidos, etc. (9,29).

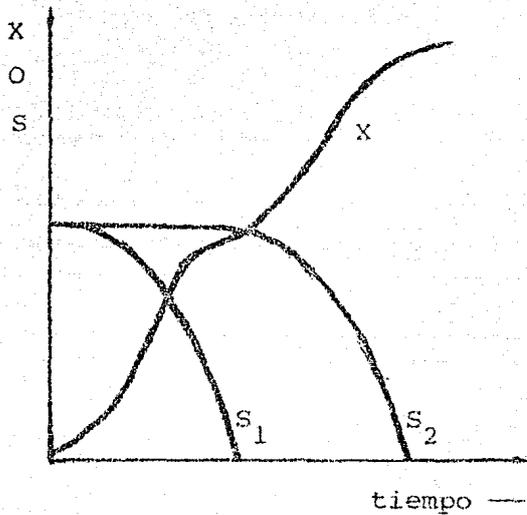


Figura 4. Crecimiento microbiano en presencia de dos fuentes de carbono S_1 y S_2 , muestra crecimiento diáuxico.

X = crecimiento celular

S = sustrato

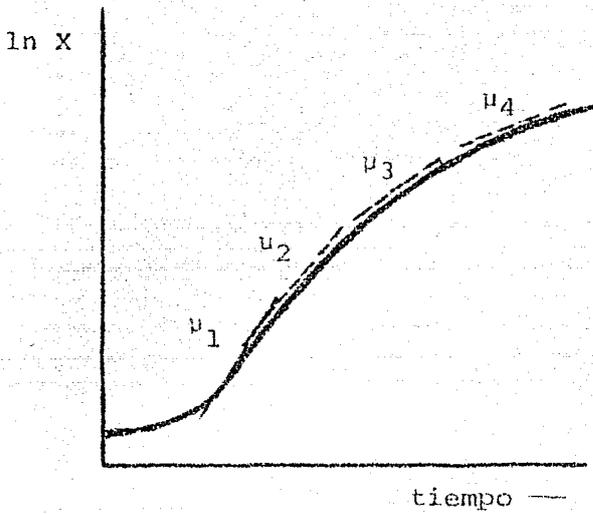


Figura 5. Crecimiento microbiano en presencia de varias fuentes de carbono y medio complejo, muestra varias velocidades de crecimiento.

11.1.7 - Crecimiento de microorganismo en relación a su suministro de energía.

Como ya se ha mencionado, el crecimiento microbiano - va estrechamente relacionado al consumo de algún nutriente en particular, y para lo cual se han desarrollado métodos - altamente sensibles para su determinación en comparación a los pocos estudios realizados sobre la relación que existe entre el crecimiento y la fuente de energía del medio. Uno de éstos estudios es el realizado por Monod el cual indica una relación directa entre el crecimiento (peso seco) y la cantidad de fuente de energía suministrada.

$$G = KG \quad (4)$$

donde:

G = peso seco del microorganismo dado en mcg/ml.

C = cantidad de fuente de carbono dado en mcg/ml.

K = constante de rendimiento en mcg de peso seco/mcg de sustrato.

Iguales resultados encuentra De Moss y cols. al trabajar con bacterias productoras de ácido láctico, las cuales obtienen energía para crecer por el catabolismo anaeróbico de los carbohidratos, concluyendo que muy poca glucosa fué asimilada y que casi fué usada exclusivamente como fuente de energía obteniendo una relación lineal entre el crecimiento y la cantidad de la fuente suministrada. Se ha observado que S. faecalis crece al doble que L. mesenteroides, efecto explicado por los experimentos de Heath, Hurwitz, Horecker & Ginsberg donde se encontró que L. mesenteroides fermenta la glucosa por la vía de las hexosas monofosfato y S. faecalis la fermenta por la ruta de la glicólisis, obteniendo una mol. de ATP y 2 moles de ATP por mol de glucosa respectivamente. Tomando como base éstos estudios, Bauchop & Elsdon (3) propusieron que el crecimiento de los microorganismos estaban relacionados a la cantidad de ATP producido de la fuente de energía y comprobando

después al encontrar que S. faecalis y S. cereviceae utilizan la ruta de la glicólisis y P. lindneri utilizan la ruta de Entner-Doudoroff para degradar la glucosa obteniendo 2 moles y 1 mol de ATP por mol de glucosa respectivamente. -- Ellos consideran adecuado expresar sus resultados como gramo de peso seco del microorganismo por mol de sustrato adicionado, llamado coeficiente de rendimiento molar, Y_s -- (s = sustrato). El rendimiento de ATP en un proceso metabólico se define como moles de ATP producido por mol de sustrato suministrado. En un proceso metabólico donde se conocen tanto el coeficiente de rendimiento molar Y_s y el rendimiento de ATP se puede determinar el peso seco del microorganismo producido/mol de ATP formado, ésta razón obtenida, Bauchop y Elsdén la llamaron Y_{ATP} .

$$Y_s = Y_{x/s} = \frac{\Delta x}{\Delta s} \quad (5)$$

$$Y'_{ATP} = \frac{\text{ATP formado}}{s} \quad (6)$$

$$Y_{ATP} = \frac{Y_{x/s}}{Y'_{ATP}} = \frac{Y_s}{Y'_{ATP}} = \frac{\text{g de células}}{\text{mol de ATP}} \quad (7)$$

donde:

x = G = mcg/ml, peso seco del microorganismo/mililitro

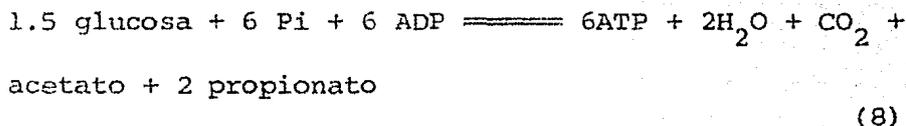
s = C = mcmol/ml, fuente de carbono/mililitro

Y = K = mcg/mcmol, coeficiente de rendimiento

La utilización del Y_{ATP} permite comparar directamente el crecimiento microbiano sobre los sustratos de diferente peso molecular. La utilización de Y_{ATP} es ventajoso si se desea relacionar el rendimiento de crecimiento a la cantidad de ATP que puede ser obtenido de la fuente de energía -- (40).

De ésta manera Bauchop y Elsdén reportan que los Y_{ATP} de los microorganismos estudiados se encuentran en un rango de 8.3 - 12.6 siendo un promedio de 10.5. De igual forma ellos estudiaron el crecimiento de P. pentosaceum -- encontrando un valor de Y_{ATP} de aproximadamente el doble -- del encontrado para S. faecalis y S. cereviceae y 4 veces mayor que el de P. linderi proponiendo que si el crecimiento de un microorganismo está en función del rendimiento de ATP entonces en su proceso catabólico produce 4 moles de ATP/mol de glucosa.

Efectivamente en el ciclo metabólico de las bacterias ácido propiónico, éstas producen 4 moles de ATP/mol de glucosa por la siguiente ecuación (16).



Todo lo anterior da paso a decir que el crecimiento -- microbiano está directamente relacionado a la cantidad de -- ATP producido por la degradación de la fuente de energía -- bajo condiciones anaeróbicas, y que en consecuencia muy poco carbono de ésta es incorporado a material celular y por lo tanto, es utilizado como fuente de energía.

En las fermentaciones anaeróbicas en medio complejo -- todos los ATP producidos vienen de la fosforilación a nivel sustrato.

En las fermentaciones aeróbicas, los ATP no vienen solo de la fosforilación a nivel sustrato sino en su mayor -- parte de la fosforilación oxidativa, eficiencia que no es -- conocida y así una considerable cantidad de la fuente de -- energía es utilizada para material celular (40).

II.2 Cinética de Fermentación

La cinética de fermentación describe el crecimiento y formación de producto por el microorganismo implicado, señalando no solo sus actividades en la fase logarítmica sino también las obtenidas en fase estacionaria. Se entiende -- por cinética, las velocidades de reacciones bioquímicas implicados en cada uno de los procesos; por fermentación, una serie de reacciones químicas catalizadas por sistemas enzimáticos que son producidos durante el crecimiento del microorganismo. Las principales velocidades de fermentación (velocidades instantáneas de cambio de concentración) que caracterizan su cinética, son: las relacionadas al crecimiento celular, al consumo de nutrientes y a la formación de -- producto (27).

Para el estudio de un proceso de fermentación se tiene que establecer la manera más conveniente de expresar las velocidades para seleccionar el proceso cuyo cambio en el -- tiempo sea significativo y directamente relacionado con el objetivo: medir la velocidad de fermentación. Las bases -- para expresar las velocidades de fermentación han sido propuestas por Gaden (2,14):

II.2.1 Velocidad volumétrica o velocidad de cambio de concentración con el tiempo, Q , sus unidades son: masa/unidad de tiempo por unidad de volumen = unidades de concentración/unidad de tiempo. En una fermentación por lote la velocidad volumétrica se estudia midiendo la pendiente de la curva concentración contra -- tiempo y con ellas conocer el comportamiento dinámico de la fermentación al construir la curva de velocidades volumétricas contra tiempo.

II.2.2 Velocidad específica, es la velocidad volumétrica -- dividida por la concentración celular en un tiempo -- definido, sus unidades son: masa/unidad de tiempo -- por unidad de masa celular. En el caso de velocidad específica de crecimiento (μ) sus unidades son: unidad de tiempo⁻¹ y se determina de la pendiente de --

una gráfica semilogarítmica de la concentración de masa celular contra el tiempo de fermentación y sus unidades son h^{-1} .

La velocidad volumétrica Q , depende de la concentración celular y es importante para la persona que dirija una planta de fermentación, pues describe la velocidad con que se sintetiza el producto o la demanda de material por unidad de capacidad de fermentador. La velocidad específica q , es independiente de la concentración celular y describe la efectividad de la célula para sintetizar producto o para utilizar material; esta velocidad es utilizada en estudios más básicos y que permitan comprender aún más las variables que afectan el proceso.

Matemáticamente cada velocidad de fermentación se describe de la siguiente forma:

Velocidad de crecimiento microbiano. La masa celular, puede aumentar sin un incremento en el número de células, sin embargo, el cambio o incremento de concentración celular con respecto al tiempo es proporcional a la concentración celular: (9,27,43).

$$\frac{dx}{dt} = \alpha x$$

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (9)$$

donde:

x = concentración celular en g/l.

t = tiempo en horas

μ = velocidad de crecimiento específico en hrs^{-1} .

$$\frac{dx}{x} = \mu dt \quad (10)$$

que no es más que el incremento de masa celular con el tiempo.

Integrando:

$$\int_{X_1}^{X_2} \frac{dx}{x} = \mu \int_{t_1}^{t_2} dt$$

$$\ln (X_2/X_1) = \mu (t_2 - t_1) \quad (11)$$

Si $t_1 = 0$

$$\ln (X_2/X_1) = \mu t_2$$

$$X_2 = e^{\mu t} X_1 \quad (12)$$

La ecuación (11) muestra que la velocidad de crecimiento específico se obtiene de la pendiente de una gráfica de $\ln X$ contra tiempo, cuya expresión matemática es:

$$\mu = \frac{\ln (X_2 - X_1)}{t_2 - t_1} \quad (13)$$

Si se desea conocer el tiempo que requiere el microorganismo para duplicarse se puede obtener de la ecuación (11) considerando que $\Delta t = t_d$, tiempo requerido para que $X_2 = 2X_1$:

$$t_d = \ln 2/\mu = 0.693/\mu \quad (14)$$

Velocidad de utilización de nutrientes y velocidad de formación de producto. Dependiendo de la regulación meta-

bólica el producto está relacionado al crecimiento y/o a la cantidad de masa celular a su vez, ambos están estrechamente relacionados al consumo de nutrientes. Esto queda mejor explicado en las siguientes expresiones matemáticas del balance de masas, para utilización de sustrato y formación de producto en una fermentación por lote, en donde no hay adición continua de sustrato ni eliminación de sustrato y de producto (9,43).

Utilización de sustrato:

Velocidad volumétrica, Q_s :

$$Q_s = - \frac{dS}{dt} = - \frac{\mu x}{Y_{x/s}} - \frac{q_p x}{Y_{p/s}} - m_x \quad (15)$$

Acumulación de sustrato = Crecimiento - Síntesis de producción - mantenimiento

Velocidad específica, q_s :

$$q_s = - \frac{1}{x} \frac{dS}{dt} = - \frac{\mu x}{Y_{x/s}} \frac{1}{x} - \frac{q_p x}{Y_{p/s}} \frac{1}{x} - m_x \frac{1}{x}$$

$$q_s = - \frac{\mu}{Y_{x/s}} - \frac{q_p}{Y_{p/s}} - m \quad (16)$$

donde:

q_p = velocidad específica de formación de producto

En éstas ecuaciones se ve realmente la interrelación del crecimiento, mantenimiento y formación de producto en base al consumo del sustrato.

Formación de producto:

La relación cinética del producto con el crecimiento - dependen del metabolismo celular, los más comunes son los - que describen la síntesis de producto durante el crecimiento; la producción cuando el crecimiento se ha detenido; y - un tercer patrón cinético que relaciona la formación de pro- ducto con el crecimiento, es cuando después de que el creci- miento ha comenzado el producto aparece y el crecimiento -- continúa.

La velocidad de formación para el producto relacionado al crecimiento (metabolito primario), está dado por la si- guiente expresión, velocidad volumétrica: Q_p :

$$\frac{dP}{dt} = \frac{\mu x}{Y_{p/x}} \quad (17)$$

donde:

$Y_{p/x}$ = gramo de producto por gramo de célula

Su velocidad específica, q_p :

$$\frac{1}{x} \frac{dP}{dt} = \frac{x}{Y_{p/x}} \frac{1}{x}$$

$$q_p = \frac{\mu}{Y_{p/x}} \quad (18)$$

La velocidad de formación para el producto no relacio- nado directamente al crecimiento (metabolito secundario), está dado por la siguiente expresión, velocidad volumétrica: Q_p

$$\frac{dP}{dt} = \frac{dP}{dS} mx \quad (19)$$

Su velocidad específica, q_p :

$$\frac{1}{x} \frac{dP}{dt} = \frac{dP}{dS} mx \frac{1}{x}$$

$$q_p = Y_{p/s} m \quad (20)$$

donde:

$Y_{p/s}$ = gramo de producto por gramo de sustrato.

Esta velocidad específica es la forma más usual de expresar y comparar los datos porque el efecto de la concentración celular se elimina.

La velocidad de formación de producto donde está semi-asociado al crecimiento descrito por Luedeking and Piret -- (26), está dado por la siguiente expresión, velocidad volumétrica, Q_p :

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dx}{dt} + \beta x \quad (21)$$

Su velocidad específica, q_p :

$$\frac{1}{x} \frac{dP}{dt} = \alpha \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} + \beta$$

$$q_p = \alpha \mu + \beta \quad (22)$$

donde:

$$\alpha = Y_{p/s} / Y_{x/s}$$

$$\beta = Y_{p/s}^m$$

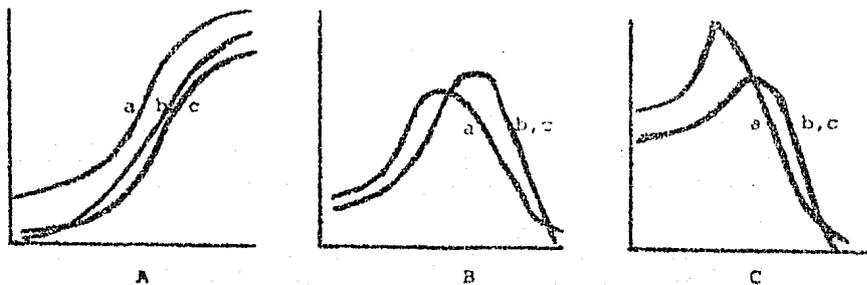
Como se puede observar ésta ecuación tiene un término asociado al crecimiento y el otro no asociado al crecimiento.

II. 3 - Clasificación de las Fermentaciones

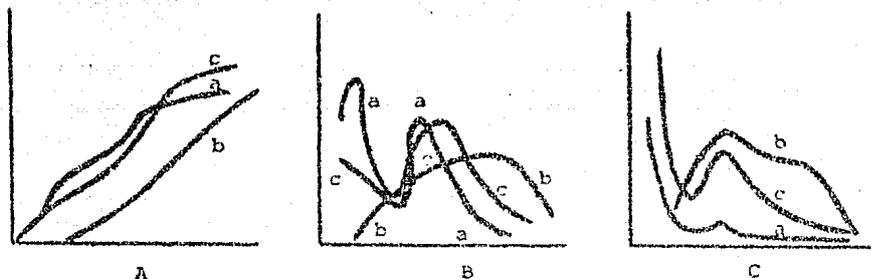
Se han realizado varias clasificaciones cinéticas para las fermentaciones (Gale, 1947; Maxon, 1955; Deindorfer, -- 1950; Stodole, 1958; Wallen, 1959), pero la clasificación más usada es el modelo esquemático realizado por Gaden (14), cuya ventaja principal es lo tecnológico; además, coincide con la clasificación general de los modelos de velocidad de fermentación ya sugeridos. El las clasifica en tres grupos designados como tipo I, II, y III, los cuáles difieren en sus modelos de velocidad y en su cambio de energía libre -- total (27) (Figura 6).

Fermentación Tipo I. El producto principal obtenido es un producto catabólico que aparece como resultado del metabolismo energético. Frecuentemente el producto deseado resulta de la oxidación directa del carbohidrato principal. Es un tipo de reacción de disimilación simple con liberación de energía, ΔF . El producto obtenido de ésta forma está estrechamente relacionado al crecimiento y al consumo de nutrientes. Este comportamiento está regido por las ecuaciones (17 y 18) y su representación gráfica en la figura 6.

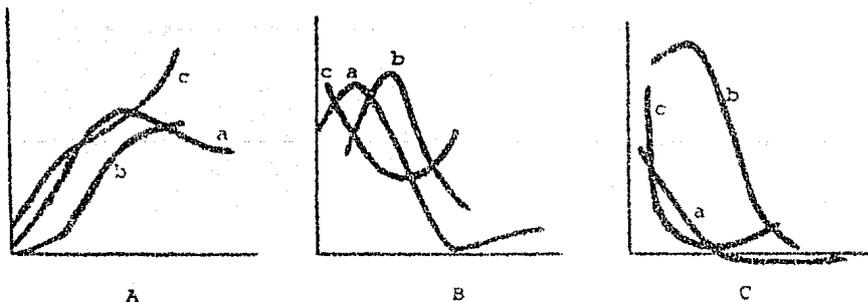
Fermentación Tipo II. El producto principal es un intermediario, se obtiene del metabolismo energético pero de



Fermentación Tipo I



Fermentación Tipo II



Fermentación Tipo III

Figura 6. Clasificación de las fermentaciones, modelo esquemático de Gaden. A) Curvas concentración contra tiempo; B) Curvas velocidades volumétricas contra tiempo; C) Curvas velocidades específicas contra tiempo. a) Crecimiento microbiano; b) Producto; c) Sustrato consumido.

Adaptado de Gaden (14).

manera indirecta, el modelo de reacción de disimilación es complejo con liberación de energía, ΔF^- . Este comportamiento está regido por las ecuaciones (21 y 22) y su representación gráfica en la figura 6.

Fermentación Tipo III. El producto obtenido es complejo y se da como resultado de la actividad biosintética de la célula, con una energía libre total ΔF^+ , el producto es elaborado independientemente por la célula llamándole metabolito secundario. La formación del producto deseado alcanza un máximo de producción cuando la actividad metabólica de crecimiento de la célula se ha detenido. Este comportamiento está regido por las ecuaciones (19 y 20) y su representación gráfica en la figura 6. Como ejemplos de productos no relacionados al crecimiento se tiene a la mayoría de los antibióticos, algunas vitaminas y toxinas microbianas.

II.4 - Productividad

La productividad es expresada como gramos de producto (células ó algún metabolito) por litro por hora y es la medida total de un proceso fermentativo. Es necesario calcular la productividad sobre el tiempo total del proceso, éste tiempo incluye: tiempo requerido para desocupar el fermentador de la corrida previa y su limpieza (t_L); tiempo requerido para preparación y esterilización del medio nuevo (t_E); y el tiempo que dura la fermentación. Este ciclo fermentativo es representado en la Figura 7. La productividad total está representada por la pendiente de una línea recta que parte del origen al punto final de la fermentación. La productividad máxima es dada por una línea recta tangente a la curva de crecimiento o producto partiendo del origen. El tiempo total de la fermentación puede ser calculada por la siguiente ecuación (43):

$$t = \frac{1}{\mu_m} \ln \frac{X_f}{X_0} + t_L + t_E + t_{lag} \quad (23)$$

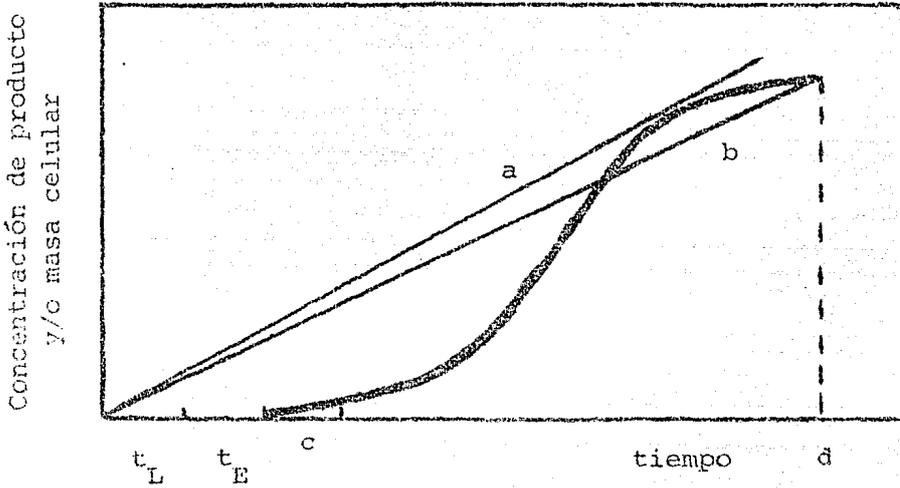


Figura 7. Concentración de producto y/o masa celular contra tiempo. Representación de la productividad en una fermentación por lote (batch); t_L y t_E tiempo muerto de la fermentación, a) productividad máxima, b) productividad total, c) tiempo lag, d) fin de la fermentación.

donde:

- t_{lag} = tiempo lag.
- X_f = concentración final de producto o celular.
- X_o = concentración inicial celular o de producto.
- μ_m = velocidad de crecimiento máximo.

Por consiguiente la productividad total está dada por la ecuación:

$$P = \frac{X_f}{\frac{1}{\mu_m} \ln \frac{X_f}{X_o} + t_L + t_E + t_{lag}} \quad (24)$$

Con ésta ecuación, es posible determinar los efectos de los cambios del proceso sobre la productividad total. Pero para fines prácticos se puede obtener la productividad tomando en cuenta solo el tiempo de fermentación, como una velocidad volumétrica.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los experimentos realizados hasta ahora dentro del proyecto marcan varios caminos a seguir, uno de ellos es tratar de esclarecer, porque el microorganismo P. shermanii presenta diferentes velocidades de crecimiento. Esto, sugiere la posibilidad de que el microorganismo se esté alimentando de diferentes fuentes de energía existentes en el medio tales como azúcares, ácido láctico y cítrico.

Como apoyo de esto encontramos que en los experimentos ya realizados (32), bajo condiciones anaeróbicas el crecimiento se detiene cuando se agotan los azúcares metabolizables, posteriormente al cambiar a aerobiosis el crecimiento se reanuda debido al consumo de otra fuente de carbono (posiblemente ácido cítrico). Tales hechos sugieren que el microorganismo consume los azúcares y ácido láctico en condiciones anaeróbicas y posiblemente los citratos bajo condiciones aeróbicas.

En base a lo expuesto, el presente trabajo de tesis -- tratará de elucidar tales dudas siguiendo la cinética de -- crecimiento de P. shermanii en el medio de cultivo conteniendo el "Jugo Cocido de Limón".

IV. OBJETIVO E HIPOTESIS

Objetivo

Determinar la cinética de crecimiento del microorganismo P. shermanii en el medio de JCL complementado con licor de maíz como fuente de nitrógeno bajo condiciones anaeróbicas, aeróbicas y anaeróbicas-aeróbicas. Hacer una comparación con el comportamiento en un medio convencional de glucosa (medio control) bajo las mismas condiciones con el fin de contar con los elementos básicos necesarios que permitan incrementar en un momento determinado la producción de vitamina B₁₂.

Hipótesis

El comportamiento presentado hasta ahora en el JCL del microorganismo P. shermanii ATCC 13673 se debe a la utilización de azúcares, ácido láctico y ácido cítrico.

V. MATERIALES Y METODOS

V. El desarrollo de la Parte Experimental de este Trabajo se esquematiza en la Figura 8.

V.1 Microorganismo, reactivación y conservación

El microorganismo utilizado fue Propionibacterium shermanii ATCC 13673 seleccionado en estudios anteriores (32).

El microorganismo se reactivó en un medio de lactato-levadura de Kreb's (21). Para su reactivación se utilizó una botella de dilución de 130 ml conteniendo medio de Kreb's líquido, incubando a 29°C por 48 hr en condiciones de anaerobiosis, las cuales se lograron manteniendo la botella totalmente llena.

Se conservó en tubos roscados con doble tapón, de hule y de rosca, conteniendo 10 ml del medio lactato-levadura de Kreb's. A éste medio se le complementó con 4 ml de solución al 0.025% de rezasurina y 0.5 g de cisteína por litro de medio, y burbujeado con nitrógeno gaseoso para proporcionar las condiciones de anaerobiosis. El procedimiento que siguió fué el de inocular 1 ml de la suspensión bacteriana recientemente reactivada a los 10 ml del medio anterior, se protegieron de la luz, se incubaron a 29°C durante 48 hr y finalmente almacenaron a 4°C.

V.2 Preparación de los medios de fermentación

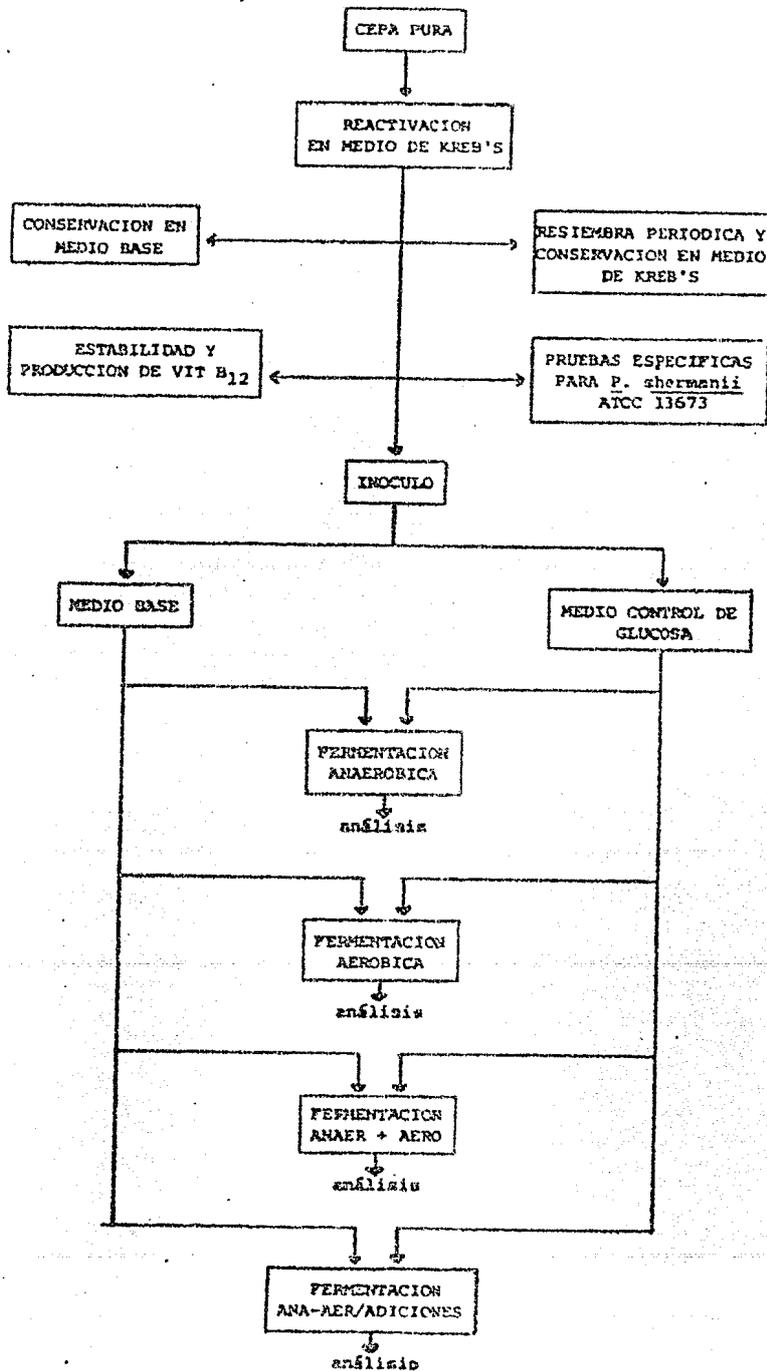


Figura 8. Diagrama de bloques del desarrollo experimental.

Los medios de fermentación utilizados fueron:

MEDIO CONTROL

Glucosa	32.8 g/l ⁺
Nitrógeno (agua de cocimiento de maíz)	3.5 g/l
CoCl ₂	5.0 ppm (6)
H ₂ O destilada	hasta 1.0l
pH	7.0

+ A menos que otra cosa se especifique

MEDIO BASE

Jugo Cocido de Limón (JCL)	500 ml/l
Nitrógeno (agua de cocimiento de maíz)	3.5 g/l
CoCl ₂	5.0 ppm (6)
H ₂ O destilada	hasta 1.0l
pH	7.0

El Jugo Cocido de Limón almacenado a 4°C durante su uso, fué filtrado inicialmente para eliminar semillas y pulpa utilizando papel filtro de fibra de vidrio Whatman y se ajustó el pH con hidróxido de sodio. Al agua de cocimiento de maíz se le ajustó el pH con hidróxido de amonio.

La fuente de carbono y la fuente de nitrógeno de los medios para los experimentos a nivel matraz fueron esterilizados por separado (a menos que otra cosa se especifique) y agregados asépticamente. La esterilización se llevó a cabo a 20 libras de presión por 15 minutos, eliminándose los sólidos formados por decantación. En el caso para los medios utilizados en las transferencias e inóculos éstos sólidos fueron eliminados por filtración utilizando una membrana -- millipore de 0.45 micras en condiciones asépticas. El cloruro de cobalto estéril se adicionó antes de inocular los medios.

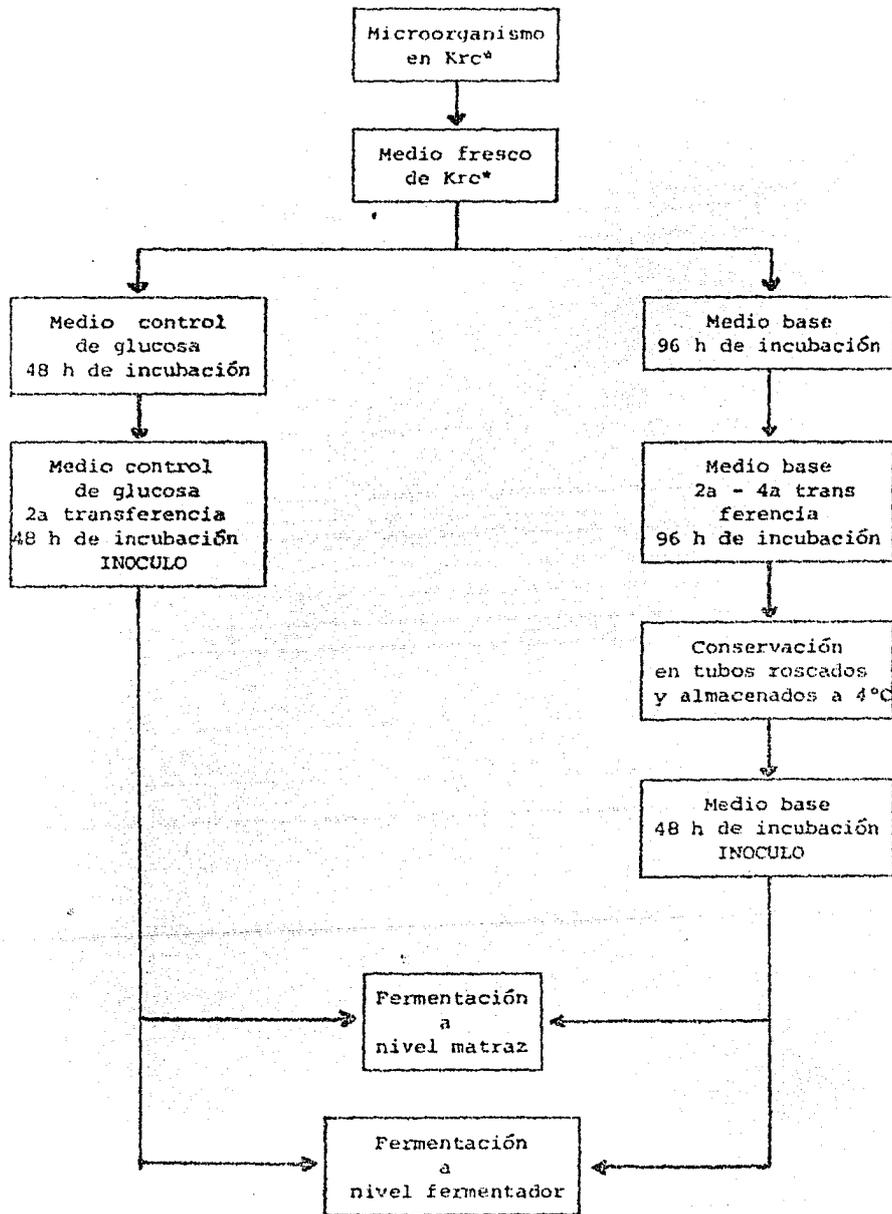
V.3 Preparación del Inóculo

El microorganismo se adaptó al medio correspondiente de acuerdo a la Figura 8A, partiendo del microorganismo conservado en medio de Kreb's-rezasurina-cisteína (Krc). El inóculo para las fermentaciones se prepararon de acuerdo a la Figura 8A. Incubando a 29°C con agitación de 125 rpm en una agitadora rotatoria de 1.5 cm de radio de giro y bajo condiciones de anaerobiosis. Para mantener las condiciones de anaerobiosis se utilizaron 200 ml de cada uno de los medios en matraces Erlen Meyer de 250 ml.

V.4 Condiciones de Fermentación

Las fermentaciones* se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones:

- a) Ciento sesenta y ocho h bajo condiciones anaeróbicas
- b) Ciento sesenta y ocho h bajo condiciones aeróbicas
- c) Sesenta y dos h bajo condiciones anaeróbicas y 96 h bajo condiciones aeróbicas
- d) Setenta y dos h bajo condiciones anaeróbicas y 96 h bajo condiciones aeróbicas con adiciones de fuente -- de carbono correspondiente cada 24 h durante las primeras 72 h de la fermentación.



*Kcr = medio de Kreb's con resazurina y cisteína.

Figura 8A. Preparación del inóculo, en medio control de glucosa y en medio a base de jugo cocido de limón. a) se añadió 1 ml; b) Se inóculo al 5%; c) Se inóculo al 10%; d) A tubos roscados, cada uno con 20 ml de suspensión bacteriana; e) Se inóculo a una densidad óptica (D.O.) = 1 - (a tiempo cero).

Las fermentaciones a nivel matraz bajo condiciones anaeróbicas se llevaron a cabo de la misma forma ya mencionada, mientras que bajo condiciones aeróbicas en el matraz de 250 ml se disminuyó el medio a 130 ml. La agitación fue de 125 rpm en la agitadora ya descrita, la temperatura se mantuvo a 29°C y el pH fue determinado con un potenciómetro Sargent Welch modelo Ls ajustado con hidróxido de amonio concentrado y ácido clorhídrico al 20% para mantenerlo en un rango de pH de 6.5-7.5.

Las condiciones de fermentación empleadas a nivel fermentador se resumen en la Tabla III. Para estas fermentaciones se empleó una unidad de fermentación (jarra de 5 litros) modelo 19 New Brunswick Scientific Co., instrumentado, Figura 9. El pH se registró y controló automáticamente, utilizando soluciones de hidróxido de sodio y ácido clorhídrico al 20% para mantener un pH de 7.

V.5 Tratamiento de la Muestra Fermentada

Las células fueron separadas del caldo, centrifugando las muestras en una centrífuga Sorvall/Dupont RC5 a 10,000 rpm por 20 minutos a 4°C. Las determinaciones analíticas se realizaron en el caldo centrifugado y la cuantificación de la vitamina B₁₂ en el paquete celular.

V.6 Determinación de Crecimiento Microbiano**

El crecimiento microbiano fue determinado por densidad óptica (D.O.) a 540 nm en un fotocolorímetro Spectronic 20 Bausch & Lomb filtrando un volumen determinado de muestra en un sistema millipore con membrana de 0.45 micras, lavando células con agua destilada y resuspendiéndolas en una dilución adecuada en agua destilada. La D.O. fue referida

* Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

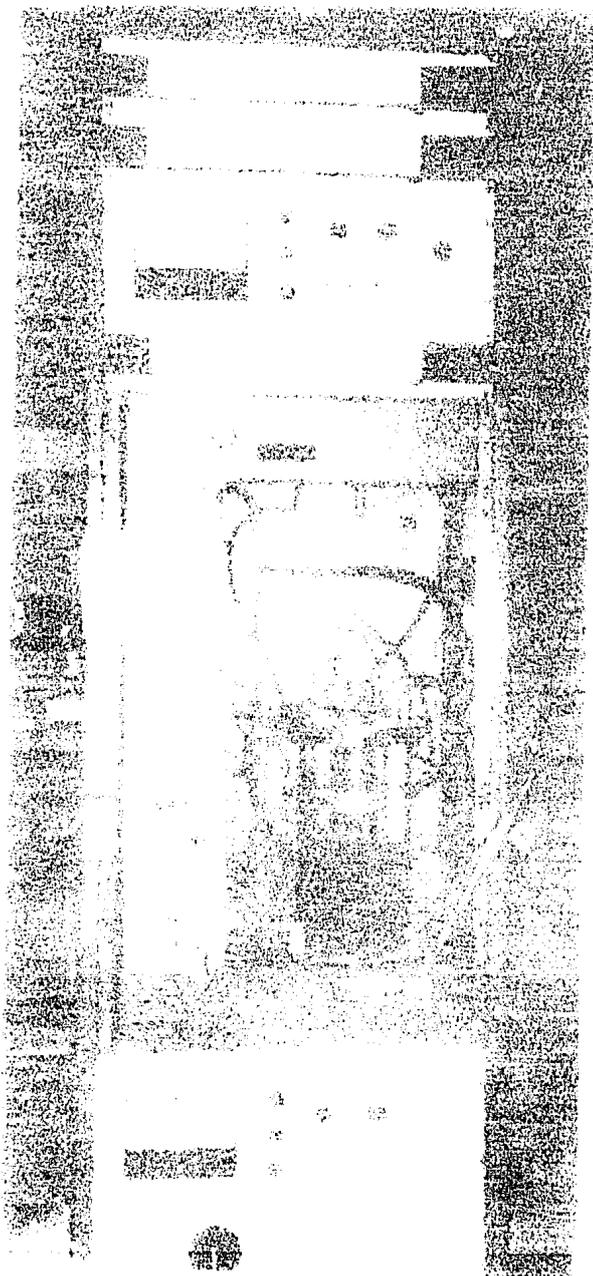
**Las determinaciones del crecimiento microbiano se realizan por triplicado.

TABLA III

CONDICIONES DE FERMENTACION A NIVEL FERMENTADOR BAJO DIFERENTES
CONDICIONES DE AERACION

Condiciones de fermentación	Anaerobiosis	Aerobiosis	Ana—Aero	
			Normal	Adición*
Volumen de fermentación (l)	3.5	3.5	3.5	3.5
Flujo de aire (ml/min)	35	350	35-350	35-350
Agitación (rpm)	250	250	250	250
Temperatura (°C)	29	29	29	29
pH	7.0	7.0	7.0	7.0

*Se hicieron adiciones de 1.5% de fuente de carbono cada 24 h durante - las primeras 72 h de fermentación.



116 8 UNIDAD DE FERMENTACION MODELO 19 NEW
BRUNSWICK SCIENTIFIC CO INSTRUMENTA-
00

a una curva estándar (D.O. contra peso seco), Figuras 10 y 11.

V.7 Métodos Analíticos

Todos los análisis se realizaron por duplicado, excepto la determinación de la vitamina B₁₂, ácido cítrico, láctico y succínico que se hicieron por ¹²tetraplicado.

- Azúcares reductores totales, método de Ting (41), Figura 12.
- Nitrógeno total y no dializable, método de Kjeldalh -- (28). Las diálisis de las muestras se llevaron a cabo en agua destilada por 24 h con cambio de agua a las 12 h usando un tubo de diálisis Thomas de 1/4 de pulgada. El nitrógeno dializable se calculó por diferencia.
- Vitamina B₁₂ en células, método de Fisher (12).
- Acido cítrico, succínico y láctico, método de cromatografía de gases.

La muestra libre de células, 0.3 ml, se colocó en un reactival de 5 ml, se acidificó con una gota de ácido clorhídrico al 20% y se secó a 60°C a vacío, se dejó enfriar, se adicionó 0.5 ml de BF₃-Metanol al 14% (Pierce Chemical, Co.) y se incubó a temperatura ambiente toda la noche con agitación, se agregó 0.87 ml de sulfato de amonio al 33% y un ml de clorofomo, se mezcló y centrifugó a 5,700 rpm durante 10 minutos. Se inyectó 1 microlitro de la fase clorofórmica a un cromatógrafo Varian modelo 3700 equipado con un registrador Varian modelo 9176, la columna utilizada fue de 2 metros por 1/8" empacada con 3% de OV-17 Cromosorb WHP80-100 de malla. Las temperaturas del detector de ionización de flama y del inyector fueron de 220°C y 195°C respectivamente. El programa de temperatura fué de 100-185°C a 20°/minuto, la temperatura final se mantuvo por 3 minutos. Los gases acarreadores fueron N₂ e H₂ 30 cm³/minuto y aire a 350 cm³/minuto. Las mediciones fueron realizadas a una atenua-

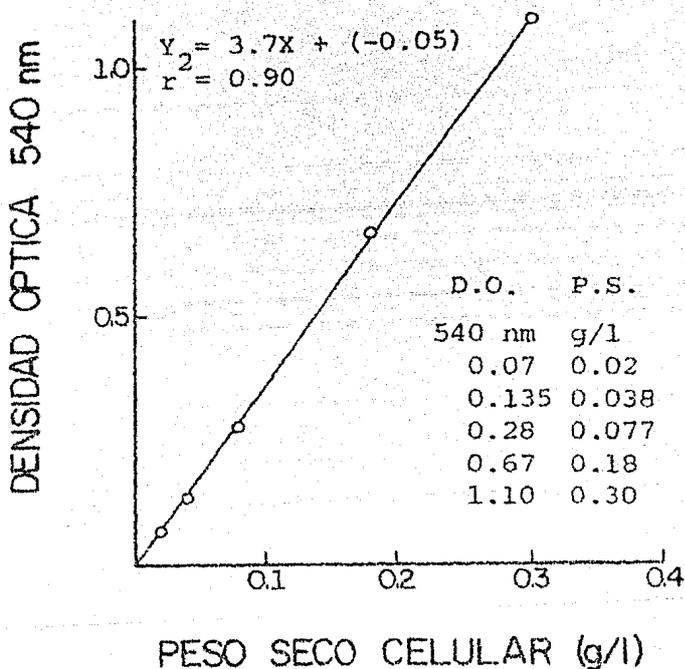


Figura 10. Curva estandar, D.O. vs peso seco de Propionibacterium shermanii ATCC 13673 en un medio a base de jugo cocido de limón. r^2 = coeficiente de regresión lineal.

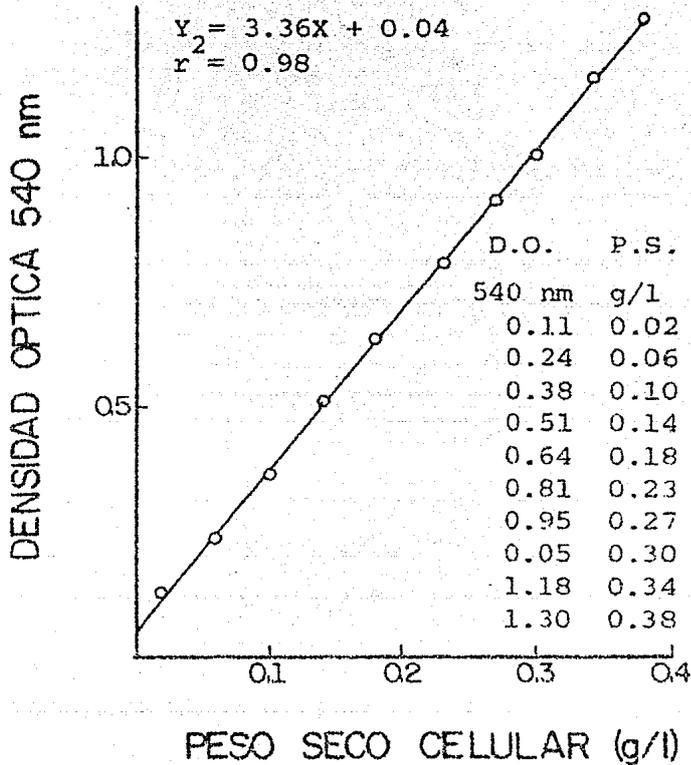


Figura 11. Curva estandar, D.O. vs peso seco de Propionibacterium shermanii -- ATCC 13673 en un medio control de glucosa.

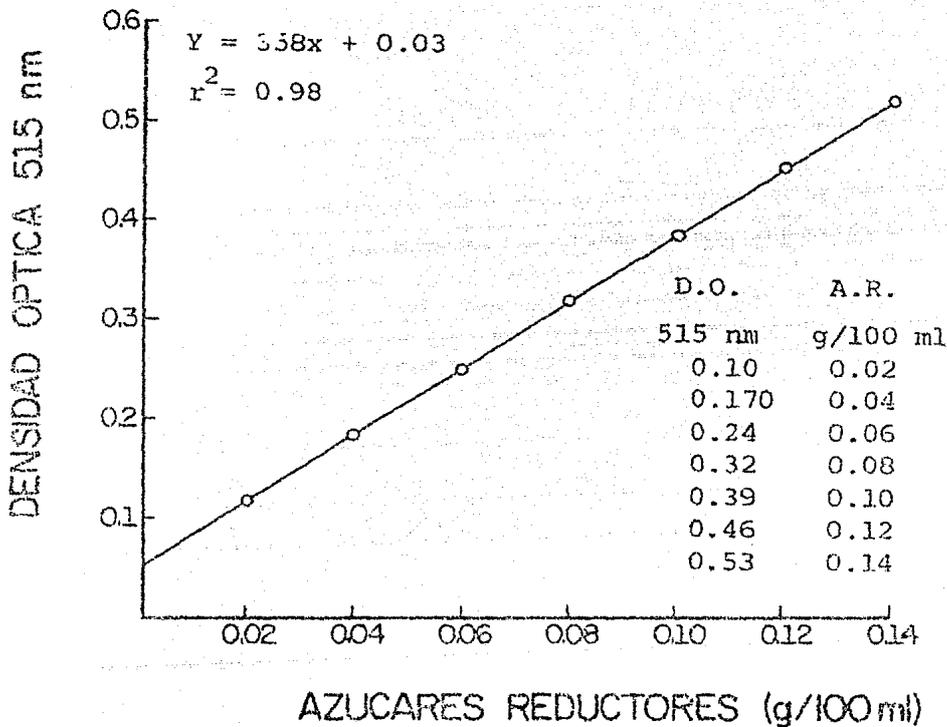


Figura 12. Curva estandar, D.O. vs concentración de azúcares reductores totales.

ción de 8 y un rango de 10^{-9} .

Los ácidos: cítrico, succínico y láctico fueron identificados y cuantificados comparando el tiempo de retención y la altura del pico con las obtenidas por la curva estándar de los ácidos puros (Figuras 13, 14, 15).

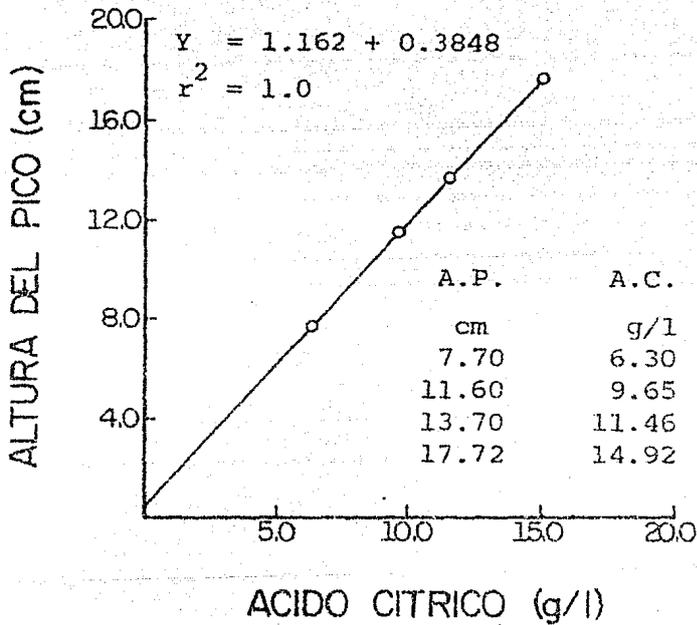


Figura 13. Curva estandar, altura del pico vs concentración de ácido cítrico.

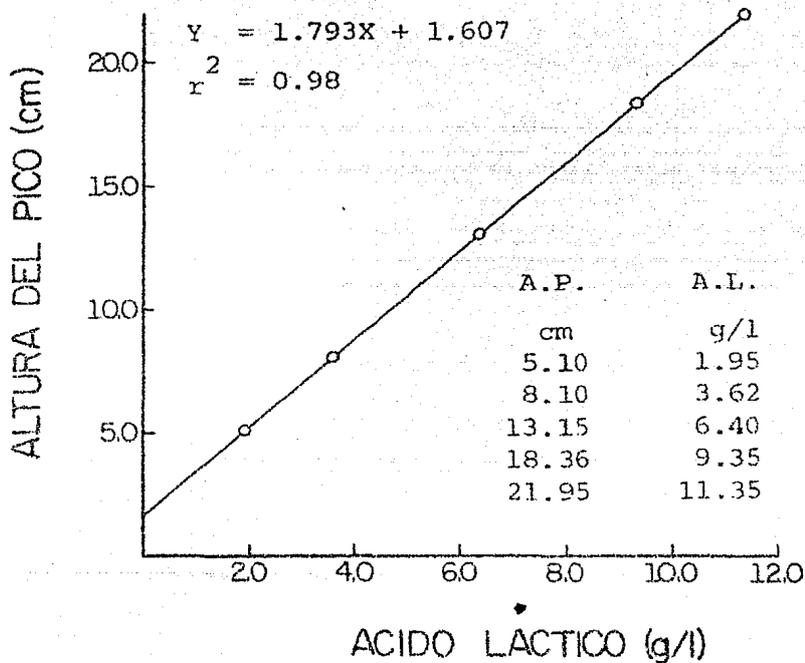


Figura 14 Curva estandar, altura del pico vs concentración de ácido láctico.

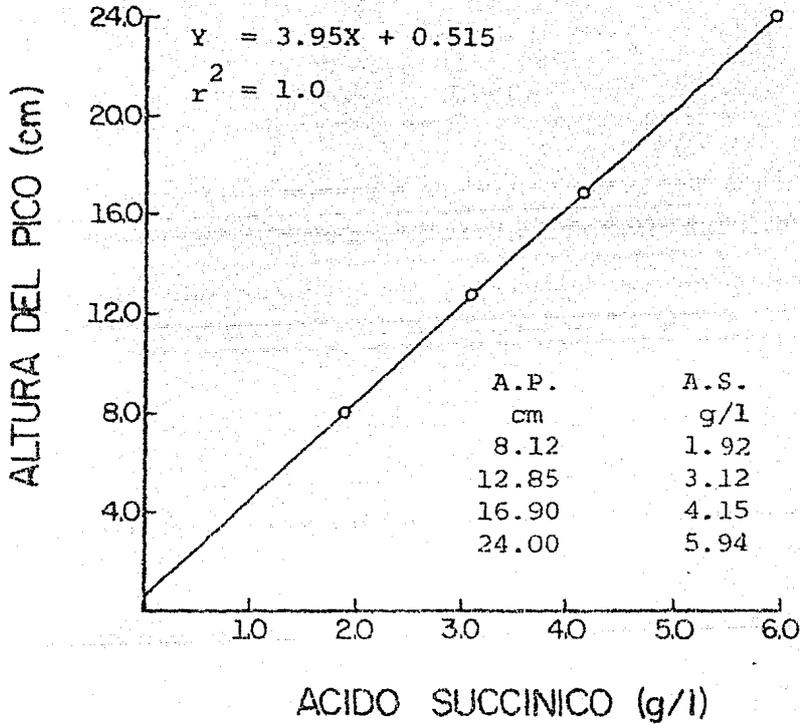


Figura 15. Curva estandar, altura del pico vs concentración de ácido succínico.

VI. RESULTADOS Y DISCUSION

VI.1 - Pruebas Específicas para P. shermanii ATCC 13673

En ésta sección se verificaron algunas pruebas específicas para P. shermanii ATCC 13673.

Según la bibliografía (4), P. shermanii se encuentra clasificado de la siguiente forma:

familia	Propionibacteriáceas.
género	Propionibacterium.
especie	Propionibacterium freudenreichii
subespecie	Propionibacterium shermanii

Las propionibacterias son bacterias gram positivas, catalasa positiva, no reducen nitratos (4,15), no esporulan, no son móviles, son anaerobias facultativas (4,15). Generalmente pleomórficas, pueden presentar formas difteroidal, cocoide, elongadas, las células generalmente se agrupan en pares, en configuraciones "V" o "Y", en cadenas cortas y -- también se presentan solas (4,15). Algunas de éstas especies crecen mejor en condiciones totalmente anaeróbicas, -- otras en condiciones aeróbicas (4,18) y en el caso de -- P. shermanii, es un microorganismo microaerofílico (43).

Las propionibacterias presentan colonias blancas, rojas, amarillas, naranjas (4). Sus requerimientos nutricionales son complejos (19) y el crecimiento es irregular (36).

Las pruebas realizadas a P. shermanii ATCC 13673 fueron: gram, catalasa (25), reducción de nitratos (8,25), forma de colonia, color, tamaño y consistencia. En las dos primeras pruebas se creció al microorganismo en un medio de Kreb's líquido y para la tercera este mismo medio fue completado con 0.5% de nitrato de potasio. En todas las pruebas, se creció al microorganismo tanto en condiciones anaeróbicas como aeróbicas en medio de Kreb's líquido y sólido (con 1.5% de bactoagar) respectivamente. Las condiciones anaeróbicas en placa, se obtuvieron en una jarra anaeróbica con atmósfera de CO₂. En todas las condiciones, el microorganismo se incubó a 29°C por 48 h partiendo de un cultivo aeróbico. Para los medios líquidos, se utilizó una agitación de 125 rpm. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla IV.

TABLA IV

PROPIEDADES ESPECIFICAS PARA P. shermanii ATCC 13673
BAJO CONDICIONES ANAEROBICAS Y AEROBICAS

Característica	Condiciones de aeración		
	Anaerobiosis	Aerobiosis	
Forma	redonda convexa	redonda convexa	En medio sólido
Color	colonias blancas	colonias blancas	
Tamaño	2.5 mm	2.5 mm	
Consistencia	cremosa lisa	cremosa lisa	En medio líquido
Movilidad	-	-	
Catalasa	+	+	
Reducción de nitratos	+	+	
Gram	+	+	

La Tabla IV muestra que bajo condiciones anaeróbicas - los resultados van de acuerdo con lo reportado por De Vries y Bergey (10,4) excepto la reducción de nitratos. El crecimiento bajo condiciones aeróbicas en placa fué totalmente inesperado (Tabla IV), puesto que la alta tensión de oxígeno inhibe el crecimiento aunque el microorganismo es capaz de crecer en medios líquidos aereados (33). Si se considera que el inóculo provino de un medio aereado, éstos resultados indican una adaptación del microorganismo a la presencia de oxígeno.

VI.2 - Pruebas de Estabilidad y Producción de Vitamina B₁₂ en P. shermanii Bajo condiciones prolongadas de Aeración.

Al observar que P. shermanii creció bajo condiciones aeróbicas se planteó determinar la estabilidad física y bioquímica del microorganismo bajo condiciones prolongadas de aereación incluyendo producción de vitamina B₁₂.

Utilizando un inóculo aeróbico del 5% se llevó a cabo la fermentación por 21 días bajo condiciones aeróbicas a nivel matraz. A los 3, 8, y 21 días se le realizaron las pruebas físicas y bioquímicas. Los resultados se resumen en las Tablas V y VI. Al microscopio, las formas de los microorganismos de las tres cepas son muy similares e incluyen a la forma presentada por la cepa original de P. shermanii (Figura 16).

Las condiciones prolongadas de aereación provocaron que P. shermanii se manifestara presentando diferente pigmentación (Tabla V) y que la colonia blanca perdiera la capacidad de reducir nitratos (Tabla VI). Una posible explicación del comportamiento a éstas condiciones de aereación pudiera ser la presentada por Pritchard (33), en donde la adaptación a altas presiones de oxígeno es debido a la selección de genotipos facultativos o aerotolerantes.

TABLA V

EXPRESION FENOTIPICA DE
P. shermanii BAJO CONDI
CIONES PROLONGADAS DE -
AERACION

	Días		
Colonia	3	8	21
B Blanca	+	+	+
A Amarilla		+	+
R Roja			+

Para determinar la capacidad productora de vitamina --
B₁₂ se aisló cada microorganismo y se realizaron fermenta--
ciones en un medio con glucosa (control), y otro con jugo -
cocido de limón a nivel matraz, bajo las condiciones anota--
das en materiales y métodos. Durante las fermentaciones se
ajustó el pH para mantenerlo entre 6.5 y 7.5 y se determinó
vitamina B₁₂ al final de las mismas. Los resultados se re--
sumen en la Tabla VII.

TABLA VI

PRUEBAS FISICAS Y BIOQUIMICA DE LAS COLONIAS
AISLADAS DE P. shermanii

Característica	Colonias		
	B	A	R
Forma	redonda convexa	redonda convexa	redonda convexa
Color	blanca	amarilla	roja
Tamaño	2.5 cm	3.0 mm	1.5 mm
Consistencia	cremosa lisa	cremosa lisa	cremosa lisa
Movilidad	-	-	-
Catalasa	+	+	+
Reducción de nitratos	-	+	+
Gram	+	+	+

TABLA VII

DETERMINACION DE VITAMINA B₁₂ AL FINAL DE LAS
FERMENTACIONES EN UN MEDIO CON GLUCOSA Y EN
OTRO CON JUGO COCIDO DE LIMON

Colonias	Vitamina B ₁₂ (µg/l)	
	en glucosa	en jugo cocido de limón

B	0.000	0.000
A	0.000	0.000
R	0.000	0.000

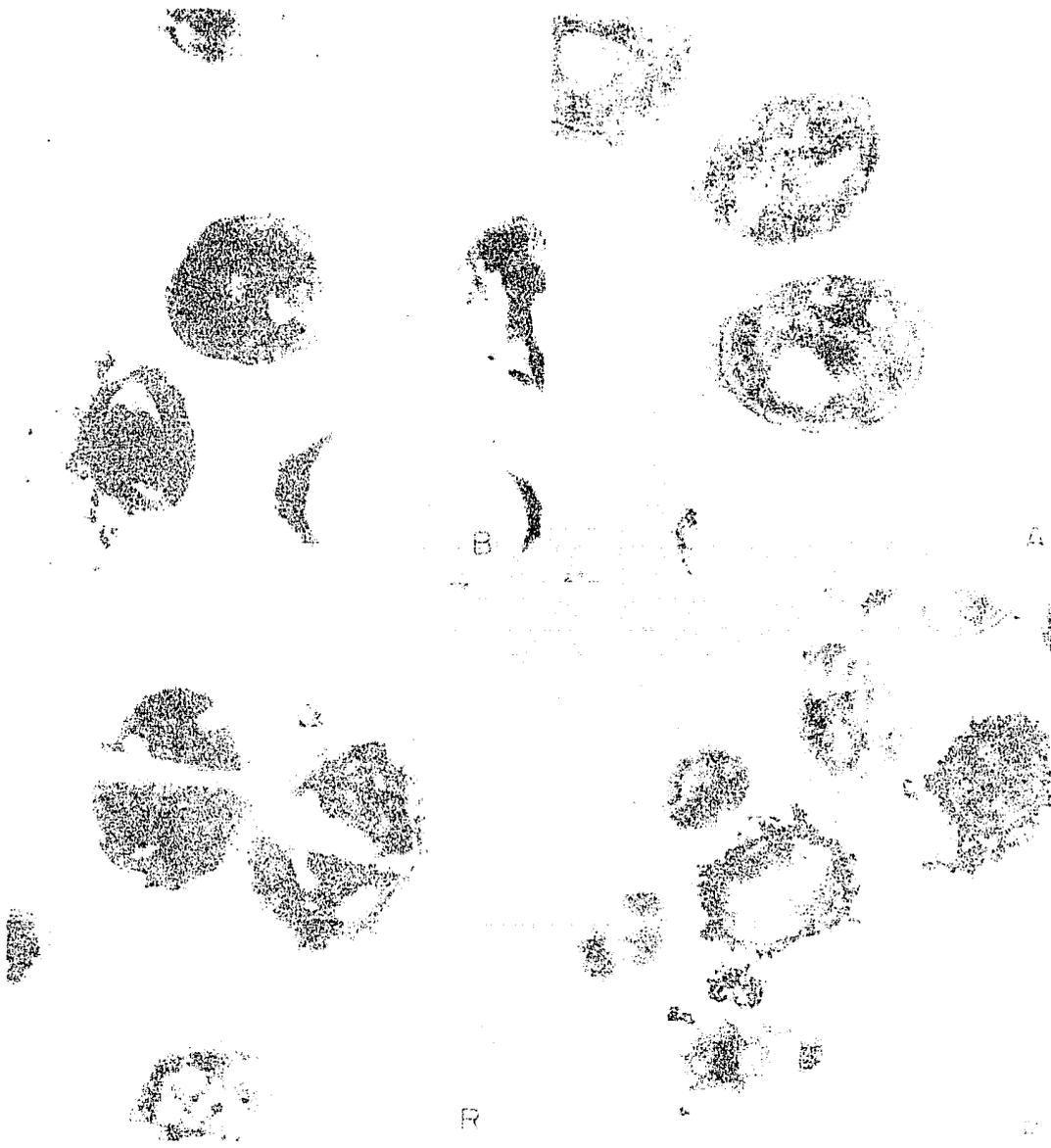


FIG. 16 MICROGRAFIA ELECTRONICA DE *P. shermanii* ATCC 13673 BAJO CONDICIONES PROLONGADAS DE AERACION; B, 3 días; A, 8 días; R, 21 días y P, cepa original.

Los resultados muestran falta de capacidad productora de vitamina B₁₂ en las 3 cepas, posiblemente debido a las condiciones de aislamiento de éstas. Por otro lado, al final de las fermentaciones, las células amarillas y las rojas en ambos medios de cultivo reversionaron a la cepa original (blanca). Más investigación a éste respecto deberá efectuarse para determinar cuales son las condiciones de óxido-reducción del inóculo óptimas en la síntesis de vitamina B₁₂. Debido a éstos resultados se decidió reactivar un liofilizado de P. shermanii ATCC 13673 de la forma como se señala en materiales y métodos creciéndose el inóculo de acuerdo a lo reportado por Pérez M. (31) para evitar que el microorganismo perdiera la capacidad productora de vitamina B₁₂.

VI. 3 - Pruebas Preliminares

En éste bloque de experimentos, las fermentaciones fueron llevadas a cabo a nivel matraz bajo las condiciones anaeróbicas-aeróbicas ya establecidas en materiales y métodos. Durante éstas se fué ajustando el pH para mantenerlo entre un rango de 6.5 - 7.5 determinándose azúcares reductores y nitrógeno total al principio y al final de la fermentación así como de vitamina B₁₂ al final de la misma.

a) Se realizaron fermentaciones utilizando por separado y con las mismas cantidades los constituyentes del medio base: agua de cocimiento de maíz (70 ml/l) con 5 ppm de cloruro de cobalto (6), y jugo cocido de limón (500 ml/l) con 5 ppm de cloruro de cobalto (6), para determinar cuanto contribuían cada una de éstas fuentes complejas al crecimiento y a la producción de vitamina B₁₂. Los resultados encontrados se resumen en la Tabla VIII.

b) Se llevaron a cabo fermentaciones en un medio control de glucosa (100 g/l, 70 ml/l de agua de cocimiento de maíz y 5 ppm de cloruro de cobalto), y un medio con jugo cocido de limón esterilizando los constituyentes de los me-

TABLA VIII

DETERMINACION DE GLUCOSA, NITROGENO Y VITAMINA B₁₂ EN LAS FERMENTACIONES UTILIZANDO AGUA DE COCIMIENTO DE MAIZ-CLORURO DE COBALTO (ACM) Y JUGO COCIDO DE LIMON-CLORURO DE COBALTO (JCL).

	Crecimiento	Azúcares red. (g/l)		Nitrógeno tot. (g/l)		Vitamina B ₁₂ (mcg/l)
		inicial	final	inicial	final	final
ACM	++	6.65	6.65	5.05	4.52	1052.60
JCL	+	9.67	8.36	0.59	0.58	0.00*

* Debido a la baja concentración celular no fué posible determinar vitamina B₁₂ por el método empleado.

dios por separado y agregados asépticamente, con el fin de verificar si el microorganismo crece y produce vitamina B₁₂ en un medio a base de jugo cocido de limón (32). Los resultados se presentan en la Tabla IX.

c) Las fermentaciones fueron llevadas a cabo en medio control de glucosa (100 g/l de glucosa, 70 ml/l de agua de cocimiento de maíz y 5 ppm de cloruro de cobalto), esterilizando juntos los constituyentes del medio con el objeto de determinar como afecta éste tratamiento térmico al crecimiento y a la producción de vitamina B₁₂. La Tabla X muestra los resultados encontrados.

En la Tabla VIII se puede observar que en el experimento con ACM hubo crecimiento y consumo de nitrógeno total -- sin utilización de azúcares reductores, hecho que indica la presencia de otra fuente carbonada fácilmente asimilable -- por el microorganismo, con una producción de vitamina B₁₂ de 1052.60 mcg/l. En el experimento con JCL hubo poco crecimiento el cuál está de acuerdo con el consumo de azúcares reductores y nitrógeno total. En ambos casos los azúcares reductores residuales deben ser no fácilmente metabolizables por el microorganismo o bien se tratan de otras sustancias que responden a la técnica de análisis empleada.

En la Tabla IX, se observó mayor crecimiento en el medio con glucosa en comparación al medio con JCL, comportamiento lógico pues tuvo mayor cantidad de azúcar. Los resultados también muestran que en el medio con JCL el microorganismo creció y produjo vitamina B₁₂ aunque no al mismo nivel de lo reportado (32).

Al igual que en el caso anterior se encontró un mayor crecimiento y producción de vitamina B₁₂ en el medio con glucosa (Tabla X). Para el caso de medio con JCL hubo un mejor crecimiento y mayor producción de vitamina B₁₂ cuando se -- esterilizaron juntos los constituyentes de los medios.

TABLA IX

DETERMINACION DE GLUCOSA, NITROGENO Y VITAMINA B₁₂ EN LAS FERMENTACIONES DONDE LOS CONSTITUYENTES DE LOS MEDIOS SE ESTERILIZARON POR SEPARADO. MEDIO CON GLUCOSA (EXSG) MEDIO CON JUGO COCIDO DE LIMON (EXSL).

	Crecimiento	Azúcares red. (g/l)		Nitrógeno tot. (g/l)		Vitamina B ₁₂ (mcg/l)
		inicial	final	inicial	final	final
EXSG	++++	87.70	33.70	5.05	4.50	6316.00
EXSL	++	18.50	11.12	5.55	5.00	1052.60

TABLA X

DETERMINACION DE GLUCOSA, NITROGENO Y VITAMINA B₁₂ EN LAS FERMENTACIONES DONDE LOS CONSTITUYENTES DE LOS MEDIOS SE ESTERILIZARON JUNTOS. MEDIO CON GLUCOSA (EJG), MEDIO CON JUGO COCIDO DE LIMON (EJL).

	Crecimiento	Azúcares red. (g/l)		Nitrógeno tot. (g/l)		Vitamina B ₁₂ (mcg/l)
		inicial	final	inicial	final	final
EJG	+++++	87.70	29.20	5.00	4.44	6316.00
EJL	+++	18.00	12.90	5.50	4.95	2105.30

Por lo tanto, es conveniente en base a éstos resultados esterilizar juntos los constituyentes de los medios para simplificar las operaciones del proceso y a la vez disminuir los riesgos de contaminación.

VI.4 Experimentos a Nivel Fermentador

VI.4.1 - Experimentos utilizando glucosa como fuente de carbono.

El objetivo de éstos experimentos fué el de conocer el comportamiento cinético de P. shermanii ATCC 13673 en un medio control de glucosa (sustrato comercialmente empleado para la producción de vitamina B₁₂), bajo diferentes condiciones de aereación a fin de disponer de los elementos básicos necesarios que permitan comparar el comportamiento cinético del mismo microorganismo en un medio a base de jugo codido de limón y bajo las mismas condiciones de fermentación.

Para que los experimentos de ambos medios de fermentación sean realmente comparables se consideró que el medio control de glucosa debería contener el mismo número de moles que la fuente de carbono del medio a base de jugo cocido de limón, es decir, 0.18295 moles (0.0537 moles de azúcares, - glucosa, + 0.12925 moles de ácido cítrico) los cuales equivalen a 3.28% de glucosa. Por lo tanto, la composición del medio fue: 32.8 g de glucosa, 3.15 g de nitrógeno (agua de cocimiento de maíz) y 5 mg de CoCl₂ ajustando el volumen a un litro con agua destilada. Se esterilizaron juntos la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno.

El inóculo fué preparado creciendo al microorganismo en el mismo medio de la forma indicada en materiales y métodos, (sección V.3) con el fin de que no perdiera la capacidad productora de vitamina B₁₂.

Las fermentaciones fueron llevadas a cabo por 168 h -- bajo las condiciones anotadas en la Tabla III (ver materiales y métodos).

VI.4.1a. - Fermentación bajo condiciones anaeróbicas. Los resultados se resumen en la Tabla XI.

Cuando la fermentación se lleva a cabo bajo condiciones anaeróbicas (Figura 17) el crecimiento exponencial se presenta dentro de las primeras 48 h de iniciada la fermentación, con una producción celular de 6.4 g/l y un consumo de glucosa, ácido láctico y nitrógeno total de 25.28, 19.8 y 0.95 g/l respectivamente. En éste lapso, la velocidad -- específica de crecimiento (μ) es 0.063 h⁻¹ (Figura 18) y la síntesis de vitamina es máxima, 2186 mcg/l, posteriormente a medida que disminuye la velocidad específica de crecimiento disminuye la síntesis de vitamina, de tal forma que cuando $\mu = 0$ la síntesis se detiene, lo que indica que en condiciones anaeróbicas la producción de vitamina B₁₂ está en -- función directa de la velocidad específica de crecimiento.

Analizando éstos resultados en función a sus velocidades específicas (Tabla A y Anexo 1), se encontró que efectivamente las velocidades específicas de producción y de consumo de sustratos (q_p y q_s) están estrechamente relacionados a la del crecimiento (μ). Por consiguiente la fermentación es de tipo I, según la clasificación de Gaden (14) o -- sea, la fermentación presenta una cinética de producción -- asociada al crecimiento (Figura 19).

VI.4.1b. - Fermentación bajo condiciones aeróbicas. Los resultados se resumen en la Tabla XII.

En la Figura 20 se muestran los resultados obtenidos -- en ésta fermentación, de manera similar a la anterior el -- crecimiento logarítmico se presenta dentro de las primeras

TABLA XI

RESULTADOS OBTENIDOS EN LA FERMENTACION ANAEROBICA DE UN MEDIO CONTROL DE GLUCOSA
 CON Propionibacterium shermanii ATCC 13673

Muestra	Tiempo (h)	Peso seco (g/l)	Nitrógeno residual (g/l)	Nitrógeno dializable (g/l)	Nitrógeno no dializable (g/l)	Azúcar residual (g/l)	Ac. láctico residual (g/l)	Vitamina B ₁₂ en células (mcg/l)
1	0:0	0.42	5.30	4.84	0.46	42.48	11.63	0.0
2	24:50	2.20	4.99	4.25	0.74	33.38	5.88	0.0
3	46:15	6.40	4.35	3.86	0.49	17.20	0.0	2186.0
4	67:30	7.06	4.27	3.78	0.48	12.91	0.0	2660.0
5	88:45	7.55	4.01	3.38	0.63	12.59	0.0	2099.0
6	114:20	7.50	4.06	3.38	0.68	12.03	0.0	2633.0
7	136:30	7.58	4.03	3.31	0.73	13.63	0.0	2721.0
8	160:30	7.30	4.05	3.31	0.74	12.06	0.0	2605.0

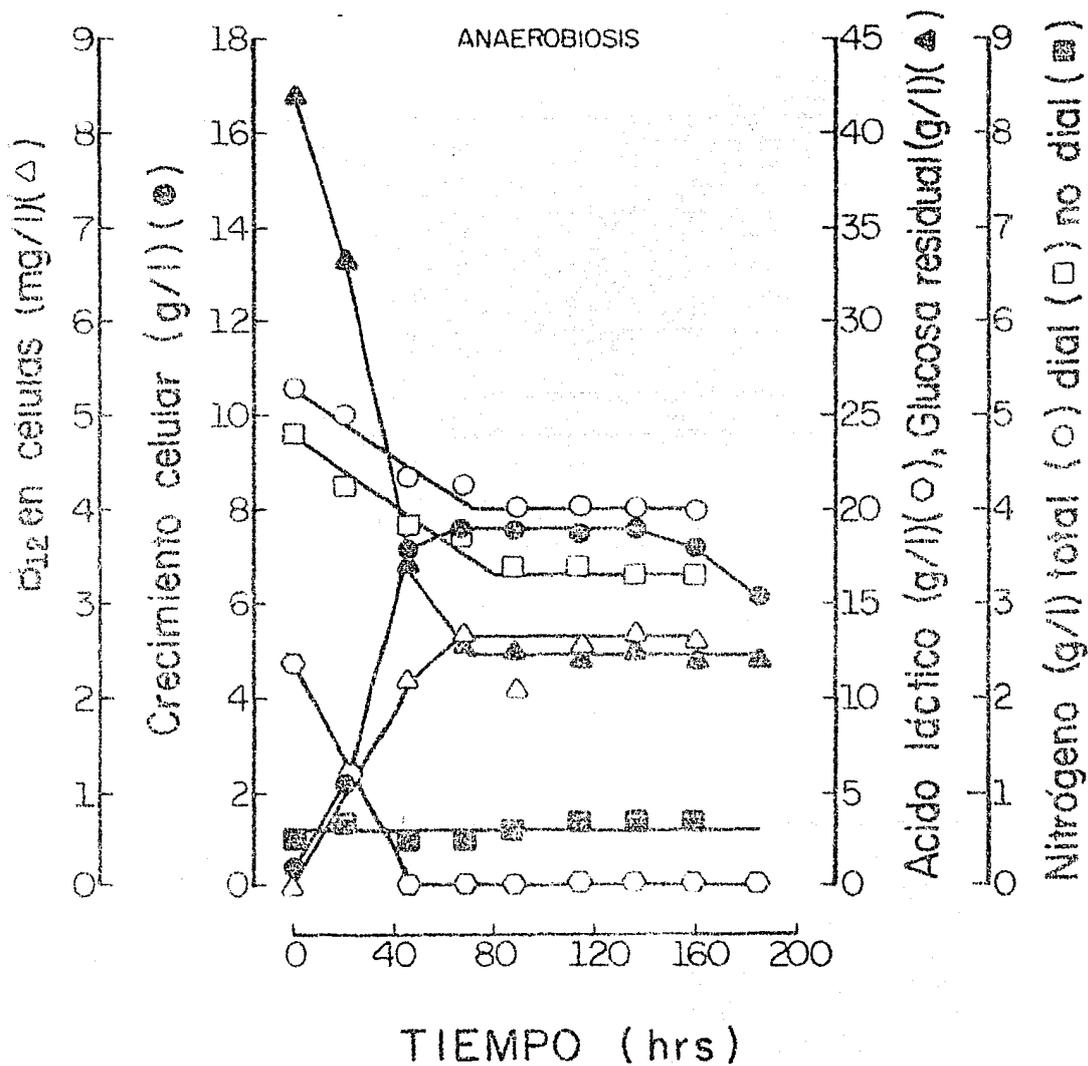


Figura 17. Curva concentración contra tiempo en la fermentación anaeróbica de un medio control de glucosa con Propionibacterium shermanii ATCC 13673.

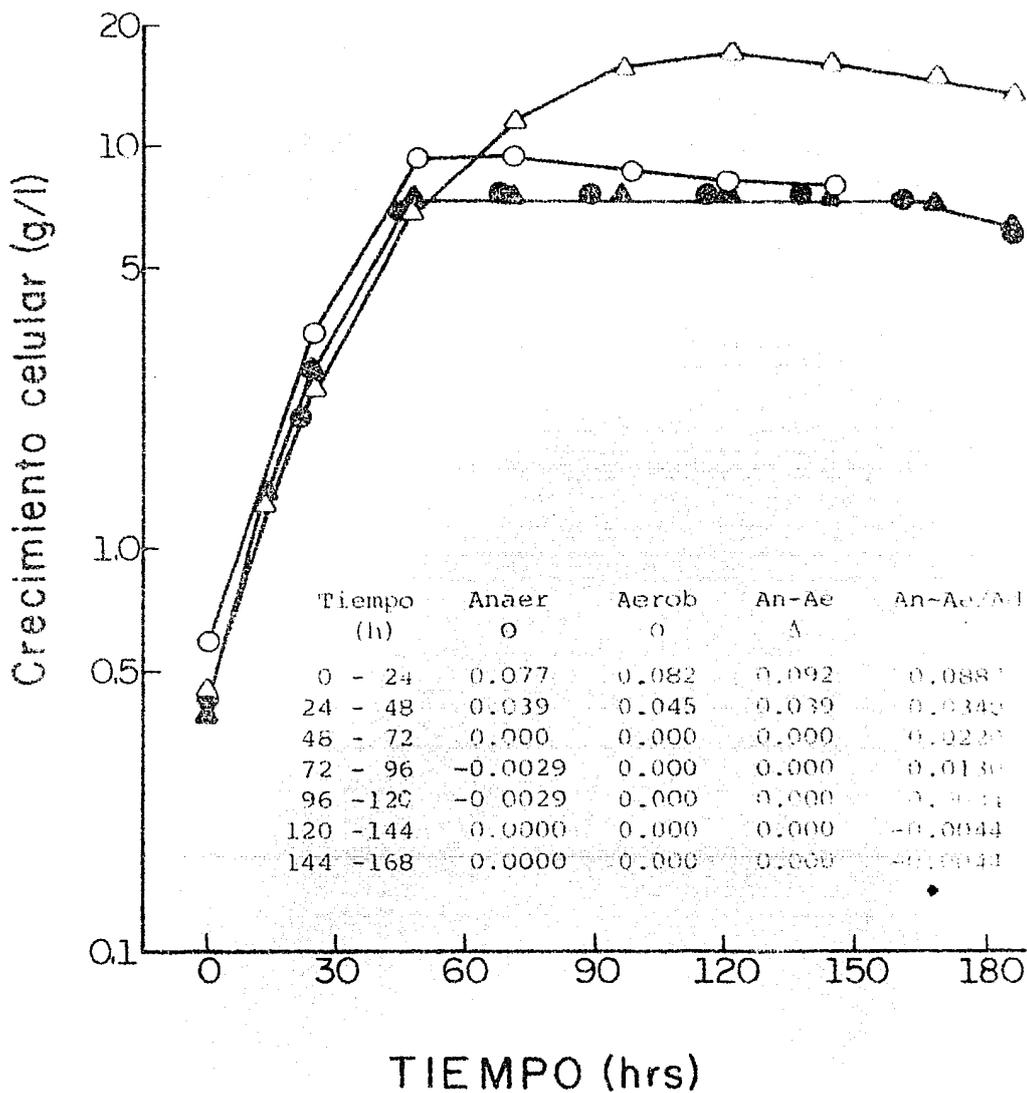


Figura 18. Velocidades específicas de crecimiento, μ (h^{-1}) de *Propionibacterium shermanii* ATCC 13673 en un medio control de glucosa bajo diferentes condiciones de aeración.

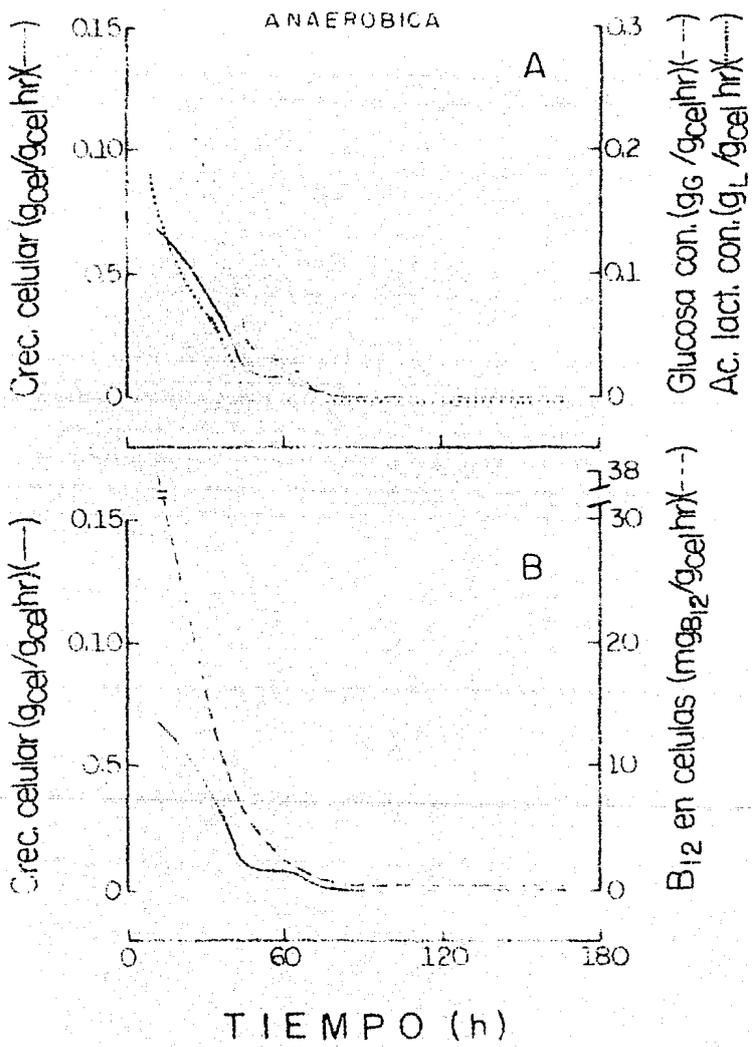


Figura 19. Velocidades específicas en la fermentación anaeróbica de un medio control de glucosa con *Propionibacterium shermanii* ATCC 13673.

TABLA XII

RESULTADOS OBTENIDOS EN LA FERMENTACION AEROBICA DE UN MEDIO CONTROL DE GLUCOSA
 CON Propionibacterium shermanii ATCC 13673

Muestra	Tiempo (h)	Peso seco (g/l)	Nitrógeno residual (g/l)	Nitrógeno dializable (g/l)	Nitrógeno no dializable (g/l)	Azúcar residual (g/l)	Ac. láctico residual (g/l)	Vitamina B ₁₂ en células (mcg/l)
1	0:00	0.59	5.20	4.65	0.55	42.88	11.63	--
2	24:0	3.42	4.60	4.05	0.55	38.86	5.88	--
3	48:0	9.13	4.25	3.67	0.58	15.68	0.0	1042.6
4	72:0	9.28	3.98	3.30	0.68	13.87	0.0	4169.4
5	97:0	8.56	4.03	3.40	0.65	11.72	0.0	4358.9
6	119:0	8.20	4.09	3.40	0.66	12.28	0.0	4311.5
7	144:0	7.97	4.09	3.40	0.71	12.28	0.0	2653.3

70

48 h de fermentación, sin embargo, la producción celular es 43% más alta (9.13 g/l) con solo 8% más de glucosa consumida (27.20 g/l); el consumo de ácido láctico y nitrógeno total, así como, la velocidad específica de crecimiento son similares a la fermentación anaeróbica, mientras que la -- producción de vitamina en éste lapso es 47% más baja (1042 mcg/l). En las siguientes 24 h la masa celular aumenta ligeramente (0.14 g/l) aumentando la producción de vitamina - B₁₂ a 4170 mcg/l, ésto indica que en éste intervalo de tiempo una baja velocidad específica de crecimiento promueve no tablemente la síntesis de B₁₂. Por otro lado, la lisis celular y una prolongada aereación disminuyen el contenido de - vitamina.

Al analizar éstos resultados en función de sus velocidades específicas, (Tabla A, Anexo 1) se encuentra que en - las primeras 36 h de la fermentación las velocidades específicas de crecimiento (μ) y producción de B₁₂ (q_p), van relacionadas, relación no mantenida durante las siguientes horas de la fermentación, pues a partir de ese tiempo μ continúa disminuyendo y q_p presenta un aumento cuyo máximo se encuentra a las 60 h (Figura 21B), mientras tanto q_s de glucosa a ese mismo tiempo (36 h) presenta un máximo de consumo, disminuyendo posteriormente hasta las 60 h a partir del cual permanece constante ($q_s = 0$) (Figura 21A). De ésta forma, - en las primeras 36 h la fermentación presenta una cinética de producción asociada al crecimiento, mientras que en las subsecuentes 24 h la cinética de producción es no asociada al crecimiento, por lo que presenta una combinación de las fermentaciones de tipo I y III según clasificación de Gaden (14), (Figura 21).

VI.4.lc. - Fermentación bajo condiciones anaeróbicas-aeróbicas. Los resultados se resumen en la Tabla XIII.

Cuando la fermentación se realiza en dos etapas, como se muestra en la Figura 22, se observa que para la fase anaeróbica el comportamiento de todos los parámetros es muy si

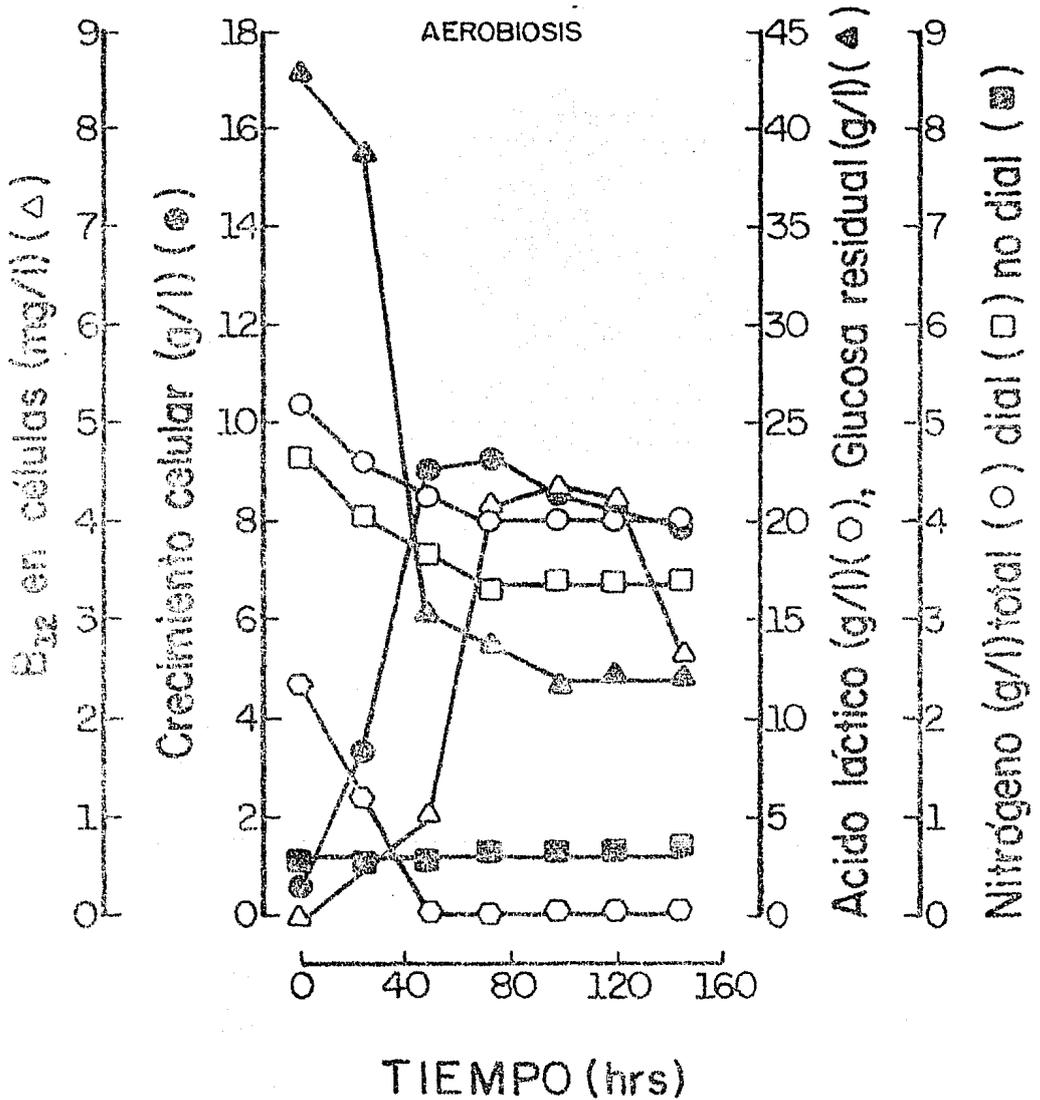


Figura 20. Curva concentración contra tiempo de la fermentación aeróbica de un medio control de glucosa con *Propionibacterium shermanii* ATCC 13673.

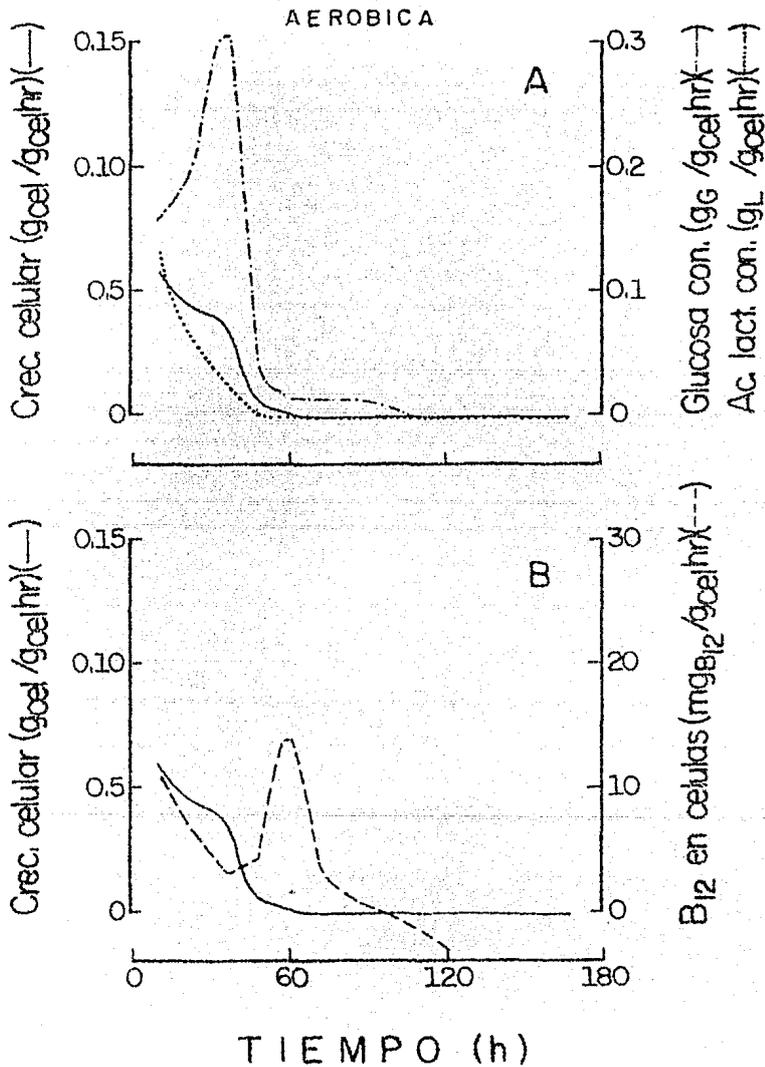


Figura 21. Velocidades específicas en la fermentación aeróbica de un medio control de glucosa con Propionibacterium shermanii ATCC 13673.

TABLA XIII

RESULTADOS OBTENIDOS EN LA FERMENTACION ANAEROBICA-AEROBICA DE UN MEDIO
 CONTROL DE GLUCOSA CON Propionibacterium shermanii ATCC 13673

Muestra	Tiempo (h)	Peso seco (g/l)	Nitrógeno residual (g/l)	Nitrógeno dializable (g/l)	Nitrógeno no dializable (g/l)	Azúcar residual (g/l)	Ac. láctico residual (g/l)	Vitamina B ₁₂ en células (mcg/l)
1	0:0	0.39	5.30	4.84	0.46	42.48	11.63	---
2	13:0	1.37	5.19	4.67	--	37.55	--	---
3	24:0	2.82	4.87	4.44	0.44	34.19	5.88	---
4	47:30	7.45	4.21	3.80	0.43	15.62	0.00	1989.9
5	71:30	7.38	4.17	3.72	0.5	12.68	0.00	2676.8
6	95:30	7.64	4.04	3.54	0.5	11.73	0.00	2676.8
7	119:30	7.67	4.01	3.47	0.54	11.70	0.00	3469.3
8	142:43	7.53	3.96	3.47	0.48	11.17	0.00	4153.0
9	167:15	7.24	3.40	3,54	0.39	11,51	0.00	3932.0

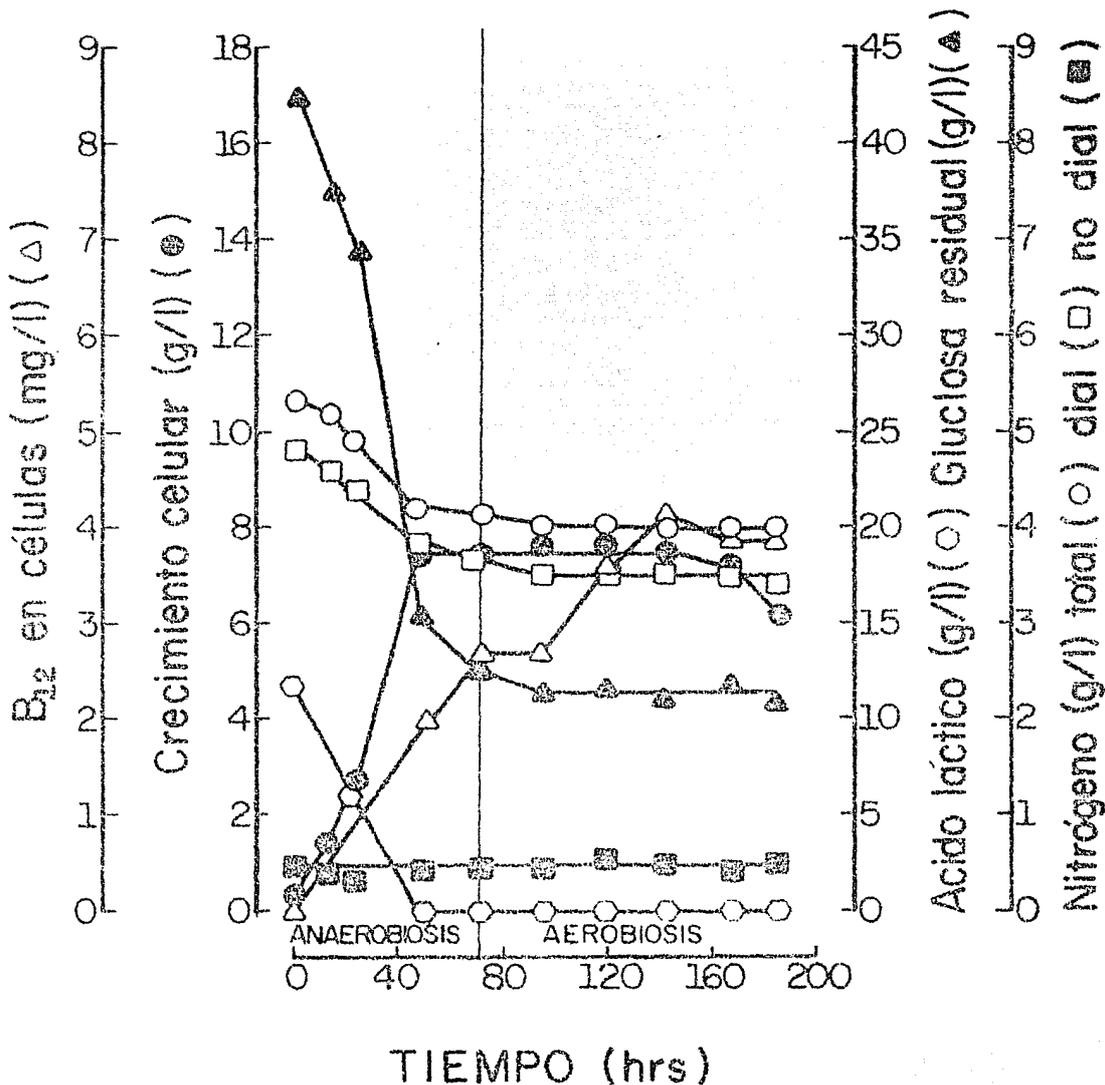


Figura 22. Curva concentración contra tiempo en la fermentación anaeróbica-aeróbica de un medio control de glucosa con Propionibacterium shermanii ATCC 13673.

milar al mostrado en la Figura 17. Al hacer el cambio a la etapa aeróbica (en fase de crecimiento estacionario) los consumos de glucosa (1.51 g/l) y nitrógeno total (0.21 g/l) son bajos y la producción de vitamina B₁₂ aumenta de 2676 a 4153 mcg/l por efecto de la aereación (5,13 y 31).

Trabajando los datos en velocidades específicas (Tabla A, Anexo 1) éstos muestran en la etapa anaeróbica un comportamiento parecido al de la Figura 19, mientras que en la etapa aeróbica todas las velocidades específicas de los parámetros permanecen constantes, a excepción de la velocidad específica de producción de vitamina B₁₂ (q_p), cuyo máximo lo tiene a las 108 h de la fermentación, hecho que se debe a la formación del 5.6-dimetilbencimidazol en la etapa aeróbica y a la unión de éste con el factor "B" generado en la etapa anaeróbica (13,37), provocando de ésta manera que se forme más vitamina B₁₂. Por lo tanto, la fermentación tiene una cinética de producción asociada al crecimiento durante la primera etapa, y no asociada al crecimiento durante la segunda etapa, mostrando una combinación de la fermentación de tipo I y III según clasificación de Gaden (14), (Figura 23).

VI.4.1d - Fermentación bajo condiciones anaeróbicas-aeróbicas con adiciones periódicas de glucosa. Los resultados se resumen en la Tabla XIV.

En esta fermentación (Figura 24), la fase logarítmica se prolonga hasta las primeras 24 h de aereación (120 h de fermentación), con una producción celular de 17.2 g/l iniciándose inmediatamente la fase de muerte celular posiblemente por la acumulación de metabolitos tóxicos. El consumo máximo de glucosa es de 77 g/l. Parece ser que durante las primeras 48 h de fermentación la presencia de ácido láctico regula negativamente la velocidad de consumo de glucosa y la velocidad de síntesis de vitamina B₁₂, ya que en las siguientes 48 h donde ya no hay presencia de ácido-

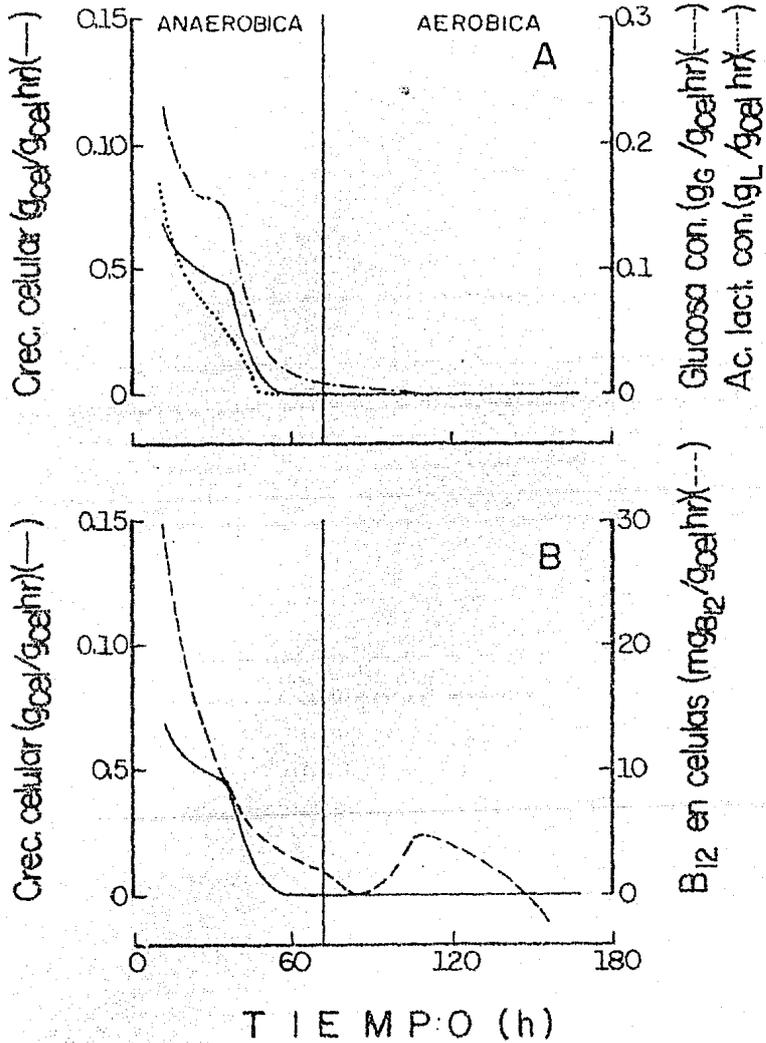


Figura 23. Velocidades específicas en la fermentación anaeróbica-aeróbica de un medio control de glucosa con Propionibacterium shermanii ATCC 13673.

TABLA XIV

RESULTADOS OBTENIDOS EN LA FERMENTACION ANAEROBICA-AEROBICA/ADICIONES DE UN
MEDIO CONTROL DE GLUCOSA CON Propionibacterium shermanii ATCC 13673

Muestra	Tiempo (h)	Peso seco (g/l)	Nitrógeno residual (g/l)	Nitrógeno dializable (g/l)	Nitrógeno no dializable (g/l)	Azúcar residual (g/l)	Ac. láctico residual (g/l)	Vitamina B ₁₂ en células (mcg/l)
1	0:0	0.45	4.24	4.75	0.49	40.38	11.63	0.00
2	13:00	1.30	5.15	4.61	--	39.37	--	0.00
3	24:00	3.53	4.80	4.39	0.44	32.09 45.18	5.88	1209.1
4	47:30	6.80	4.20	3.76	0.44	32.87 49.26	0.00	1658.27
5	71:30	11.58	3.58	3.15	0.43	28.36 48.89	0.00	3019.81
6	95:30	15.82	2.99	2.55	0.49	25.09	0.00	5536.0
7	119:30	17.20	2.91	2.45	0.51	16.60	0.00	6411.99
8	142.53	16.19	2.82	2.31	0.48	13.15	0.00	6557.06
9	167.15	15.04	2.86	2.39	0.48	12.93	0.00	5803.97

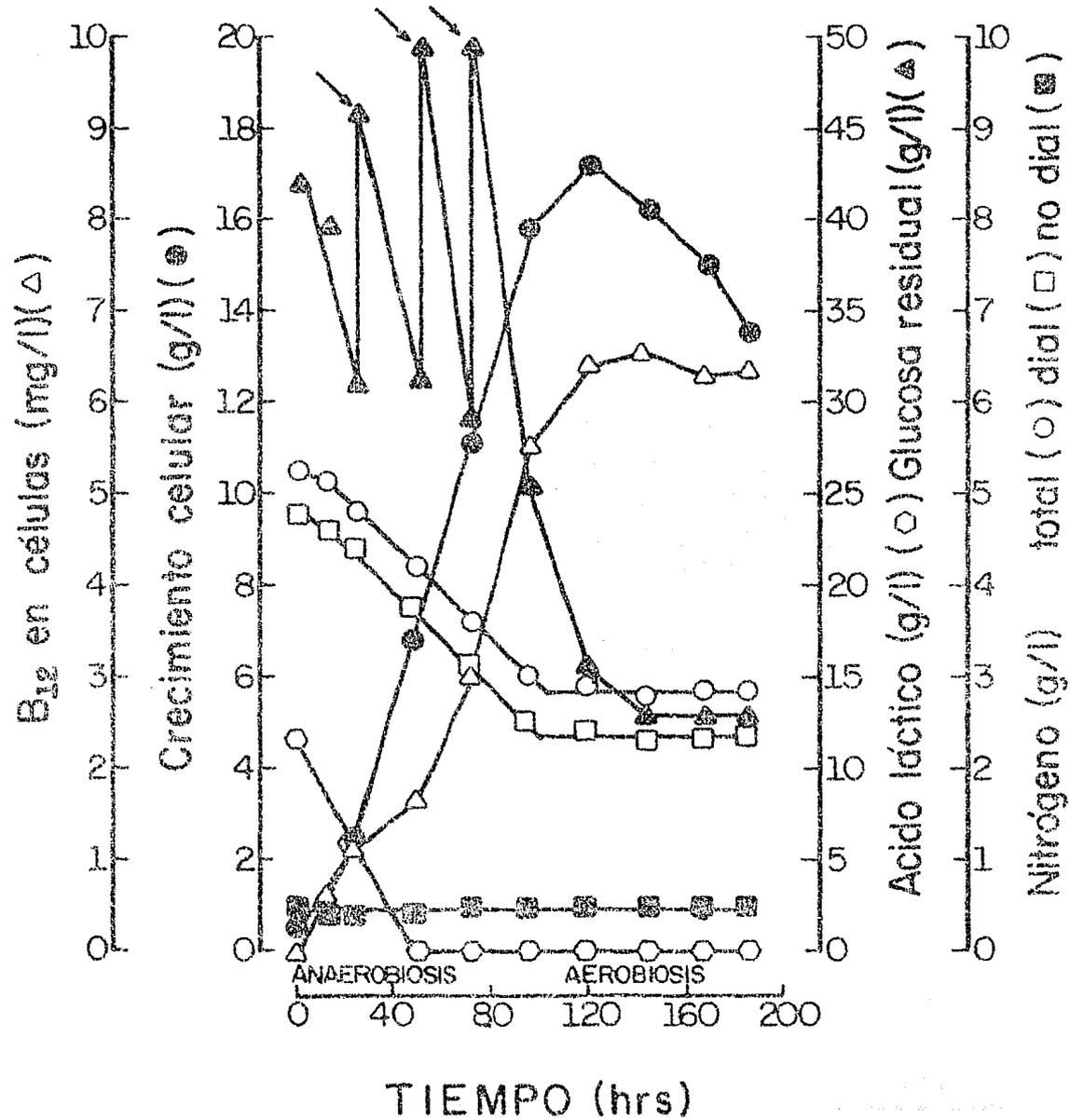


Figura 24. Curva concentración contra tiempo en la fermentación anaeróbica-aeróbica/adiciones de un medio control de glucosa con Propionibacterium shermanii ATCC 13673.

láctico aumentan estas velocidades. Por otro lado, la baja velocidad específica de crecimiento (μ), (Figura 18) bajo condiciones aeróbicas (96-120 h) no originan un aumento en la síntesis de vitamina a diferencia de lo que sucede en los experimentos anteriores (Figura 22 y 23), lo que hace suponer que debido al excesivo crecimiento aunado al bajo nivel de aereación utilizado (0.1 vvm*), el cultivo prácticamente se mantuvo en condiciones anaeróbicas puesto que la producción de B₁₂ en éste periodo de tiempo y el comportamiento del crecimiento así lo demuestran.

De la misma forma que los experimentos anteriores, se analizaron los resultados en función a sus velocidades específicas (q) (Tabla A, Anexo 1), mostrando una relación directa entre los correspondientes al crecimiento (μ) y al consumo de sustratos, principalmente con la glucosa, (Figura 25A), sin embargo dicha relación no la presenta con la q_p de la vitamina B₁₂ puesto que dentro de las primeras 36 h de fermentación, la cinética de producción de vitamina B₁₂ está asociada al crecimiento, mientras que a partir de éste tiempo en adelante se presenta como no asociada (Figura 25B) Dicho comportamiento cae dentro de los patrones cinéticos I y III propuestos por Gaden (14), posiblemente debido a un efecto de adición de glucosa (Figura 25).

En relación a los diferentes niveles de aereación en los experimentos anteriores, cabe hacer notar que:

- a) sin importar las condiciones de aereación, el microorganismo presenta durante las primeras 48 h de iniciada la fermentación valores muy similares de velocidades específicas de crecimiento (μ), (Figura 18).
- b) la cantidad de azúcar residual fué aproximadamente la misma en todos los experimentos (28-30%) porque se tratan de azúcares y/o sustancias no metabolizables provenientes del agua de cocimiento de maíz (Ver Tabla VIII)
- c) el nitrógeno protéico (8.7-14% del nitrógeno total) --

* vvm = volumen de aire por volumen de medio por minuto.

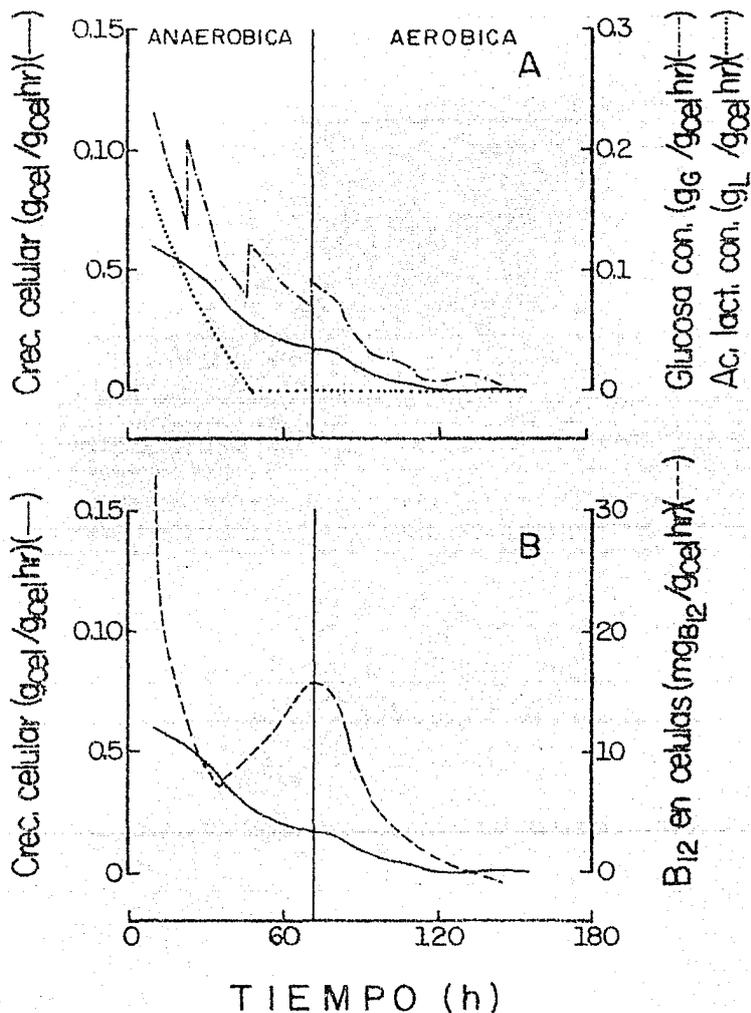


Figura 25. Velocidades específicas en la fermentación anaeróbica-aeróbica/adiciones de un medio control de glucosa con Propionibacterium shermanii ATCC 13673.

permanece constante durante la fermentación.

- d) el ácido láctico presente en el medio es consumido totalmente en las primeras 48 h. Así mismo,
- c) el microorganismo presenta un consumo simultáneo de -- las fuentes de carbono en contraste a lo reportado por Lee (19).

VI.e.le - Rendimientos y productividades

Para una mejor comparación entre las fermentaciones -- realizadas se calcularon los rendimientos (Tabla XV) y las productividades (Tabla XVI).

En virtud a que en el medio de fermentación estuvieron presentes dos fuentes de carbono, los cuáles utilizó el microorganismo para duplicarse, se procedió a determinar los rendimientos celulares para cada fuente de carbono empleando la siguiente relación:

$$Y_x / \text{mol}_G = \frac{\Delta x}{\Delta s_1 / PM_1 + |\Delta s_2 / PM| / 8} \quad (25)$$

donde:

Y_x / mol_G = Rendimiento de crecimiento molar: gramo de peso seco producido por mol de glucosa con sumida.

Δx = Masa celular producida.

$\Delta s_1 / PM_1$ = Moles de glucosa consumida.

$\Delta s_2 / PM_2$ = Moles de lactato consumido.

PM_1 = Peso molecular de la glucosa

PM_2 = Peso molecular del ácido láctico.

s_{1y2} = Gramos de fuente de carbono consumido; s_1 , glucosa y s_2 , ácido láctico.

El denominador 8 presente en la ecuación se empleó con el fin de tomar en cuenta la relación de rendimiento molar (8:1) que tiene P. shermanii sobre glucosa y lactato (11 y 19), para hacer equivalentes las moles de láctico a las moles de glucosa. Dividiendo éste rendimiento entre 8, se obtiene el rendimiento molar para lactato ($Y_{x/molL}$). Si estos rendimientos molares se dividen entre el peso molecular correspondiente se obtendrá el peso seco celular por gramo de sustrato ($Y_{x/S}$), para cada uno de ellos. Por otro lado, en la vía metabólica de las propionibacterias se producen 4 ATP como consecuencia de la degradación de la glucosa hasta propionato y acetato como puede observarse (Figura 26), donde 2 ATP son producidos durante la glicólisis y 2 ATP durante el ciclo del ácido propiónico por mol de glucosa (11 y 16), y si se considera esa misma relación de 8:1 se obtendrá que por cada mol de lactato el microorganismo generará 0.5 ml de ATP, valor que está dentro del rango (0.33-0.66 moles de ATP por mol de lactato) reportado en la bibliografía (11 y 19). Utilizando éstas moles de ATP generado por mol de sustrato empleado, se calculan los rendimientos celulares molares correspondientes (gramos de peso seco celular por mol de ATP generado, $Y_{x/ATP}$) para cada una de las fermentaciones.

El análisis de los rendimientos de producción (Tabla XV) muestran que la masa de células producidas por mol de sustrato consumido (Y_{x/s_1} y y_2) para el máximo crecimiento en la fermentación anaeróbica (0.21 y 0.05; en la fermentación de dos etapas (0.24 y 0.06) y en la fermentación de dos etapas con adiciones de glucosa (0.22 y 0.06) son muy semejantes, esto demuestra que tales experimentos se realizaron bajo condiciones anaeróbicas, ya que para aerobiosis se obtuvo un valor más alto (0.39 y 0.10), de aquí se desprende que la fermentación aeróbica es más eficiente que la anaeróbica, estos resultados están de acuerdo a lo reportado (18 y 33).

El cálculo del peso seco producido por mol de ATP generado ($Y_{x/ATP}$) para las fermentaciones anaeróbicas y combinadas están dentro de un rango de 9.54 - 10.68, mientras que para -

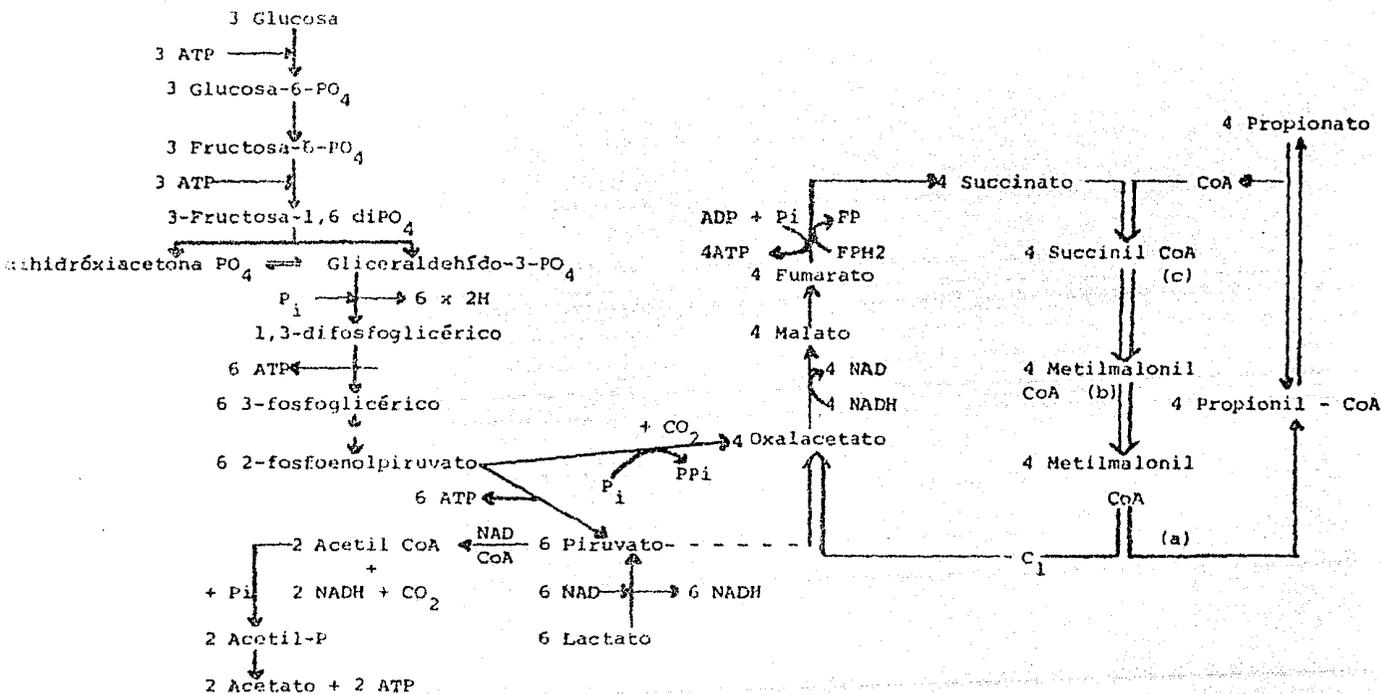


Figura 26. Generación de ATP por mol de glucosa en la vía metabólica de las Propionibacterias. En el ciclo glicolítico se producen 2 ATP y 2 ATP en el ciclo del ácido propiónico (3, 16 y 40).

TABLA XV

RENDIMIENTO DE *P. shermanii* ATCC 13673 BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE AEREAACION
EN UN MEDIO CONTROL DE GLUCOSA

Rendimientos	Unidades	Anaerobiosis	Aerobiosis	Anaerobiosis-Aerobiosis Con adición de glucosa	
$Y_{x/s}$	g. cel./g. Gluc.	0.21	0.39	0.24	0.22
	g. cel./g. Láct.	0.05	0.10	0.06	0.06
$Y_{x/mol}$	g. cel./mol Gluc.	38.16	69.59	42.71	39.31
	g. cel./mo. Láct.	4.77	8.70	5.34	4.91
$Y_{x/ATP}$	g. cel./mol ATP (Glu)	9.54	17.14	10.68	9.83
	g. cel./mol ATP (Lác)	9.54	17.14	10.68	9.83
$Y_{x/N}$	g. cel./g. N ₂	6.31	8.98	6.5	6.78
$Y_{p/x}$	mcg B ₁₂ /g. cel.	379.12	546.52	581.89	416.78
$Y_{p/s}$	mcg B ₁₂ /mol sust.	9066.12	14917.52	13724.40	11744.70
$Y_{p/N}$	mcg B ₁₂ /g. N ₂	2148.44	3725.55	3090.55	2689.52

aerobiosis es de 17.4 (Tabla XV). En función del rendimiento de células por mol de ATP (9.54) encontrado en los experimentos en condiciones anaeróbicas, y considerando que no importando de donde se generen las moles de ATP debe de dar un valor constante de gramos de células producidas por mol de ATP (Y_{ATP}), por lo tanto bajo condiciones aeróbicas se debieron de haber generado alrededor de 7 ATP por mol de sustrato consumido, indicando que de alguna forma se abrió parte del ciclo de Krebs bajo éstas condiciones de aereación. Por consiguiente el alto valor obtenido (17.4) bajo condiciones aeróbicas se debe a que se calculó en base a 4 moles de ATP y no a las que realmente se produjeron.

El rendimiento de vitamina B₁₂, mcg/gramo de célula ($Y_{P/X}$) para las condiciones anaeróbica y anaeróbica-aeróbica con adiciones son muy similares, 379.12 y 416.78 respectivamente, lo mismo sucede para aerobiosis y anaerobiosis-aerobiosis cuyos valores son 546.52 y 581.89 respectivamente. Siendo más eficientes éstos últimos que los anteriores.

En relación a la cantidad de vitamina B₁₂ producida por mol de sustrato ($Y_{P/S}$) la fermentación aeróbica es más eficiente (Tabla XV), lo cual no concuerda con lo reportado en la literatura (13) donde la fermentación en dos etapas (anaeróbica-aeróbica) produce un mayor rendimiento de vitamina B₁₂.

Analizando las productividades de cada fermentación (Tabla XVI) se obtienen mejores resultados en cuanto a producción de vitamina B₁₂ (mcg de B₁₂/lh) y de biomasa (peso seco celular/lh) bajo condiciones aeróbicas. Aunque la productividad presentada en la fermentación anaeróbica-aeróbica con adiciones de glucosa es muy semejante a la aeróbica, ésta última es mejor puesto que la cantidad de glucosa en el medio fue menor que en la otra. Las velocidades volumétricas (gramo de sustrato consumido/lh) fueron muy similares para todas las fermentaciones.

TABLA XVI

VELOCIDADES VOLUMETRICAS DE P. shermanii ATCC 13673 BAJO DIFERENTES
CONDICIONES DE AERACION EN UN MEDIO CONTROL DE GLUCOSA A LA MAXIMA
PRODUCCION Y CONSUMO

Velocidades volumétricas promedio	Anaerobiosis	Aerobiosis	Anaerob - Aerob	
			Con adición de glucosa	
mcg _{B₁₂} /lh	19.90	44.94	25.25	46.18
g. cel/lh	0.13	0.18	0.15	0.16
g. Gluc./lh	0.55	0.57	0.57	0.68
g. Láct./lh	0.25	0.24	0.25	0.25
g. Nit./lh	0.02	0.02	0.02	0.02

Cabe señalar que las determinaciones de las productividades se realizaron tomando en cuenta solo el proceso de fermentación, desde tiempo cero al tiempo donde se obtuvo la máxima producción y el máximo consumo de sustrato, dependiendo del parámetro a medir.

VI.4.2 - Experimentos utilizando jugo cocido de limón como fuente de carbono.

El objetivo de éstos experimentos fue el de conocer el comportamiento cinético de P. shermanii ATCC 13673 en un medio a base de jugo cocido de limón como fuente de carbono complementado con agua de cocimiento de maíz como fuente de nitrógeno, bajo diferentes condiciones de aeración lo que permitirá sentar las bases para incrementar la producción de vitamina B₁₂ en futuros estudios.

El medio de fermentación empleado fué el mencionado ya en materiales y métodos. Los constituyentes de dicho medio fueron esterilizados juntos.

El inóculo fué preparado creciendo al microorganismo en medio base de la forma ya indicada en la sección VI.3.

Las fermentaciones fueron llevadas a cabo por 168 h -- bajo las condiciones señaladas en la Tabla III (Materiales y Métodos).

VI.4.2a - Fermentación bajo condiciones anaeróbicas. Los resultados se resumen en la Tabla XVII.

Quando la fermentación se llevo bajo condiciones anaeróbicas (Figura 27), el crecimiento exponencial se presenta dentro de las primeras 48 h de iniciada la fermentación, con una producción celular de 2.52 g/l y un consumo de azú-

TABLA XVII

RESULTADOS OBTENIDOS EN LA FERMENTACION ANAEROBICA DE UN MEDIO A BASE DE JUGO COCIDO DE LIMON
CON Propionibacterium shermanii ATCC 13673

Muestra	Tiempo (h)	Peso seco (g/l)	Nitrógeno residual (g/l)	Nitrógeno dializable (g/l)	Nitrógeno no dializable (g/l)	Azúcar residual (g/l)	Ac. Láctico residual (g/l)	Ac. Cítrico residual (g/l)	Ac. Succínico (g/l)	Vitamina B ₁₂ en células (mcg/l)
1	00.00	0.29	5.00	4.50	0.42	17.14	11.63	23.68	0.0	0.0
2	24.00	1.19	5.27	4.82	0.45	14.17	8.33	23.12	0.21	530.65
3	48.15	2.52	5.01	4.58	0.43	12.22	0.0	23.93	1.33	1184.5
4	71.45	2.50	4.99	4.56	0.43	11.84	0.0	22.15	1.84	1516.2
5	98.00	2.60	4.88	4.41	0.47	11.51	0.0	19.81	1.74	1402.4
6	120.00	2.70	4.98	4.53	0.45	11.80	0.0	21.91	1.92	1402.4
7	144.00	3.60	4.76	4.28	0.48	11.80	0.0	21.02	1.88	1677.2
8	168.00	3.75	4.89	4.44	0.45	10.79	0.0	18.68	1.80	1838.3

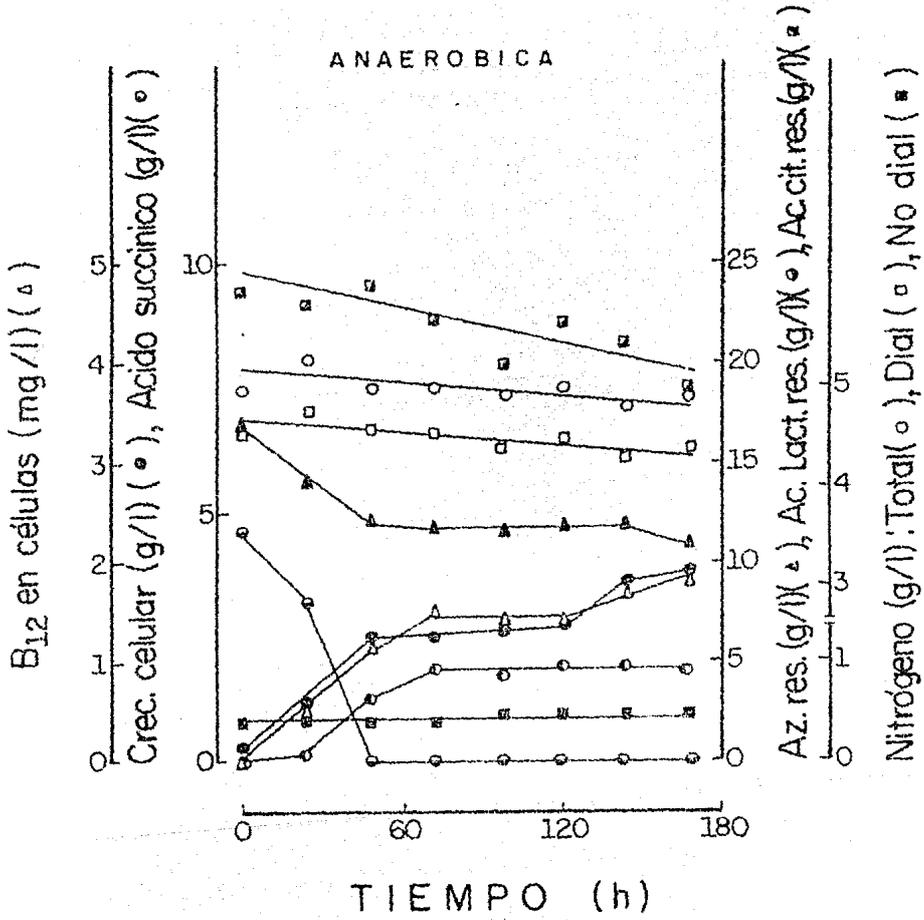


Figura 27. Curva concentración contra tiempo en la fermentación anaeróbica de un medio a base de jugo cocido de limón con Propionibacterium shermanii -- ATCC 13673.

cares, ácido láctico, ácido cítrico y nitrógeno total de -- 4.92, 11.63, 1.42 y 0.1 g/l respectivamente. En éste lapso la velocidad específica de crecimiento (μ) es de 0.044 h^{-1} (Figura 28) y la síntesis de vitamina B_{12} es 1184.5 mcg/l . A diferencia de la fermentación donde se utilizó glucosa como fuente de carbono y bajo condiciones anaeróbicas (Figura -- 13), el microorganismo continuó creciendo (aunque lentamente) proporcionando 1.25 g/l más de biomasa (48-168 h) con un consumo adicional de 1.43 de azúcar, 3.575 de ácido cítrico y 0.25 de nitrógeno total, en g/l, y, una producción de vitamina B_{12} de 653.83 mcg/l . En éste mismo intervalo de -- tiempo el microorganismo presentó 3 diferentes velocidades específicas de crecimiento: 0.0008 h^{-1} (48-120 h), 0.125 h^{-1} (120-144 h) y 0.0013 h^{-1} (144-166 h), (Figura 28).

Analizando éstos resultados en función a sus velocidades específicas (q), (Tabla B del Anexo 1), se encuentra -- que los correspondientes a crecimiento (μ) y a consumo de -- sustratos (q_s) van disminuyendo conforme la fermentación -- transcurre hasta llegar a cero con excepción de la q_s del ácido cítrico el cual se mantiene casi constante hasta el -- fin de la fermentación, pareciendo ser éste el sustrato que mantiene las actividades metabólicas que se presentan des-- pués de que las otras dos fuentes de carbono han sido ya -- agotadas (Figura 29A). Las velocidades específicas de producción de ácido succínico y vitamina B_{12} presentan una cinética de producción no relacionada y relacionada al crecimiento respectivamente (Figura 29B). En base a éste comportamiento la fermentación es de tipo I, para la producción -- de vitamina B_{12} y de tipo III para la producción de ácido -- succínico, según la clasificación establecida por Gaden -- (14).

VI.4.2b - Fermentación bajo condiciones aeróbicas. Los resultados se muestran en la Tabla XVIII.

Cuando la fermentación se llevó bajo condiciones aeróbicas (Figura 30), el crecimiento logarítmico se presenta -

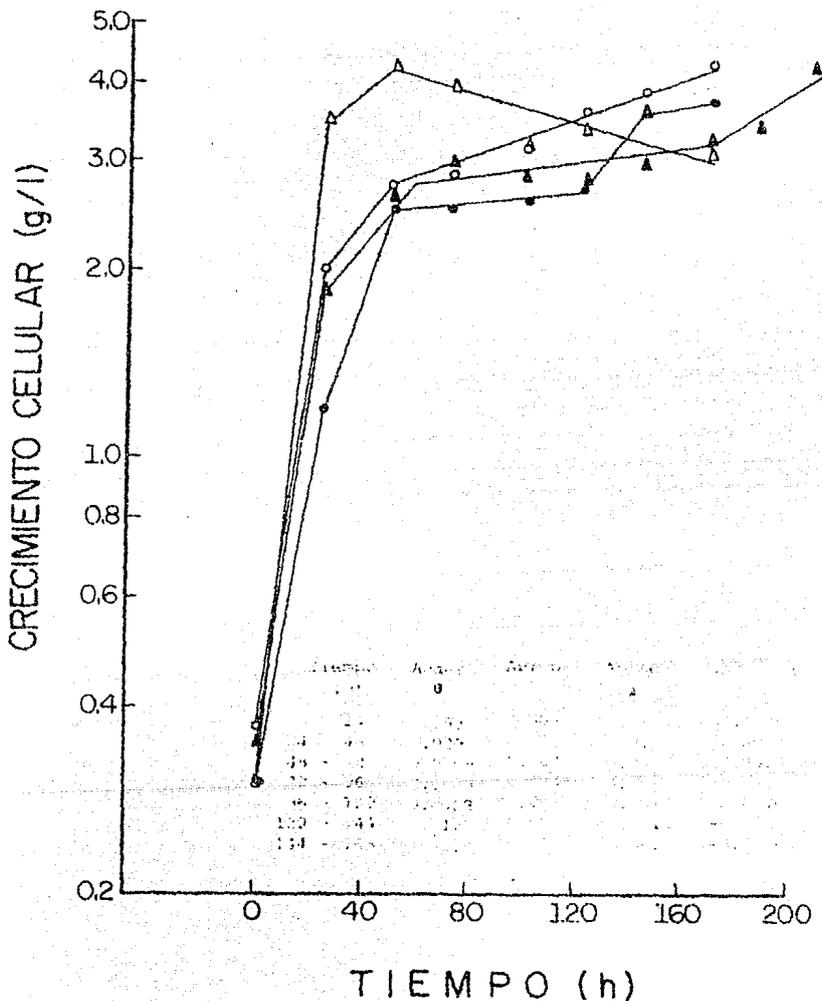


Figura 28. Velocidades específicas de crecimiento, μ (h^{-1}) de Propionibacterium shermanii ATCC 13673 en un medio a base de jugo cocido de limón bajo diferentes condiciones de aeración.

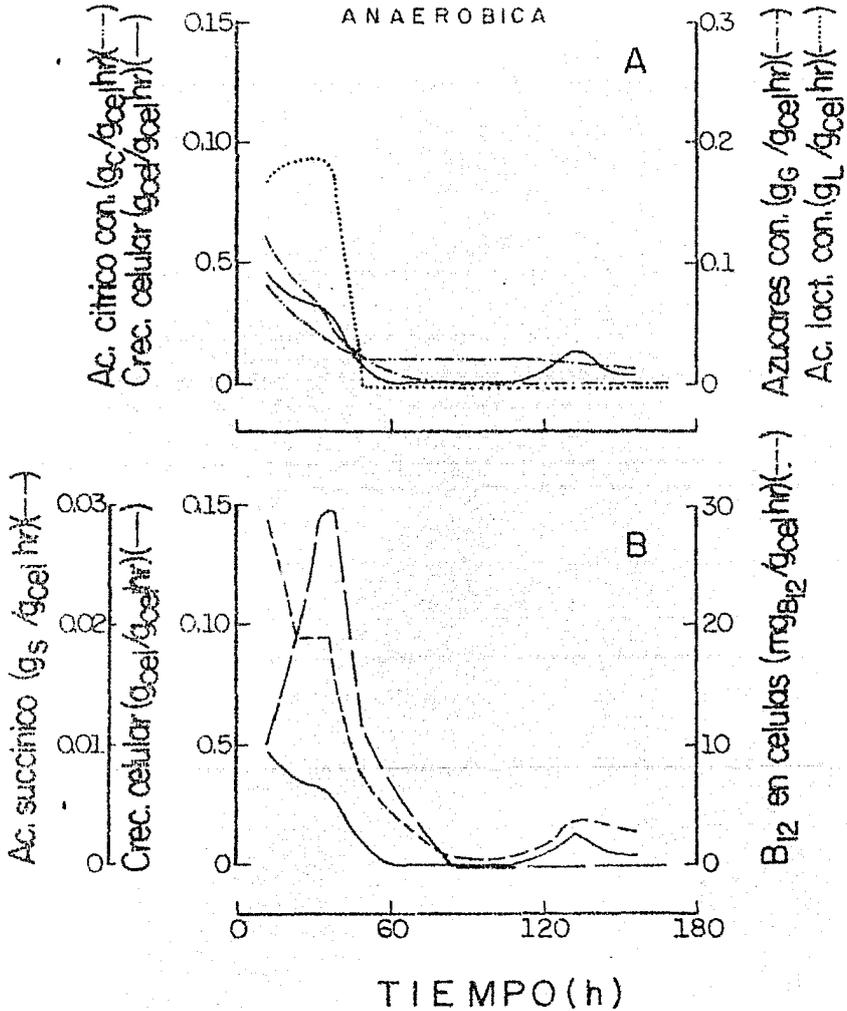


Figura 29. Velocidades específicas en la fermentación anaeróbica de un medio a base de jugo cocido de limón con Propionibacterium shermanii ATCC 13673.

TABLA XVIII

RESULTADOS OBTENIDOS EN LA FERMENTACION AEROBICA DE UN MEDIO A BASE DE JUGO COCIDO DE LIMON
CON Propionibacterium shermanii ATCC 13673

Muestra	Tiempo (h)	Peso seco (g/l)	Nitrógeno residual (g/l)	Nitrógeno dializable (g/l)	Nitrógeno no dializable (g/l)	Azúcar residual (g/l)	Ac. Láctico residual (g/l)	Ac. Cítrico residual (g/l)	Ac. Succínico (g/l)	Vitamina B12 en células (mcg/l)
1	0:0	0.37	5.37	4.94	0.43	17.41	11.63	23.68	0.00	0.0
2	20:30	1.83	5.19	4.71	0.47	13.88	7.07	21.62	0.52	1684.6
3	40:40	2.70	5.43	4.89	0.54	12.76	0.0	21.34	1.45	1895.2
4	60:50	2.83	5.14	4.70	0.44	12.42	0.0	17.80	1.61	1895.2
5	80:50	2.95	5.12	4.64	0.48	14.24	0.0	15.39	1.82	2416.3
6	117:05	3.56	5.09	4.66	0.42	12.00	0.0	10.76	1.52	2558.4
7	141:25	3.87	5.01	4.59	0.42	11.58	0.0	10.55	1.94	2274.2
8	163:25	4.25	4.98	4.62	0.36	12.76	0.0	6.40	1.41	2179.4

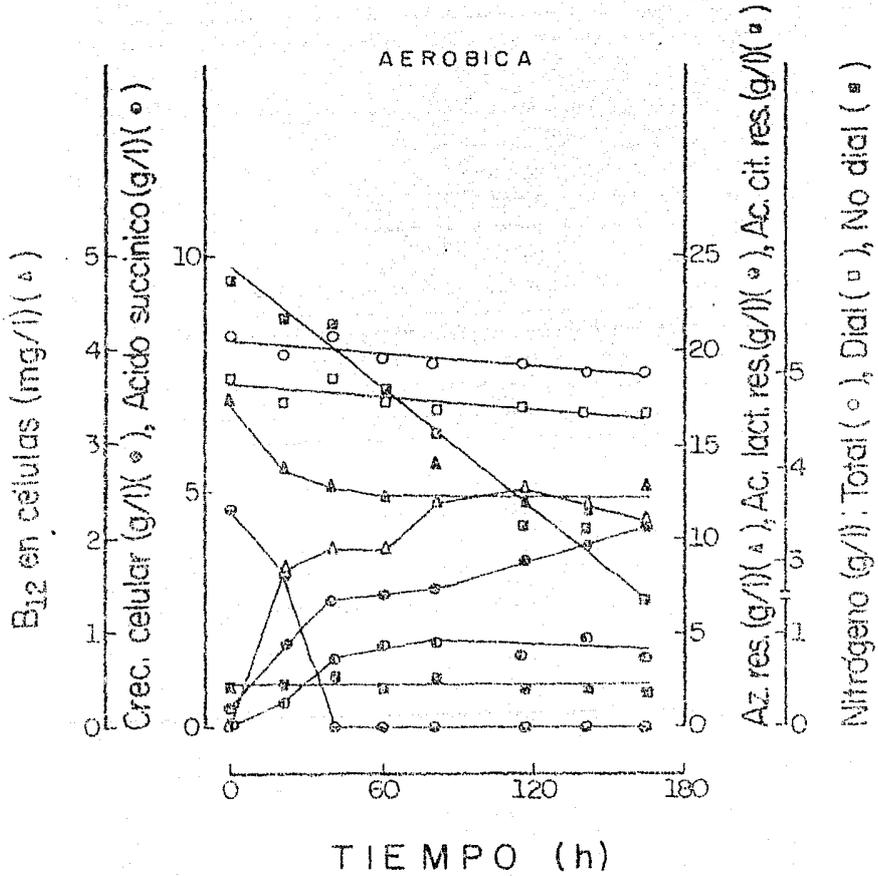


Figura 30. Curva concentración contra tiempo en la fermentación aeróbica de un medio a base de jugo cocido de limón con Propionibacterium shermanii ATCC 13673.

dentro de las primeras 40 h de fermentación con una producción de biomasa de 2.7 g/l con un consumo de azúcar, ácido láctico, ácido cítrico y nitrógeno total de 4.65, 11.63, 4.14 y 0.1 g/l respectivamente. La biomasa obtenida es similar que en anaerobiosis a pesar de un consumo de 2.72 g/l más de ácido cítrico el cual no se reflejó en masa celular posiblemente debido a que se utilizó en la producción de algún(os) otro(s) metabolito(s) en la fermentación. Por otro lado, ésta condición de aeración no ocasionó que se incrementara la producción de biomasa, como sucedió en la fermentación donde se utilizó glucosa como fuente de carbono. El comportamiento de la velocidad específica de crecimiento (μ) es similar a la que presenta bajo condiciones anaeróbicas. En éste mismo lapso la producción de vitamina B₁₂ fue 37.5% más alta que la fermentación VII.4.2A, y 1.45 g/l de ácido succínico. Al igual que la fermentación bajo condiciones anaeróbicas, el microorganismo continuó creciendo lentamente, a una velocidad específica de 0.0037 h⁻¹ proporcionando 1.55 g/l más de biomasa con un consumo adicional de 13.14 g/l de ácido cítrico y 0.25 g/l de nitrógeno total. A diferencia de la fermentación anterior ésta presentó un máximo en la producción de vitamina B₁₂ (117 h) y una producción de 2558.40 mcg/l.

Al analizar los resultados en función de sus velocidades específicas (q), (Tabla B del Anexo 1), los correspondientes al crecimiento (μ) y a los sustratos (q_s) van disminuyendo conforme avanza la fermentación llegando a ser cero para ácido láctico (40 h) y para glucosa (60 h) mientras que para ácido cítrico va disminuyendo lentamente durante toda la fermentación (Figura 31A). Por otro lado, la velocidad específica de producción (q_p) para vitamina B₁₂ (Figura 31B) presenta hasta las 48 h una cinética asociada al crecimiento y no asociada dentro de las 48-96 h presentando una q_s máxima a las 72 h de fermentación en el preciso momento que la μ es cercana a cero, indicando con ello que una baja velocidad específica de crecimiento promueve la síntesis de vitamina B₁₂, siendo la fermentación de tipo I y III según clasificación de Gaden (14). Por otro lado, la

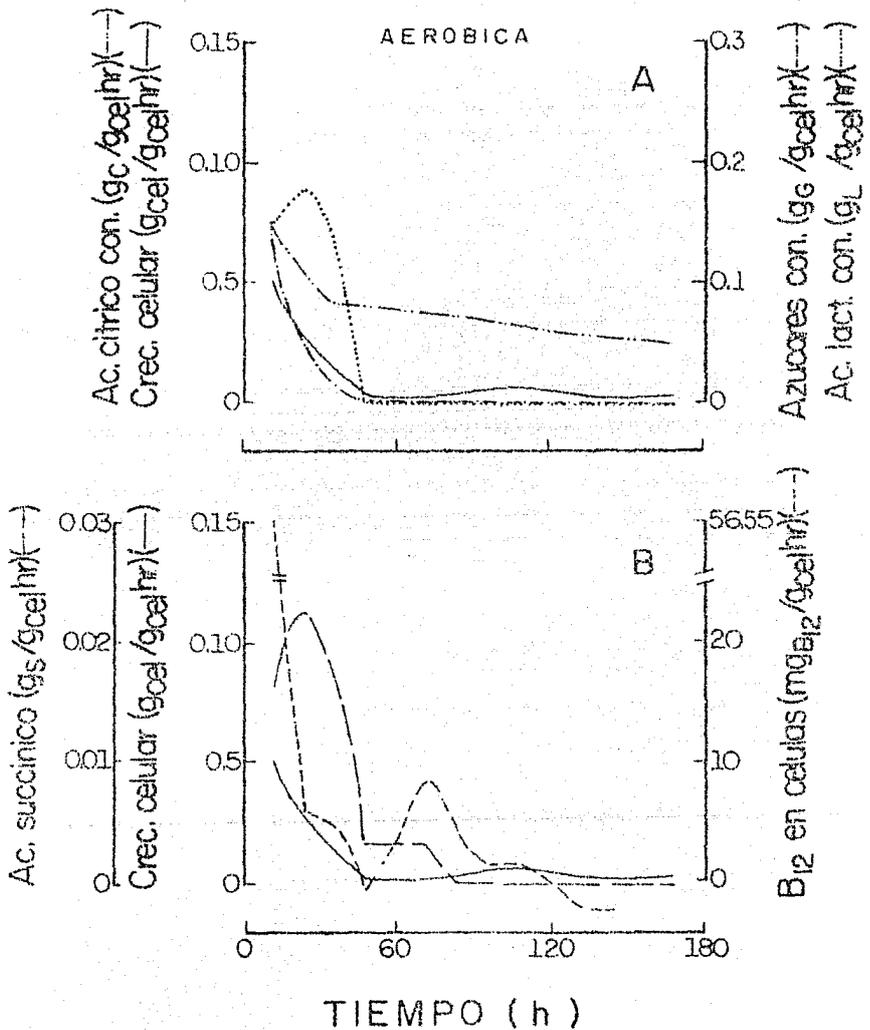


Figura 31. Velocidades específicas en la fermentación aeróbica de un medio a base de jugo cocido de limon con Propionibacterium shermanii ATCC 13673.

q_p del ácido succínico es máxima a las 24 h presentando de esta forma una cinética de producción no asociada al crecimiento y según la clasificación de Gaden es una fermentación de tipo III.

VI.4.2c - Fermentación bajo condiciones anaeróbicas-aeróbicas. Los resultados se presentan en la Tabla XIX.

Cuando la fermentación se realizó bajo estas condiciones (Figura 32), al igual que en las dos fermentaciones anteriores, el microorganismo presentó su crecimiento logarítmico en las primeras 48 h con una producción de biomasa de 2.30 g/l con un consumo (en g/l) de azúcar 3.36, de ácido láctico 11.63, ácido cítrico 10.65 y nitrógeno total de 0.45 g/l. Hasta éste tiempo de fermentación el microorganismo presentó un comportamiento similar de velocidad específica de crecimiento (μ) a las encontradas a las dos fermentaciones anteriores (Figura 28). No obstante de que el microorganismo consumió más cítrico que en la fermentación anaeróbica (experimento VII.4.2A) para el mismo lapso y condiciones, éste no se refleja en crecimiento, lo que hace suponer que solo una pequeña parte se utiliza para material celular y la mayor parte para la síntesis de productos metabólicos. Aunque no se ha encontrado una explicación convincente a éste comportamiento presentado sobre el consumo de ácido cítrico. A partir de las 48 h el microorganismo continuó creciendo lentamente a una velocidad específica de crecimiento constante de 0.0013 h^{-1} , con un consumo adicional de ácido cítrico y nitrógeno de 13.03 y 0.15 g/l respectivamente y un aumento de biomasa de 1.0 g/l. La producción máxima de vitamina B₁₂ fue de 1326.60 mcg/l y de ácido succínico de 1.6 g/l.

Al analizar en base a sus velocidades específicas (q), Tabla B del Anexo 1), la q_s de glucosa va directamente relacionada a la μ de crecimiento, mientras que las de consumo de ácido láctico y cítrico van inversamente relacionadas has

TABLA XIX

RESULTADOS OBTENIDOS EN LA FERMENTACION ANAEROBICA-AEROBICA DE UN MEDIO A BASE DE JUGO COCIDO DE LIMON CON Propionibacterium shermanii ATCC 13673

Muestra	Tiempo (h)	Peso seco (g/l)	Nitrógeno residual (g/l)	Nitrógeno dializable (g/l)	Nitrógeno no dializable (g/l)	Azúcar residual (g/l)	Ac. Láctico residual (g/l)	Ac. Cítrico residual (g/l)	Ac. Succínico (g/l)	Vitamina B12 en células (mcg/l)
1	00:00	0.35	5.68	5.19	0.49	17.15	11.63	23.68	0.0	0.0
2	25:00	1.85	5.60	5.09	0.51	15.05	8.33	20.35	0.65	558.7
3	48:30	2.65	5.36	4.82	0.54	13.79	0.0	13.03	0.98	--
4	72:00	3.02	5.45	4.91	0.54	13.44	0.0	3.78	1.64	--
5	96:00	2.64	5.14	4.56	0.58	12.56	0.0	0.06	1.13	947.6
6	109:0	2.83	5.16	4.61	0.55	12.56	0.0	0.11	1.53	947.6
7	144:0	3.02	5.21	4.63	0.58	12.90	0.0	0.06	1.60	1279.2
8	166:0	3.30	5.37	4.80	0.57	14.63	0.0	0.06	1.05	1326.6

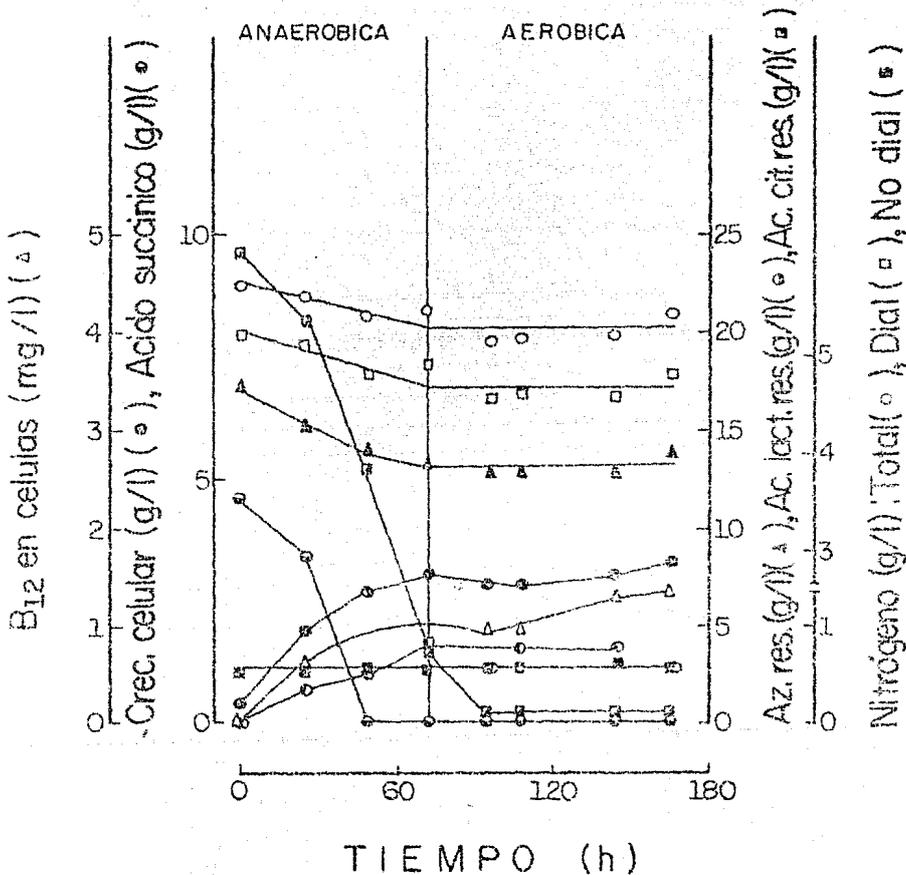


Figura 32. Curva concentración contra tiempo en la fermentación anaeróbica-aeróbica de un medio a base de jugo cocido de limón con Propionibacterium -- shermanii ATCC 13673.

La una q_s máxima, a las 36 h para la primera y 48 h para la segunda, a partir de las cuales decrecen hasta hacerse cero, 48 y 96 h respectivamente (Figura 33A). Con lo que respecta a las velocidades específicas de producción, la vitamina B₁₂ presenta una cinética de producción relacionada al crecimiento dentro de la primera etapa de la fermentación y una no relacionada en la segunda etapa, teniendo de ésta forma una combinación de la fermentación tipo I y III según la clasificación de Gaden (Figura 33B). Mientras que en las 36 h de fermentación la q_p del ácido succínico presenta una cinética de producción asociada al crecimiento y una no asociada cuya q_p máxima se encuentra a las 60 h, efecto posiblemente debido a una utilización mayor de ácido cítrico ya que en la fermentación anaeróbica solo presentó la asociada al crecimiento, presentando en el caso del ácido succínico una fermentación que combina al tipo I y III, según los parámetros de clasificación para las fermentaciones establecidas por Gaden (14), (Figura 33B).

VI.4.2d - Fermentación bajo condiciones de anaerobiosis-aerobiosis en el medio base de jugo cocido de limón más 1.6% (p/v) de glucosa y con adición de jugo cocido de limón cada 24 h en las primeras 72 h de fermentación. Los resultados se dan en la Tabla XX.

El microorganismo bajo éstas condiciones presenta a las primeras 24 h de iniciada la fermentación una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.1038 h⁻¹ (Figura 28), con una producción de masa celular de 3.5 g/l, consumiendo totalmente la glucosa adicionada (16 g/l), 0.38 g/l de nitrógeno, 3.79 g/l de ácido cítrico y una acumulación de ácido láctico de 12.02 g/l (Figura 34). Este comportamiento de acumulación de ácido láctico no presente en las otras 3 fermentaciones anteriores seguramente se debe a que en ésta fermentación se agregó 1.6% de glucosa desde su inicio la cual al catabolizarse en la glicólisis en estas 24 h de anaerobiosis proporcionó una cantidad adicional de ácido -

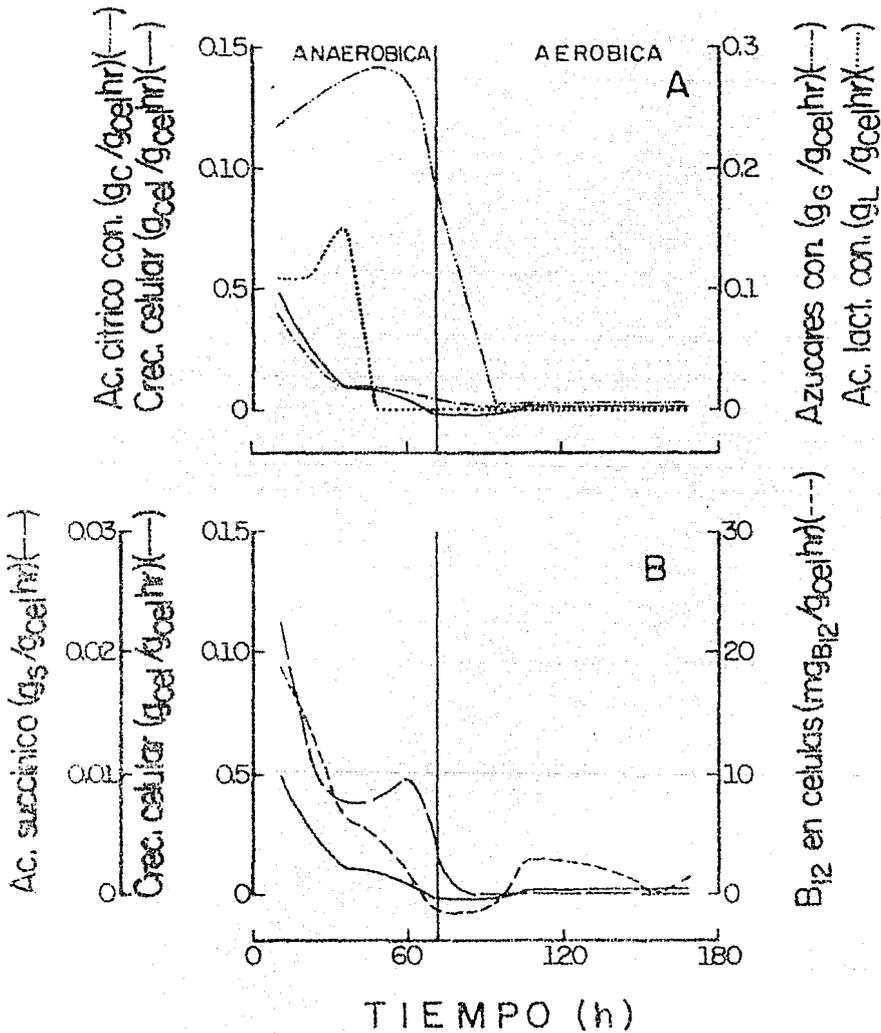


Figura 33. Velocidades específicas en la fermentación anaeróbica-aeróbica de un medio a base de limón con Propionibacterium shermanii ATCC 13673.

TABLA XX

RESULTADOS OBTENIDOS EN LA FERMENTACION ANAEROBICA-AEROBICA/ADICIONES DE UN MEDIO A BASE DE JUGO COCIDO DE LIMON CON Propionibacterium shermanii ATCC 13673

Muestra	Tiempo (h)	Peso seco (g/l)	Nitrógeno residual (g/l)	Nitrógeno dializable (g/l)	Nitrógeno no dializable (g/l)	Azúcar residual (g/l)	Ac. Láctico residual (g/l)	Ac. Cítrico residual (g/l)	Ac. Succínico (g/l)	Vitamina B ₁₂ en células (mcg/l)
1	0:00	0.30	4.84	4.42	0.43	32.04	11.63	23.67	0.0	0.0
2	24:0	3.50	4.46	4.00	0.38	16.72 18.84	23.65 19.06	19.88 20.05	0.51 0.40	473.8
3	48:00	4.30	4.09	3.76	0.33	13.28 18.49	10.59 10.48	17.24 22.65	2.00 1.55	805.5
4	72:00	4.00	3.85	3.54	0.31	16.72 20.81	0.0	17.98 22.15	3.48 2.77	1468.8
5	96:00	3.20	3.73	3.42	0.30	19.44	0.0	20.40	3.50	663.8
6	125:00	3.34	3.73	3.41	0.32	18.40	0.0	20.74	3.68	473.8
7	144:0	3.65	3.73	3.39	0.35	16.96	0.0	24.22	3.58	--
8	168:0	3.16	3.16	3.29	0.35	17.74	0.0	23.30	3.44	--

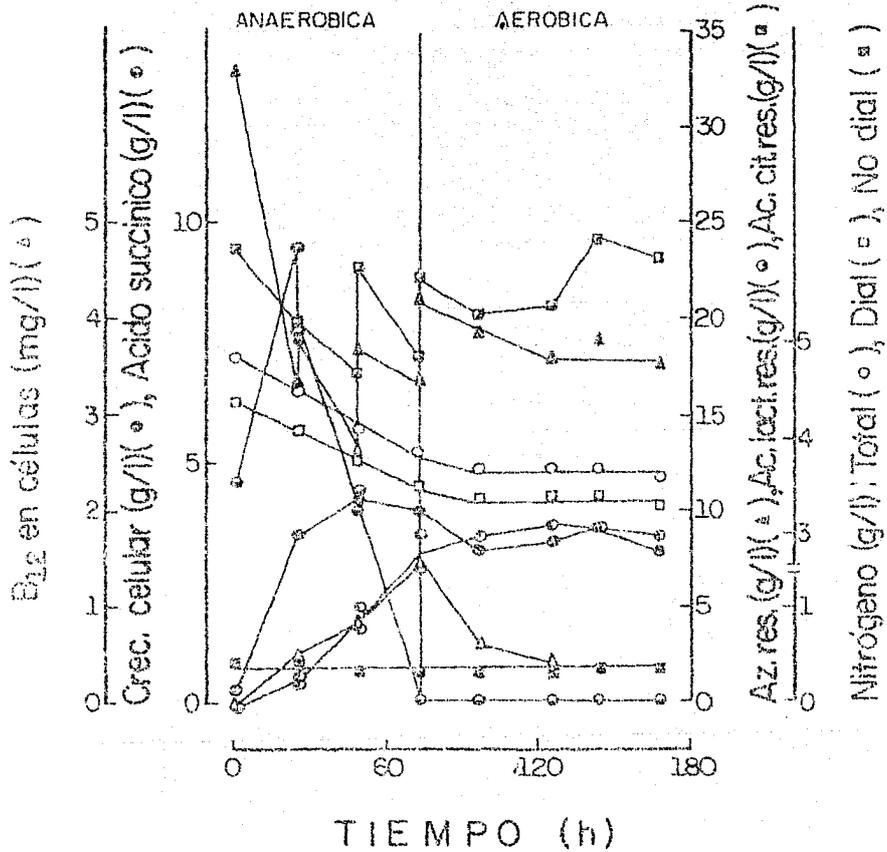


Figura 34. Curva concentración contra tiempo en la fermentación anaeróbica-aeróbica/adiciones de un medio a base de jugo cocido de limón con Propionibacterium shermanii ATCC 13673.

láctico que es un producto de dicha ruta metabólica, consumiéndola posteriormente durante la fermentación. 24 h después presenta un aumento de 0.8 g/l de biomasa con un consumo de azúcar, ácido láctico, ácido cítrico y nitrógeno de 5.56, 8.47, 2.81, y 0.37 g/l respectivamente, con una velocidad específica de crecimiento de 0.0089 h⁻¹. A partir de las 48 h el microorganismo ya no crece aún cuando hay consumo de 4.18 g/l de azúcares (hasta las 125 h), 10.48 g/l de ácido láctico (hasta las 72 h), 7.42 g/l de ácido cítrico (hasta las 96 h) y 0.36 g/l de nitrógeno total. Y, una máxima producción de vitamina B₁₂ (en las 72 h) de 1468.78 mcg/l. Esto indica que las fuentes de carbono y nitrógeno se utilizaron para la síntesis de productos metabólicos, como por ejemplo, ácido succínico probablemente a partir del ácido cítrico y parte de los azúcares, y la vitamina B₁₂ a partir del ácido láctico y azúcares, entre las 24 y 72 h de la fermentación.

De la misma forma que las fermentaciones anteriores, al analizar los resultados en base a sus velocidades específicas (q), (Tabla B del Anexo 1), los correspondientes a sustratos (q_s) y al crecimiento (μ) van estrechamente relacionados (Figura 35A), lo que indica un consumo simultáneo excepto la q_s del ácido láctico. La q_p del ácido succínico presenta una cinética de producción semiasociada al crecimiento, fermentación tipo II, y, la vitamina B₁₂ una cinética de producción asociada al crecimiento a las primeras 24 h y no asociada en el resto de la fermentación, obteniendo una q_p máxima a las 60 h, dando en éste caso una combinación de las fermentaciones de tipo I y III según clasificación de Gaden (14), hecho que se presentó en la primera etapa de la fermentación a diferencia de la fermentación anaeróbica-aeróbica, posiblemente por efecto de las adiciones (Figura 35B).

En relación a los diferentes niveles de aeración en los anteriores experimentos con jugo cocido de limón como fuente de carbono es importante señalar varios puntos:

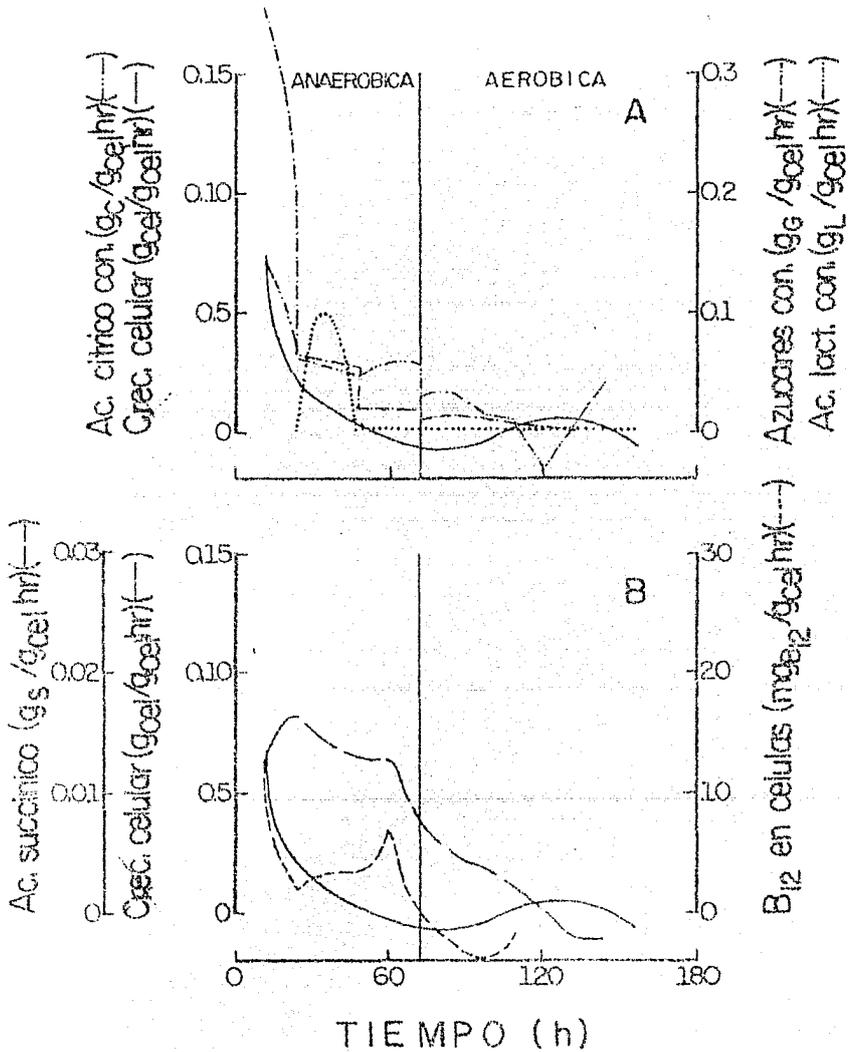


Figura 35. Velocidades específicas en la fermentación anaeróbica-aeróbica/adiciones de un medio base de jugo cocido de limón con Propionibacterium - shermanii ATCC 13673.

- a) Independientemente de las condiciones de aeración el microorganismo presentó velocidades específicas de crecimiento (μ) similares durante las primeras 48 h de fermentación (Figura 28).
- b) No se obtuvo más allá de 4.3 g/l de biomasa.
- c) La cantidad promedio de azúcares no utilizados del medio basal en todas las fermentaciones fué aproximadamente -- 71.21%, pues como se demostró anterioremente (Tabla VIII) son azúcares no fácilmente metabolizables.
- d) El ácido láctico fué consumido totalmente en las primeras 48 h de la fermentación con la excepción de la fermentación con adiciones (experimento VII.4.2d).
- e) Se producen aproximadamente 1.75 g/l de ácido succínico en todas las fermentaciones, excepto en la fermentación con adiciones (experimento VII.4.2d) donde se alcanzaron 4 g/l.
- f) El nitrógeno protéico (9% del nitrógeno total) presente en el medio no es consumido en ninguna de las fermentaciones.
- g) El nivel máximo de vitamina B₁₂ (2558 mcg/l) se obtuvo - en la fermentación bajo condiciones aeróbicas.

VI.4.2e - Rendimientos y Productividades

Al igual que en las fermentaciones donde se utilizó -- glucosa como fuente de carbono, se determinaron rendimientos (Tabla XXI) y productividades (Tabla XXII) de cada una - de las fermentaciones a base de jugo cocido de limón.

En virtud de que en el medio de fermentación estuvieron presentes 3 fuentes de carbono (azúcares, ácido láctico y -

ácido cítrico) las cuales fueron consumidas por el microorganismo para crecer, producir vitamina B₁₂ y sintetizar -- productos metabólicos, se procedió a determinar la cantidad de biomasa producida por cada una de ellas, donde los cálculos correspondientes se muestran en el Anexo III. Con fines prácticos se consideró para los experimentos con jugo cocido de limón el mismo rendimiento molar (azúcar) y los obtenidos en las fermentaciones con glucosa, 38.16 y 69.59 células/mol de glucosa de las fermentaciones anaeróbicas y aeróbica respectivamente. Para determinar el rendimiento celular por mol de ácido cítrico consumido ($Y_{x/mol_{Cit}}$) en cada uno de los experimentos, se consideró (ver anexo III) -- que 17.28 g/l de ácido cítrico fueron utilizados para material celular bajo condiciones aeróbicas y 4.2 - 5.0 g/l -- para las demás condiciones.

Analizando los rendimientos de producción (Tabla XXI) se encuentra que bajo las condiciones aeróbicas, la cantidad de células producidas por gramo de cítrico, $Y_{x/scit} = 0.05$ es menor en comparación a la encontrada bajo condiciones anaeróbica y anaeróbicas-aeróbicas (0.3), por lo que la fermentación aeróbica en base al consumo de ácido cítrico es menos eficiente. Así mismo, la cantidad de ATP producido (0.6 mol de ATP/mol de ácido cítrico) bajo estas condiciones y en base a éste sustrato es bajo.

El rendimiento de vitamina B₁₂ dado en mcgB₁₂ por gramo de células ($Y_{p/x}$) y mcgB₁₂ por mol de sustrato ($Y_{p/s}$) bajo condiciones aeróbicas es mayor, 802.01 y 11938.40 respectivamente.

La cantidad de ácido succínico producido por gramo de células ($Y_{s/x}$) fué mejor cuando la fermentación se llevó a cabo bajo condiciones anaeróbicas-aeróbicas/adiciones de jugo cocido de limón (1.21). Mientras que, la cantidad de ácido succínico producido por mol de sustrato consumido son similares en todos los experimentos (9.23-10.99), excepto -- el rendimiento bajo condiciones anaeróbicas-aeróbica (6.71).

TABLA XXI

RENDIMIENTO DE P. shermanii ATCC 13673 BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE AERACION
EN UN MEDIO A BASE DE JUGO COCIDO DE LIMON

Rendimientos	Unidades	Anaerobiosis	Aerobiosis	Anaerob - Aerob	
				más adición de glucosa	
Y _{x/s}	g. cel./g Gluc.*	0.21	0.39	0.21	0.21
	g. cel./g Láct.	0.05	0.10	0.05	0.05
	g. cel./g Cít.	0.30	0.05	0.30	0.30
Y _{x/mol}	g. cel./mol Gluc.	38.16	69.59	38.16	38.16
	g. cel./mol Láct.	4.77	8.7	4.77	4.77
	g. cel./mol Cít.	62.92	10.05	62.92	62.92
Y _{x/ATP}	g. cel./mol ATP (G)	9.54	17.40	9.54	9.54
	g. cel./mol ATP (L)	9.54	17.40	9.54	9.54
	g. cel./mol ATP (C)	9.54	17.40	9.54	9.54
Y _{x/N}	g. cel./g. N ₂	9.48	12.13	9.51	3.74
Y _{p/x}	mcg _{B₁₂} /g. cel.	557.07	802.00	449.70	397.00
Y _{p/s}	mcg _{B₁₂} /mol sust**	9763.29	11938.40	4981.92	4689.60
Y _{p/N}	mcg _{B₁₂} /g. N ₂	5252.37	6560.00	4279.45	1483.62
Y _{Suc/x}	g. Suc./g. cel.	0.83	0.71	0.61	1.21
Y _{Suc/s}	g. Suc./mol sust.	10.90	9.23	6.71	11.00

*Azúcares reductores referidos a glucosa.

**Mol de sustrato total = mol de glucosa + mol de láctico + mol de cítrico.

Al analizar las velocidades volumétricas (Tabla XXII), se encuentra que en general se obtienen valores de consumo y producción más altos en la fermentación aneróbica-aeróbica/adiciones de jugo cocido de limón debido a que, además de las adiciones, el medio tuvo un 1.6% de glucosa adicional al inicio de la fermentación.

Analizando los otros 3 experimentos se observa que las velocidades volumétricas de producción para biomasa, ácido succínico y vitamina B₁₂ muestran valores similares excepto la productividad de vitamina B₁₂ bajo condiciones aeróbicas, cuyo valor es más alto.

Las velocidades volumétricas de consumo de sustrato -- (azúcar, ácido láctico y ácido cítrico) se encuentra que independientemente de las condiciones de aeración empleadas -- muestran valores similares excepto el correspondiente al -- ácido cítrico bajo condiciones anaeróbicas, cuyo valor es -- más bajo.

TABLA XXII

VELOCIDADES VOLUMETRICAS DE *P. shermanii* ATCC 13673 BAJO
 DIFERENTES CONDICIONES DE AERACION EN UN MEDIO A BASE DE
 JUGO COCIDO DE LIMON

Velocidades volumétricas promedio	Anaerobiosis	Aerobiosis	Anaerob - Aerob	
			más adición de glucosa	
mcg _{B₁₂} /lh	10.94	21.90	8.00	20.40
g. Suc./lh	0.02	0.02	0.02	0.03
g. cel./lh	0.02	0.02	0.02	0.08
g. Azúcar/lh	0.07	0.08	0.06	0.21
g. Láct/lh	0.24	0.30	0.24	0.50
g. Cít./lh	0.02	0.11	0.14	0.14
g. N ₂ /lh	0.002	0.002	0.015	0.012

nismo presenta velocidades específicas de crecimiento similares durante las primeras 48 h de fermentación.

- Bajo condiciones anaeróbicas, a mayor velocidad específica de crecimiento mayor producción de vitamina B₁₂.
- Bajo condiciones aeróbicas, a bajas velocidades específicas de crecimiento, mayor producción de vitamina B₁₂.
- La relación carbono/nitrógeno en éstos experimentos fué de 11-15, lo que indica reformulación del medio para evitar exceso de nitrógeno.
- Hubo consumo simultáneo de las fuentes de carbono.
- Tradicionalmente la vitamina B₁₂ se produce por fermentación de dos etapas (anaeróbica-aeróbica), sin embargo los resultados muestran que la fermentación aeróbica es más eficiente bajo las condiciones experimentales aquí empleadas.
- El comportamiento cinético de producción de vitamina B₁₂ en cada una de las condiciones de aeración fué:
 - Anaeróbica - Asociada al crecimiento.
 - Aeróbica - Asociada y no asociada al crecimiento.
 - Anaer-Aer - Asociada en la primera etapa de fermentación y no asociada al crecimiento durante la segunda etapa.
 - Anaer/Aer/ad - Una combinación de asociada y no asociada al crecimiento.
- Las productividades de vitamina B₁₂ obtenidas bajo condiciones anaeróbica y anaeróbica-aeróbica/adiciones, son -- similares y mayores que las encontradas en las otras dos

condiciones.

En las fermentaciones a base de jugo cocido de limón:

- No importando las condiciones de aeración, Propionibacterium shermanii ATCC 13673 presenta velocidades específicas de crecimiento similares durante las primeras 48 h de fermentación, excepto, la fermentación donde se realizaron adiciones de jugo cocido de limón.
- La relación carbono/nitrógeno fue alta (25-35) para todas las fermentaciones y 13.6 donde se realizaron adiciones de jugo cocido de limón, lo que indica reformulación del medio para evitar exceso de nitrógeno.
- Se presentó consumo simultáneo de todas las fuentes de carbono para todas las fermentaciones.
- El rendimiento celular en función del ácido cítrico es menor en la fermentación aeróbica en comparación a las demás fermentaciones.
- Aparentemente en todas las fermentaciones, excepto la anaeróbica, la mayor parte del ácido cítrico consumido se va a otros productos metabólicos diferentes de masa celular y vitamina B₁₂.
- Hubo producción de ácido succínico en todas las fermentaciones.
- La fermentación aeróbica fué más eficiente en cuanto producción de vitamina B₁₂.
- El comportamiento cinético de producción de vitamina B₁₂ en cada una de las fermentaciones bajo diferentes condiciones de aeración fué:

Anaeróbica - Asociada al crecimiento.

Aeróbica - Asociada y no asociada al crecimiento.

Anaer-Aer - Asociada al crecimiento en la primera -

etapa y no asociada en la segunda etapa de fermentación.

Anaer-Aer/ad - Una combinación de asociada y no asociada al crecimiento.

Para ambos medios de fermentación:

- El crecimiento obtenido en los experimentos a base de jugo cocido de limón es aproximadamente 50% menor que el encontrado en los experimentos control de glucosa bajo las mismas condiciones, excepto en el experimento con adiciones de jugo cocido de limón donde fué aproximadamente 75% menor que el de control de glucosa con adiciones.
- La utilización de las fuentes de carbono fueron simultáneas.
- Las velocidades específicas de crecimiento en las fermentaciones a base de jugo cocido de limón fueron menores que las encontradas en los experimentos control de glucosa.
- Presentaron el mismo comportamiento cinético de producción de vitamina B₁₂ (q_p) en función a la velocidad específica de crecimiento (μ) para las mismas condiciones de fermentación empleada.
- Las cantidades de vitamina B₁₂ por mol de sustrato ($Y_{p/s}$) obtenidas en el medio a base de jugo cocido de limón son menores que las encontradas en el medio control de glucosa bajo las mismas condiciones de aeración, excepto en las fermentaciones llevadas a cabo bajo condiciones anaeróbicas donde sus rendimientos son muy semejantes.
- Las cantidades de vitamina B₁₂ por gramo de células ($Y_{p/x}$) obtenida en el medio a base de jugo cocido de limón bajo condiciones anaeróbicas y aeróbica son mayores que las encontradas en el medio control de glucosa, sucediendo lo -

VII. CONCLUSIONES

- La capacidad de reducir nitratos por Propionibacterium -- shermanii ATCC 13673 depende de la expresión genotípica.
- La adaptación de P. shermanii ATCC 13673 a altas tensiones de oxígeno (en placa) posiblemente se deba a la selección de genotipos aerotolerantes, los cuales no producen vitamina B₁₂.
- En las fermentaciones dirigidas a producir vitamina B₁₂ - los antecedentes del inóculo son importantes, por lo que debe prepararse bajo condiciones anaeróbicas.
- Cierta cantidad de los azúcares y/o sustancias que reaccionan con el método de Ting, no son metabolizables por - éste microorganismo bajo las condiciones de trabajo empleadas.
- Cuando los constituyentes del medio control de glucosa y del medio base de jugo cocido de limón se esterilizaron - juntos, hubo mejor crecimiento que cuando se esterilizaron por separado.
- En el medio control de glucosa la producción de vitamina B₁₂ es independiente de como se esterilicen sus constituyentes. A diferencia del medio a base de jugo cocido de limón donde la producción de vitamina B₁₂ se incrementa - cuando sus constituyentes se esterilizan juntos.

En las fermentaciones control de glucosa:

- No importando las condiciones de aeración, el microorga--

contrario en las otras dos condiciones de fermentación.

- Las velocidades volumétricas de las fermentaciones a base de jugo cocido de limón fueron menores en comparación a las obtenidas en el medio control de glucosa.
- En general la productividad de vitamina B₁₂ es aproximadamente 50% menor en el medio a base de jugo cocido de limón bajo las mismas condiciones de aeración, excepto - la fermentación anaeróbica-aeróbica que es 75% menor.

VIII. RECOMENDACIONES

- Estudiar el planteamiento de modelos matemáticos que pudieran explicar de mejor manera la relación entre la velocidad específica de crecimiento con la utilización de sustrato y formación de vitamina B₁₂.
- La formación aeróbica fué la más eficiente para producción de vitamina B₁₂, por lo que se sugiere optimizar el nivel de aeración para incrementar su rendimiento.
- Una vez optimizado la aeración, optimizar el medio de cultivo para estas condiciones.
- Estudiar si la producción de ácido succínico en éstas fermentaciones puede ser canalizada e incrementar la síntesis de vitamina B₁₂ mediante la adición de glicina y otros factores, ya que son precursores de ésta.
- Realizar estudios para la obtención de mutantes hiperproductoras de vitamina B₁₂.
- Estas fermentaciones también pudieran ser estudiadas para la obtención de ácido succínico.

IX. ANEXOS

ANEXO I

CALCULO DE VELOCIDADES ESPECIFICAS

La velocidad específica (q) es la velocidad volumétrica (Q) dividida por la concentración celular (x) en un tiempo definido (ecuaciones 16, 18, 20 y 22 sección II.2). La velocidad volumétrica (ecuaciones 15, 17, 19 y 21 sección II. 2), es una velocidad de cambio de concentración con el tiempo, ésta puede ser determinada calculando la pendiente cada 12 h en la curva concentración vs tiempo.

En base a estos conceptos se calcularon las velocidades específicas para crecimiento (μ), consumo de sustratos (q_s) y formación de producto(s) (q_p) de la forma como se muestra en el siguiente ejemplo:

Ejemplo:

Fermentación anaeróbica de un medio control de glucosa, específicamente para el consumo de ácido láctico:

1°. Cálculo de la velocidad volumétrica para el consumo de ácido láctico. Q_{SL} :

Tomando en cuenta que se trata de un incremento -- (velocidad instantánea):

$$Q_{sL} = \frac{\Delta s}{\Delta t} = \frac{(9.106 - 1.909) \text{ g/l}}{(40 - 10) \text{ h}}$$

$$Q_{sL} = \underline{0.24 \text{ g/lh}}$$

único valor de la pendiente de consumo de ácido láctico en la fermentación anaeróbica.

2°. Cálculo de la velocidad específica para el consumo de ácido láctico, q_{sL} , a las 12 h de fermentación, cuando $x = 1.35 \text{ g/l}$:

$$q_{sL} = \frac{Q_{sL}}{x} = \frac{0.24 \text{ g/lh}}{1.35 \text{ g/l}}$$

$$q_{sL} = \underline{0.178 \text{ gr/gcelh}}$$

De igual forma se calcularon cada 12 h las velocidades específicas para cada uno de los parámetros en todas las fermentaciones, los resultados se muestran en las Tablas A y B.

TABLE 1

VELOCIDADES ESPECIFICAS (g/gces h) DE LAS FERMENTACIONES A DIFERENTES CONDICIONES DE AERACION DE UN MEDIO CONTROL DE GLUCOSA CON *Microplanibacterium shermanii* ATCC 13673

Tiempo (h.)	ANAEROBIOSIS					AEROBIOSIS				
	Crecimiento (p)	Consumo de glucosa	Consumo de Ac. láctico	Consumo de nitrógeno	Vitamina B ₁₂ producida	Crecimiento (p)	Consumo de glucosa	Consumo de Ac. láctico	Consumo de nitrógeno	Vitamina B ₁₂ producida
12:00	0.066	0.34	0.13	0.014	32.46	0.050	0.081	0.126	0.012	10.84
24:00	0.055	0.26	0.09	0.008	22.73	0.044	0.098	0.071	0.005	6.63
16:00	0.032	0.144	0.05	0.004	11.60	0.030	0.155	0.035	0.002	3.6
48:00	0.009	0.041	0.00	0.0024	5.0	0.006	0.020	0.000	0.0014	4.12
60:00	0.009	0.027	0.00	0.0024	3.92	0.0014	0.007	0.000	0.0016	14.30
72:00	0.003	0.006	0.00	0.0023	1.14	0.001	0.007	0.000	0.0005	3.10
84:00	0.000	0.000	0.00	0.009	0.00	-0.0003	0.007	0.000	0.000	1.12
96:00	0.000	0.000	0.00	0.000	0.00	-0.0003	0.004	0.000	0.000	0.11
108:00	0.000	0.000	0.00	0.000	0.00	-0.0003	0.000	0.000	0.000	-0.74
120:00	0.000	0.000	0.00	0.000	0.00	-0.0018	0.000	0.000	0.000	-2.01
132:00	0.000	0.000	0.00	0.000	0.00	--	0.000	0.000	0.0000	-6.56
144:00	0.000	0.000	0.00	0.000	0.00	--	0.000	0.000	0.000	--
	ANAEROBIOSIS-PERIODOSIS					ANAEROBIOSIS-AEROBIOSIS/ADICIONES				
12:00	0.066	0.27	0.17	0.014	29.20	0.059	0.232	0.165	0.017	33.33
24:00	0.050	0.16	0.09	0.012	15.74	0.052	0.130	0.076	0.010	11.54
36:00	0.044	0.15	0.08	0.005	8.51	0.040	0.112	0.052	0.0052	7.66
48:00	0.006	0.04	0.000	0.0014	4.82	0.027	0.078	0.000	0.0015	9.74
							0.121			
60:00	0.000	0.015	0.000	0.0003	3.31	0.020	0.092	0.000	0.0026	12.50
72:00	0.000	0.012	0.000	0.0004	1.81	0.017	0.074	0.000	0.0021	16.66
							0.088			
84:00	0.000	0.006	0.000	0.0004	0.00	0.014	0.073	0.000	0.0017	13.24
96:00	0.000	0.004	0.000	0.0004	1.47	0.006	0.032	0.000	0.0015	5.81
108:00	0.000	0.000	0.000	0.0000	4.62	0.004	0.023	0.000	0.000	3.15
120:00	0.000	0.000	0.000	0.0000	2.16	0.000	0.005	0.000	0.000	1.63
132:00	0.000	0.000	0.000	0.0000	2.90	0.000	0.009	0.000	0.000	0.35
144:00	0.000	0.000	0.000	0.0000	0.83	0.000	0.005	0.000	0.000	-0.64

VELOCIDADES ESPECIFICAS (g/gcel h) DE LAS FERMENTACIONES A DIFERENTES CONDICIONES DE AERACION
DE UN MEDIO A BASE DE JUGO COCCIDO DE LIMON CON Propionibacterium shermanii ATCC 13673

ANAEROBIOSIS							
Tiempo (h.)	Crecimiento (D)	Consumo de azúcar	Consumo de Ac. láctico	Consumo de Ac. cítrico	Consumo de nitrógeno	Acido succínico producido	Vitamina B ₁₂ producido
12:00	0.047	0.123	0.169	0.043	0.0024	0.011	29.02
24:00	0.035	0.082	0.189	0.029	0.0016	0.019	19.35
36:00	0.030	0.052	0.188	0.018	0.0010	0.031	19.35
48:00	0.008	0.023	0.000	0.014	0.0009	0.012	7.19
60:00	0.000	0.010	0.000	0.014	0.0008	0.006	5.60
72:00	0.000	0.0045	0.000	0.014	0.0008	0.0034	2.45
84:00	0.001	0.000	0.000	0.014	0.0008	0.000	0.00
96:00	0.001	0.000	0.000	0.013	0.0008	0.000	0.00
108:00	0.001	0.000	0.000	0.013	0.0008	0.000	0.00
120:00	0.0065	0.000	0.000	0.127	0.0007	0.000	1.25
132:00	0.0137	0.000	0.000	0.011	0.0006	0.000	3.91
144:00	0.0064	0.000	0.000	0.0095	0.0005	0.000	3.47
156:00	0.004	0.000	0.000	0.0092	0.0005	0.000	3.33
AEROBIOSIS							
12:00	0.051	0.127	0.142	0.077	0.0017	0.0161	56.55
24:00	0.028	0.051	0.179	0.054	0.0012	0.023	6.25
36:00	0.015	0.014	0.141	0.042	0.0010	0.018	4.90
48:00	0.003	0.0051	0.000	0.039	0.0009	0.0033	0.00
60:00	0.003	0.000	0.000	0.038	0.0009	0.0032	3.82
72:00	0.003	0.000	0.000	0.038	0.0008	0.0032	8.77
84:00	0.004	0.000	0.000	0.036	0.0008	0.0000	4.24
96:00	0.006	0.000	0.000	0.034	0.0008	0.0000	1.56
108:00	0.006	0.000	0.000	0.032	0.0007	0.0000	1.49
120:00	0.005	0.000	0.000	0.030	0.0007	0.0000	0.43
132:00	0.003	0.000	0.000	0.029	0.0007	0.0000	-2.08
144:00	0.003	0.000	0.000	0.028	0.0006	0.0000	-2.00
156:00	0.003	0.000	0.000	0.026	0.0006	0.0000	--
168:00	0.003	0.000	0.000	0.025	--	0.0000	--

TABLA B
(continuación)

ANAEROBIOSIS-AEROBIOSIS							
Tiempo (h.)	Crecimiento (u)	Consumo de azúcar	Consumo de Ac. láctico	Consumo de Ac. cítrico	Consumo de nitrógeno	Acido succínico producido	Vitamina B ₁₂ producido
12:00	0.048	0.077	0.112	0.119	0.005	0.022	19.02
24:00	0.026	0.040	0.112	0.126	0.003	0.011	12.85
36:00	0.011	0.022	0.150	0.134	0.002	0.008	6.17
48:00	0.010	0.018	0.000	0.141	0.0021	0.008	5.34
60:00	0.005	0.008	0.000	0.138	0.002	0.010	1.94
72:00	-0.0006	0.005	0.000	0.093	0.001	0.003	-1.19
84:00	-0.0018	0.000	0.000	0.052	0.000	0.000	-1.28
96:00	-0.0018	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.18
108:00	0.0009	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	3.57
120:00	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	3.57
132:00	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	3.45
144:00	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.80
156:00	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00
168:00	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.52
ANAEROBIOSIS-AEROBIOSIS/ADICIONES							
12:00	0.067	0.353	-0.159	0.083	0.008	0.012	13.16
24:00	0.020	0.191	0.000	0.045	0.004	0.017	1.90
		0.064		0.036			
36:00	0.009	0.058	0.104	0.032	0.004	0.014	3.66
48:00	0.002	0.052	0.000	0.029	0.003	0.013	3.74
		0.017		0.032			
60:00	-0.003	0.017	0.000	0.033	0.0015	0.013	6.8
72:00	-0.005	0.018	0.000	0.034	0.0025	0.008	0.00
		0.014		0.018			
84:00	-0.008	0.016	0.000	0.021	0.0014	0.005	-11.44
96:00	-0.004	0.014	0.000	0.006	0.001	0.004	-4.46
108:00	0.0008	0.008	0.000	0.005	0.000	0.002	-1.95
120:00	0.003	0.002	0.000	-0.016	0.000	0.0002	--
132:00	0.006	0.000	0.000	-0.050	0.000	-0.00019	--
144:00	0.000	0.000	0.000	0.0125	0.000	-0.0018	--
156:00	-0.006	0.000	0.000	0.024	0.000	--	---

ANEXO II

CALCULO DE RENDIMIENTOS

La eficiencia de una fermentación puede estimarse en base a la capacidad de un microorganismo para utilizar el sustrato en la formación de material celular ($Y_{x/s}$), como fuente de energía (Y_{ATP}) y para formación de producto -- ($Y_{p/s}$) y ($Y_{p/x}$).

Para el cálculo de los rendimientos se consideró la - producción y el consumo máximo. Con un ejemplo se dará a conocer la metodología seguida para este cálculo.

Ejemplo:

Fermentación aeróbica de un medio control de glucosa, - específicamente se hará el cálculo de rendimiento para vitamina B₁₂ por gramo de células ($Y_{p/x}$).

$$Y_{P/x} = \frac{B_{12f} - B_{12i}}{x_f - x_i}$$

donde:

- B_{12f} = Producción máxima de vitamina B₁₂ en mcg/l
- B_{12i} = Cantidad de vitamina B₁₂ a tiempo cero - en mcg/l.
- x_f = Peso seco celular a la máxima producción de vitamina B₁₂, en g/l,
- x_i = Peso seco celular a tiempo cero en g/l.

$$Y_{p/x} = \frac{4358.9 - 0 \text{ (mcg/l)}}{8.56 - 0.59 \text{ (g}_{cel}/1)} = 546.52 \text{ mcg}_{B_{12}} / \text{g}_{cel}$$

De igual forma se realizaron los cálculos para $Y_{P/N}$ -- $Y_{x/s}$. $Y_{x/mol}$ de sust. y Y_{xATP} para las fermentaciones control de glucosa se explica en el mismo texto (VII.1D). Para el rendimiento de vitamina B_{12} y succínico por mol de sustrato, se realizó tomando en cuenta las moles de glucosa y ácido láctico en el caso de las fermentaciones control de glucosa y las moles de azúcares (glucosa), ácido láctico y ácido cítrico en el caso de las fermentaciones a base de jugo cocido de limón como por ejemplo:

Fermentación anaeróbica en medio control de glucosa, específicamente para $Y_{B_{12}}$ /mol de sustrato

$$Y_{B_{12}}/\text{mol de sustrato} = \frac{B_{12f} - B_{12i}}{\text{mol de glucosa} + \text{mol de ác. láctico}}$$

$$Y_{B_{12}}/\text{mol sustrato} = \frac{2660}{0.1292 + 0.1642} = \frac{9066.12 \text{ mcg}_{B_{12}}}{\text{mol}} \text{ --}$$

sustrato

De la misma manera se calculó para todas las demás fermentaciones.

ANEXO III

CALCULO DE MASA CELULAR PROPORCIONADA POR AZUCAR, ACIDO CITRICO Y ACIDO LACTICO DEL MEDIO A BASE DE JUGO COCIDO DE LIMON

Por facilidad de cálculos se hizo uso de los rendimientos molares ($Y_{x/mol}$) obtenido en la fermentación con glucosa bajo condiciones anaeróbicas, 38.16 gcel/mol de glucosa y 4.77 gcel/mol de ácido láctico, determinándose los gramos de células proporcionados por cada una de las fuentes de carbono del medio de fermentación para las condiciones anaeróbica, anaeróbica-aeróbica y anaeróbica-aeróbica/adiciónes de jugo cocido de limón.

Partiendo de la expresión de rendimiento molar ($Y_{x/mol}$):

$$Y_{x/mol} = \frac{\Delta x}{\Delta s} \quad (1)$$

se llevaron a cabo todos los cálculos.

donde:

Δx = Cantidad de biomasa producida, en g/l.

Δs = Cantidad de sustrato consumido (A - azúcar, L - ácido láctico y C - ácido cítrico), en moles/litro.

Fermentación Anaeróbica

$$Y_{G \ x/mol} = 38.16 \text{ g}_{\text{cel}}/\text{mol} \text{ de glucosa (de la Tabla XV)}$$

$$\Delta s_A = A_i - A_f = 17.14 - 10.79 \text{ (g/l)}$$

$$= 6.35 \text{ g/l}/180 \text{ g/mol}$$

$$\Delta s_A = 0.0353 \text{ moles}$$

donde:

- A_i = Cantidad de azúcar (glucosa) a tiempo cero, en g/l
- A_f = Cantidad de azúcar (glucosa) al tiempo de máximo consumo, en g/l
- 180 g/mol = peso molecular de la glucosa.

despejando de la ecuación (1), Δx_A :

$$\begin{aligned}\Delta x_A &= (Y_{x/mol}) (\Delta s_A) \\ &= (38.16) (0.0353) = \underline{1.3462 \text{ g de células/l}}\end{aligned}$$

por otro lado se tiene:

$$Y_L \text{ x/mol} = 4.77 \text{ g}_{\text{cel}}/\text{mol}_L \quad (\text{de la tabla XV})$$

$$\begin{aligned}\Delta s_L &= L_i - L_f = 11.63 - 0.0 \text{ (g/l)} \\ &= 11.63 \text{ g/l} / 90 \text{ g/mol} \\ &= 0.1292 \text{ moles}\end{aligned}$$

donde:

- L_i = Cantidad de ácido láctico a tiempo cero, en g/l
- L_f = Cantidad de ácido láctico al tiempo de máximo consumo, en g/l.
- 90 g/mol = peso molecular del ácido láctico

por lo tanto, de la ecuación (1), Δx_L :

$$\Delta x_L = (4.77) (0.1292) = \underline{0.6163 \text{ g de células /l}}$$

y, por consiguiente la cantidad de células producidas a partir del ácido cítrico se calcula haciendo uso de la siguiente expresión:

$$\Delta x_T = \Delta x_A + \Delta x_L + \Delta x_C \quad (2)$$

$$\Delta x_C = \Delta x_T - (\Delta x_A + \Delta x_L)$$

donde:

Δx_T = Cantidad de células producidas en la fermentación, en g/l. $\Delta x_T = x_f - x_i$ = Cantidad de células producidas al final de la fermentación - cantidad de células al inicio de la misma.

Δx_A = Cantidad de células producidas a partir de los azúcares consumidos, en g/l.

Δx_L = Cantidad de células producidas a partir del -- ácido láctico consumido, en g/l.

Δx_C = Cantidad de células producidas a partir del -- ácido cítrico consumido, en g/l.

de la ecuación (2):

$$\Delta x_C = 3.46 - 1.9625 = \underline{1.4975 \text{ g de células/l}}$$

donde:

$$\Delta x_T = x_f - x_i = 3.75 - 0.29 = 3.46 \text{ g/l}$$

calculando el rendimiento molar de crecimiento para ácido cítrico, se tiene:

$$Y_{x/mol} = \frac{1.4975 \text{ g de cel/l}}{5 \text{ g/l} / 210 \text{ g/mol}} = 62.92 \text{ g}_{\text{cel}}/\text{mol}_{\text{cit}}$$

donde:

$$\begin{aligned} 210 \text{ g/mol} &= \text{peso molecular del ácido cítrico} \\ \Delta s_C &= S_i - S_f = 23.68 - 18.68 = 5 \text{ g/l} \end{aligned}$$

y, el rendimiento por gramo de sustrato:

$$Y_{x/s} = \frac{62.92 \text{ g de cel/mol de cit}}{210 \text{ g/mol}} = 0.30 \text{ g}_{\text{cel}}/\text{g}_{\text{cit}}$$

Fermentación Anaeróbica-Aeróbica

$$Y_{G \text{ x/ml}} = 38.16 \text{ g}_{\text{cel}}/\text{mol}_G \quad (\text{de la Tabla XV})$$

$$\begin{aligned} \Delta s_A &= 17.15 - 12.56 \text{ (g/l)} = 4.59 \text{ g/l} / 180 \text{ g/mol} \\ &= 0.0255 \text{ moles} \end{aligned}$$

de la ecuación (1):

$$\Delta x_A = (38.16) (0.0255) = \underline{0.97308 \text{ g de células/l}}$$

por otro lado se tiene:

$$Y_{L \text{ x/mol}} = 4.77 \text{ g}_{\text{cel}}/\text{mol}_L \quad (\text{de la Tabla XV})$$

$$\begin{aligned} \Delta s_L &= 11.63 - 0.0 \text{ (g/l)} = 11.63 \text{ g/l} / 90 \text{ g/mol} \\ &= 0.1292 \text{ moles} \end{aligned}$$

de la ecuación (1)

$$\Delta x_L = (4.77) (0.1292) = \underline{0.6163 \text{ g de células/l}}$$

por otro lado, lado la cantidad de células producidas por el consumo de ácido cítrico será.

de la ecuación (2):

$$\Delta x_C = 2.95 - 1.58938 = \underline{1.36062 \text{ g de células/l}}$$

donde:

$$\Delta x_T = x_f - x_i = 3.3 - 0.35 = 2.95 \text{ g/l}$$

Debido a que en ésta fermentación se consumió todo el ácido cítrico, se consideró que se obtiene el mismo rendimiento ($Y_{x/sC}$) de 0.30 g_{cel}/g_{cit} que la fermentación anaeróbica, rendimiento que señala que solo 4.535 g de ácido cítrico fué utilizado para la formación de material celular y el resto (19.145 g/l) para síntesis de productos metabólicos.

$$Y_{x/s} = \frac{1.36062 \text{ g cel/l}}{S_C} = 0.3 \text{ g}_{cel}/\text{g}_{cit}$$

$$S_C = 4.535 \text{ g/l}$$

$$\Delta S_C = 23.68 - 4.535 = 19.145 \text{ g/l}$$

Fermentación Anaeróbica-Aeróbica/adiciones de jugo cocido de limón.

Tenemos:

$$Y_{G \ x/ml} = 38.16 \text{ g}_{cel}/\text{mol}_G \quad (\text{de la Tabla XV})$$

$$\begin{aligned}\Delta S_A &= 16.12 + 5.56 \text{ (g/l)} = 21.68 \text{ g/l} / 180 \text{ g/mol} \\ &= 0.1204 \text{ moles}\end{aligned}$$

donde:

$$16.12 = 32.84 - 16.72 \text{ (g/l)} \quad (\text{de la Tabla XX})$$

$$5.56 = 18.84 - 13.29 \text{ (g/l)}$$

$$\begin{aligned}\Delta S_L &= 23.65 - 11.63 \text{ (g/l)} = 12.03 \text{ g/l} / 90 \text{ g/mol} \\ & \quad (\text{de la Tabla XX})\end{aligned}$$

$$= 0.1336 \text{ moles de ácido láctico producido.}$$

El análisis de la Figura 34 indica que el ácido láctico producido en la fermentación proviene de la glucosa añadida al medio y tomando en cuenta que por cada mol de glucosa se producen 2 moles de ácido láctico, entonces, 0.0668 moles de glucosa se emplearon para formar 0.1336 moles de ácido láctico, y, por consiguiente, de las moles totales de azúcar (0.1204) solo 0.0536 moles pasaron a formar parte del material celular, hasta las 48 h de fermentación.

de la ecuación (1):

$$\Delta X_A = (0.0536) (38.16) = \underline{2.0453 \text{ g de células/l}}$$

Hasta el máximo crecimiento, el microorganismo consumió la siguiente cantidad de ácido láctico para la formación de material celular:

$$\Delta S_{L \text{ consumido}} = \text{Cantidad total de ácido láctico} - \text{Cantidad de ácido láctico residual (moles/l)}$$

donde: Δs_L consumido = Cantidad de ácido láctico consumido en moles/l

$$\Delta s_L \text{ cons} = 23.63 - 10.48 = 13.17 \text{ g/l} / 90 \text{ g/mol}$$
$$= 0.1463 \text{ moles}$$

por lo tanto:

$$\Delta x_L = (4.77) (0.1463) = \underline{0.6980 \text{ g de células/l}}$$

de la ecuación (2):

$$\Delta x_C = 4.0 - 2.7433 = \underline{1.2567 \text{ g de células/l}}$$

donde:

$$\Delta x_T = x_f - x_i = 4.3 - 0.3 \text{ (g/l)} = 4.0 \text{ (g/l)}$$

Haciendo la misma consideración del experimento anterior, se tomó en cuenta que el rendimiento por sustrato para cítrico es de $0.30 \text{ g}_{\text{cel}}/\text{g}_{\text{cit}}$ consumiéndose solamente 4.189 g de ácido cítrico para formación de material celular y el resto (2.411) para síntesis de productos metabólicos.

$$Y_{x/s} = \frac{1.2567 \text{ g cel/l}}{s_C} = 0.3 \text{ g}_{\text{cel}}/\text{g}_{\text{cit}}$$

$$s_C = 4.189$$

$$\Delta s_C = 6.6 - 4.189 = 2.411 \text{ g/l}$$

Fermentación Aeróbica.

De igual forma como se hicieron las consideraciones en las fermentaciones anteriores, para determinar la cantidad de células proporcionada por cada uno de los sustratos del medio de fermentación cuando la fermentación se realizó bajo condiciones aeróbicas, se hizo uso de los rendimientos molares obtenidos en la fermentación donde se utilizó glucosa como fuente de carbono, 69.50 g_{cel}/mol_{glucosa} y 8.7 g_{ce}/mol láctico.

$$Y_G = x/mol = 69.59 \text{ g}_{\text{cel}} / \text{mol}_G \quad (\text{de la Tabla XV})$$

$$\begin{aligned} \Delta s_A &= 17.41 - 12.42 \text{ (g/l)} = 4.99 \text{ g/l} / 180 \text{ g/mol} \\ &= 0.0277 \text{ moles} \end{aligned}$$

De la ecuación (1):

$$\Delta x_A = (69.59) (0.0277) + \frac{1.9292 \text{ g de células/l}}{}$$

Por otro lado se tiene:

$$Y_L x/mol = 8.7 \text{ g}_{\text{cel}} / \text{mol}_L$$

$$\begin{aligned} \Delta s_L &= 11.63 - 0.0 \text{ (g/l)} = 11.63 \text{ g/l} / 90 \text{ g/l} \\ &= 0.1292 \text{ moles} \end{aligned}$$

por lo tanto, de la ecuación (1):

$$\Delta s_L = (8.7) (0.1292) = \underline{1.1240 \text{ g de células/l}}$$

y, por consiguiente, la cantidad de células producidas a partir del ácido cítrico será:

de la ecuación (2):

$$\Delta x_C = 3.88 - 3.0532 = \underline{0.8268 \text{ g de células/l}}$$

donde:

$$\Delta x_T = x_f - x_i = 4.25 - 0.37 = 3.88 \text{ g/l}$$

por lo tanto, el rendimiento molar será:

$$Y_{x/mol C} = \frac{0.8268 \text{ g de cel/l}}{17.28 \text{ g/l} / 120 \text{ g/mol}} = 10.05 \text{ g de células/mol}_C$$

donde:

$$\Delta s_C = s_i - s_f = 23.68 - 6.4 = 17.28.$$

y, el rendimiento por gramo de sustrato, cítrico:

$$Y_{x/s_C} = \frac{Y_{x/mol C}}{\text{Peso molec}_C} = \frac{10.05 \text{ g de células/g de cít.}}{210 \text{ g/mol}}$$
$$= 0.05 \text{ g de células/g de cítrico}$$

X. BIBLIOGRAFIA

- 1 - Aiba, S.; Humphrey, A.E.; Millis, N.F.
Biochemical Engineering
Chapter 4, pages 110-119
2th edition
University of Tokyo Press (1973).
- 2 - Bailey, J.E.; Ollis, D.F.
Biochemical Engineering Fundamentals.
Chapter 7, pages 371-375
McGraw-Hill Book Company (1977).
- 3 - Bauchop, T. and Eldsden, S.R.
Microbial Growth in Relation to their Energy Supply
Journal of General Microbiology 23 457-469 (1961).
- 4 - Bergey's
Manual of Determinative Bacteriology
pages 633-639
8th edition
Williams & Wilkins (1975).
- 5 - Berry, E.C. and Bullerman, L.B.
Use of Cheese Whey for Vitamin B₁₂ Production, I Whey
Solids and Yeast Extract Levels
Applied Microbiology 14 (3) 353-355 (1966).
- 6 - Berry, E.C. and Bullerman, L.B.
Use of Cheese Whey for Vitamin B₁₂ Production,
II Cobalt, Precursor and Aeration Levels
Applied Microbiology 14 (3) 356-357 (1966).

- 7 - Berry, E.C. and Bullerman, L.B.
Use of Cheese Whey for Vitamin B₁₂ Production,
III Growth Studies and Dry-Weight Activity.
Applied Microbiology 14 (3) 358-360 (1966).
- 8 - Charlot, G.
Análisis Cualitativo Rápido de Cationes y Aniones
páginas 63-64
2a edición
Alhambra (1968).
- 9 - Cooney, Ch.L.
Growth of Microorganisms
in Rehm, H. J. and Reed, G.
Biotechnology
Vol. 1, cap. 2 páginas 75-112
Verlag Chemie (1981).
- 10 - De Vries, W.; Wilhelmina, M.C.; Van Wijck-Kapteijn and
Stouthamer, A.H.
Influence of Oxygen on Growth, Cytochrome Synthesis
and Fermentation Pattern in Propionic acid Bacteria.
Journal of General Microbiology (71) 515-524 (1972).
- 11 - De Vries, W.; Willemina, M.C.; Van Wick-Kapteyn and
Stouthamer, A.H.
Generation of ATP During Cytochrome-linked Anaerobic
Electron Transport in Propionic Acid Bacteria
Journal General Microbiology (76) 31-41 (1973).
- 12 - Fisher, R.A.
Rapid Spectrophotometric Determination of Vitamin B₁₂
in Microbial Material.
Agr. Food Chem. (11) 951-953 (1954).

- 13 - Florent, J. and Ninet, L.
Vitamin B₁₂
Microbial¹² Technology
Vol 1, chap 15 pags 457-519
2th edition
Academic Press Inc. (1979).
- 14 - Gaden, E.L. Jr.
Fermentation Process Kinetics
Journal Biochem. Microbiol. Technology Engineering 1
413-429 (1959).
- 15 - Hettinga, D.H. and Reinbold, G.W.
The Propionic Acid Bacteria-A Review, I Growth.
Journal Milk Food Technol. 35 (5) 295-301 (1972).
- 16 - Hettinga, D.H. and Reinbold, G.W.
The Propionic Acid Bacteria-A Review, II Metabolisms.
Journal Milk Food Technol. 35 (6) 358-372 (1972).
- 17 - Hettinga, D. H. and Reinbold, G.W.
The Propionic Acid Bacteria-A Review III Miscellaneous
Metabolic Activities
Journal Milk Food Technol. 35 (7) 436-447 (1972).
- 18 - Ibragimova, S.I. and Shul'govskaya, E.M.
Growth of Propionibacterium shermanii Culture under
Various Aeration Conditions
Mikrobiologiya 48 (4) 668-671, July-August (1979).
- 19 - Inn Hee Lee, A.G.; Fredrickson and Tsuchiya, H.M.
Growth of Propionibacterium shermanii
Applied Microbiology 28 (5) 831-835, Nov (1974).
- 20 - Instituto Mexicano de Comercio Exterior (1980)
Depto. de Promoción, Ind., México.

- 21 - Lapage, S.P.; Shelton, J.E. and Mitchell, T.G.
Media for the Maintenance and Preservation of Bacteria
in Norris, J. R. and Ribbons, D.W.
Methods in Microbiology
pages 109-126
London Academic Press (1970).
- 22 - Lennette, E.H.; Spaulding, E.H.; Truant, J.P.
Manual of Clinical Microbiology
Chap 37, pages 363-364
2th edition
American Society for Microbiology (1974).
- 23 - Lennette, E.H.; Spaulding, E.H.; Truant, J.P.
Manual of Clinical Microbiology
Chap 38, pages 365-375
2th edition
American Society for Microbiology (1974).
- 24 - Linch, M.J.; Raphael, S.S.; Mellor, L.D.; Spare, P.D.;
Inwood, M.J.H.
Métodos de Laboratorio
Cap 13, pages 563-564
2a. edición
Interamericana (1972).
- 25 - Linch, M.J.; Raphael, S.S.; Mellor, L.D.; Spare, P.D.;
Inwood, M.J.H.
Métodos de Laboratorio
Cap 27 pags 968
2a. edición
Interamericana (1972)
- 26 - Luedeking, R. and Piret, E.L.
Transient and Steady States in Continuous Fermentation
Theory and Experiment
Journal Biochem. Microbiology Technology Engineering
(1) 431-459 (1959).

- 27 - Luedeking, R.
Fermentation Kinetics
in Blakebrough, N.
Biochemical and Biological Engineering Science
Vol. 1, cap 6, pags 202-210.
Academic Press (1967).
- 28 - Manual de Técnicas de Laboratorio
Facultad de Medicina y Zootecnia, UNAM (1978).
- 29 - Monod, J.
The Growth of Bacterial Cultures
Ann Rev. Microbiol. (3) 371-393 (1949).
- 30 - Note, A. J.; Van Loesecke, H.W. and Pulley, G.N.
Feed Yeast and Industrial Alcohol
Industrial and Engineering Chemistry 34 (6) 670-673,
June (1942).
- 31 - Pérez, M.J.L. y García, H.F.
Utilización de Subproductos Industriales del Limón
Mexicano por vía Fermentativa
Memoria del Simposium "La Investigación, el Desarrollo
Experimental y la Docencia en Conafrut durante 1979"
(1) 172-195 (1980).
- 32 - Pérez, M.J.L.
Utilización de Productos Industriales del Limón Mexi-
cano por vía Fermentativa para la Producción de Vita-
mina B₁₂
Tesis de Maestría, Conafrut (1981).
- 33 - Pritchard, G.G.; Wimpenny, J.W.T.; Norris, H.A.; Mary,
W.A.; Lewis and Hughes, D.E.
Effects of Oxigen on Propionibacterium shermanii Growth
in Continuos Culture
Journal of General Microbiology (102) 223-233 (1977).

- 34 - Proyecto de Internado de la Alumna Martha Franco
(Estudio sobre el incremento del contenido protéico .
en la pulpa de henequen por fermentación semisólida.
Desarrollado en el Instituto de Investigaciones Biomé-
dicas (UNAM) Depto. de Biotecnología. (1978).
- 35 - Quintero, R.R.
Análisis de Alternativas para la Producción Industrial
de Proteína a partir de Celulosa
en Monroy, O. y Viniegra, G.
Biotecnología para el Aprovechamiento de los Desperdi-
cios Orgánicos. págs. 177-189
AGT Editor, S.A. (1981).
- 36 - Shaforostova, L.D.; Ivanova, I.I.; Sul'govskaya, E.M.
and Rabotnova, I.L
Growth of Microorganism During Exponential Phase
Biotechnol & Bioeng. Symp. (4) 175-187 (1973).
- 37 - Speedie, J.D. & Hull, G.W.
U.S. Patent 2,951,017.
- 38 - Solomons, G.L
Material and Methods in Fermentation
Chap 3, pages 115-132
Academic Press (1969).
- 39 - Stanier, R.V.; Doudoruff, M. and Adelberg, E.A.
The Microbial World
Chap 9, pages 298-324
3th edition
Prentice-Hall, Inc. (1970).
- 40 - Southamer, A.H.
Determination and Significance of Molar Growth Yields
in Norris and Ribbons
Methods in Microbiology
Chap XXI, pages 629-663. vol 1
Academic Press (1969).

- 41 - Ting, S.V.
Rapid Colorimetric Methods for Simultaneous Determination of Total Reducing Sugar and Fructose in Citrus Juices.
Agricultural and Food Chem. (4) (363-366 (1956).
- 42 - Viniegra, G.C.
Consideraciones Económicas Sobre el Aprovechamiento de los Desperdicios Agrícolas, Ganaderos y Agroindustriales.
Monroy, O. y Viniegra, G.
Biotecnología para el aprovechamiento de los desperdicios orgánicos. págs. 19-29
AGT Editor, S.A. (1981).
- 43 - Wang, D.I.C.; Cooney, Ch.L.; Demain, A.L.; Dunnill, P.; Humphrey, E. and Lilly, M.D.
Fermentation and Enzyme Technology
Chap 6, pages 57-97,
John Wiley & Sons, Inc. (1979).