

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO
DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE PRODUCCION DE
VITAMINA B12 PARA EL CULTIVO CONTINUO DE
Propionibacterium shermanii

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A

ALEJANDRO ALBERTO AZAOLA ESPINOSA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

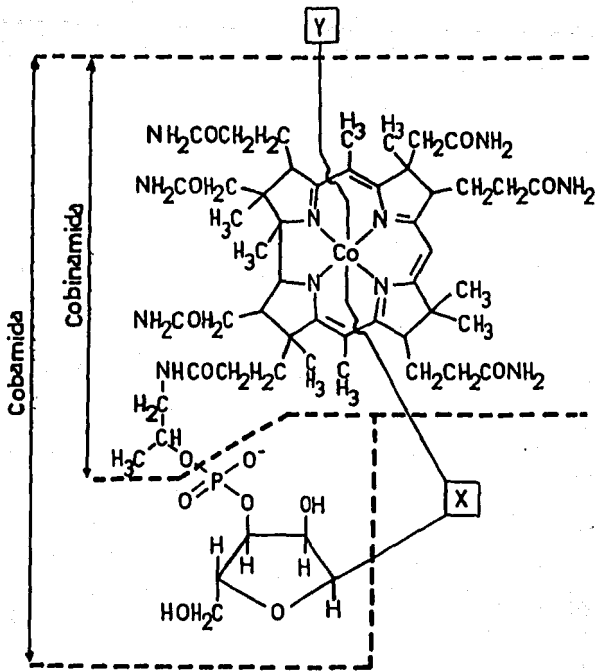
CAPITULO I

INTRODUCCION

Desde que se observo que la anemia perniciosa podia curarse con una dieta que incluyera higado, los investigadores se dieron a la tarea de descubrir la substancia que provocaba la curacion, hasta que en 1948, este factor fue finalmente aislado en forma cristalina por el grupo de E.L. Smith en Inglaterra y por el grupo de Rickes y Folker en E.U.A.. A esta substancia se le conoce actualmente como Vitamina B₁₂ (Lehninger, 1975). En la figura 1 aparece la estructura de esta molecula.

Esta vitamina se requiere en cantidades muy pequenas en el organismo; la sangre humana contiene normalmente 0.0002 mcg. de vitamina por mililitro. Es un compuesto importante para la maduracion de las celulas sanguineas y como factor de crecimiento en muchas especies animales (Florent & Ninet, 1979). Su deficiencia es mas notoria en los rumiantes que en otros animales, debido a que no pueden metabolizar el acido propionico producido por la fermentacion bacteriana del rumen (Kasiro & Ochoa, 1964).

La vitamina B₁₂ es cofactor, en forma de coenzima B₁₂, de la metilmalonil-CoA-mutasa; enzima que interviene en la oxidacion de los acidos grasos de numero impar. Los enfermos de anemia perniciosa



Cobalamina

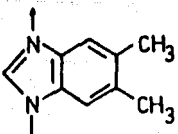
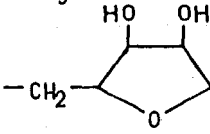
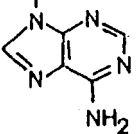
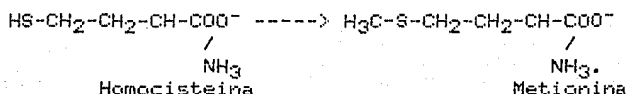
X	Y	Nombre común
	-CN	Vitamina B ₁₂
	-OH	Vitamina B ₁₂ 2
	-CH ₃	Mecobalamina
		Cobinamida o coenzima B ₁₂
		

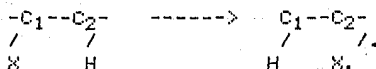
FIGURA 1. Estructura de la vitamina B₁₂ y compuestos relacionados

excretan grandes cantidades de metilmalonato en orina (aciduria metilmalonica). El tratamiento para su curacion consiste en administrar esta vitamina para reducir la excrecion de este compuesto a niveles normales (Kasiro & Ochoa, 1964).

La vitamina B₁₂ tambien participa como intermediario en la transferencia de grupos metilo del N⁵-metiltetrahidrofolato a la homocisteina, para la formacion de la metionina:



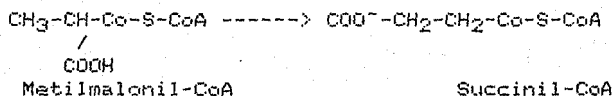
Por otra parte, este compuesto interviene tambien en la reaccion enzimatica trasladando atomos de hidrogeno entre atomos de carbono adyacentes. Esta reaccion se presenta en la reduccion del atomo de carbono 2 del ribonucleotido 5'-trifosfato, al 2'-deoxinucleosido trifosfato (Cohen, G.1979):



En la isomerizacion del glutamato a beta-metilaspargato, la vitamina esta involucrada en forma de coenzima de la enzima beta-metilaspargatomutasa. Esta enzima, presente en bacterias del genero de las propionibacterias y en Clostridium tetranomorphum tienen gran afinidad por la coenzima B₁₂.

En extractos de Aerobacter aerogenes, la cianocobalamina en forma de coenzima, participa en la reaccion de deshidratacion del 1,2-propanodiol a propionaldehido y de etilenglicol a beta-hidroxipropionaldehido.

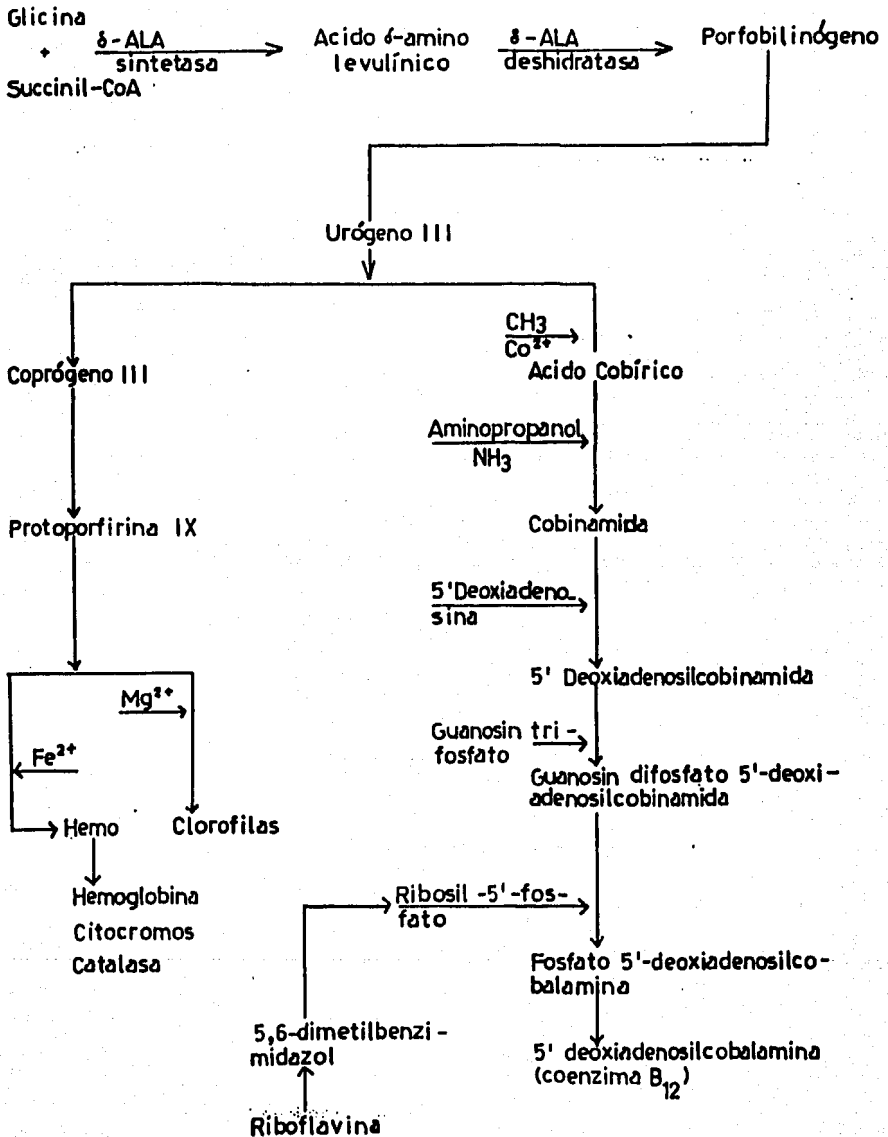
En el caso de las propionibacterias, el proceso matabolico de mayor importancia es la produccion de acido propionico. La coenzima B₁₂ juega un papel muy importante en la sintesis de intermediarios de este producto, catalizando como cofactor de la enzima Metilmalonil-CoA-mutasa, que lleva a cabo la conversion de metilmalonil-CoA a Succinil-CoA (Kasiro & Ochoa, 1964):



CAPITULO II

BIOSINTESIS DE LA VITAMINA B₁₂

La biosíntesis de la vitamina B₁₂ se inicia en condiciones anaerobias con la formación del sistema de la corrina, y bajo condiciones aerobias, se sintetiza y se incorpora el nucleótido 5,6-dimetilbencimidazol (5,6-DMB) (figura 1). El ácido delta-aminolevulinico (delta-ALA) es formado como resultado de la condensación de la glicina con el ácido succínico. En seguida, la condensación de dos moléculas de delta-ALA forman el porfobilinógeno. Estos compuestos son precursores de la biosíntesis de la vitamina B₁₂ y de otros compuestos tetrapirrólicos, como son las porfirinas, hemo y clorofilas. (Schwartz, S. y col., 1959). Las enzimas que inician esta vía biosintética son la delta-ALA sintetasa y la delta-ALA deshidratasa, respectivamente (figura 2). Se ha considerado que estas dos enzimas son los principales sitios de control de los tetrapirroles (Lascelles, J., 1960, 1966; Burton, G., 1981). La actividad de ambas enzimas es de 4 a 5 veces menor en extractos libres de células crecidas en aerobiosis y oscuridad, que en aquellos extractos obtenidos de células crecidas en condiciones microaerofílicas y con luz, aunque en células completas el efecto del oxígeno es menor (Menon, A., 1967 y Burton, G., 1981).



RUTA GENERAL PARA LA BIOSINTESIS DE COBALAMINAS

FIGURA 2. Ruta general de biosíntesis de las Cobalaminas.

La formación de los compuestos anteriores coincide con la biosíntesis del urogeno III, la metilación del urogeno III, con la descarboxilación simultánea de la cadena lateral del ácido acético en el carbono 12 del anillo C (Scott, A.I., 1975). Se ha demostrado que la metionina es la fuente de grupos metilo del anillo corrinóide (Céspedes, B., 1986). Posteriormente se incorpora el cobalto en la molécula metilada derivada del urogeno III, formando la corrifina (Bykhovskii, V., 1976). Esta incorporación es una condición necesaria para la siguiente reducción, acompañada de una metilación adicional y la ruptura del puente metino entre los anillos A y D, formando el ácido cobirínico (Scott, A.I., 1975; Bykhovskii, V., 1976). La amidación de las cadenas laterales de la vitamina ocurre en diferentes momentos de la síntesis, siendo la glutamina la fuente de los grupos amida (Veliseev, A. A., 1986).

El ácido cobirínico así formado, es amidado y se le incorpora una molécula de aminoisopropanol (Lowe, D., 1970). El nucleótido 5,6-DMB se incorpora a la vitamina como el nucleótido ribosil-5'-fosfato, para formar el fosfato-5'-desoxiadenosilcobalamina y posteriormente, la coenzima B₁₂ (Horig, J.A., 1978; Hollriegel, V., 1982).

Por otro lado, el género de las propionibacterias posee los componentes de una típica cadena transportadora de electrones, que incluyen enzimas deshidrogenasas unidas a membrana (Pritchard, G., 1977), menaquinonas y citocromos (Pritchard, G., 1977; De Vries, 1973), y posee todas las enzimas del ciclo de los ácidos

tricarboxilicos, pudiendo oxidar intermediarios de esta via (I'bragimova, S., 1980a, 1980b). Cuando la bacteria crece en condiciones anaerobicas la cantidad de citocromos es mayor que en condiciones aerobicas (De Vries, W., 1972) y esto tal vez se debe a la inhibicion del oxigeno sobre las enzimas delta-ALA-sintetasa y delta-ALA-deshidratasa, que controlan la via de sintesis de estos compuestos (Lascelles, J., 1960, 1966). Asi tambien, Menon (1967) encontro que la actividad de delta-ALA-sintetasa en extractos celulares crecidos en condiciones aerobicas, es cerca del 60% de la actividad encontrada en extractos celulares crecidos en ausencia de oxigeno. Mientras que la enzima delta-ALA-deshidratasa de microorganismos crecidos en condiciones aerobicas es de un 10% de la encontrada en condiciones anaerobicas. Por esta razon, las propionibacterias son consideradas aerotolerantes (Pritchard, G., 1977; I'bragimova, S., 1980).

CAPITULO III

PRODUCCION DE VITAMINA B₁₂

La producción de vitamina B₁₂ se basa en la actividad metabólica de los microorganismos, ya que no hay evidencia de que las plantas superiores o el hombre la produzcan. Otra fuente de vitamina es el hígado de animales superiores, pero debido a su bajo contenido (aproximadamente 1 ppm), lo convierte en un material antieconómico para su producción. Por otro lado, la síntesis química de la vitamina es muy laboriosa, ya que requiere de 70 pasos para su producción (Rose, A.H., 1978).

Varios microorganismos producen vitamina B₁₂ (tabla 1); no obstante, en la industria, las bacterias del género Propionibacterium y Pseudomonaceae, son las más usadas por su alta productividad.

TABLA I
 PRODUCCION DE VITAMINA B₁₂
 POR DIFERENTES CEPAS

CEPA	FUENTE DE CARBONO	VITAMINA B ₁₂ (mg/L)	REFERENCIA
Microspora sp.	glucosa	11.5	Wagman (1969)
Nocardia rugosa	glucosa, melaza de caña	14.0	Farm. Ital (1971)
<i>Propionibacterium</i> <i>freudenreichii</i>	glucosa	25.0	Uclaf (1960)
<i>P. shermanii</i>	glucosa	23.0	Speedie (1960)
<i>P. shermanii</i>	glucosa	28.0	Chincin (1965)
<i>P. shermanii</i>	glucosa	39.0	Pierrel SPA(1965)
<i>P. vinnielli</i>	glucosa	25.0	Fliva TFKP (1964)
<i>P. denitrificans</i>	remolacha	59.0	Merck&Co. (1971)
<i>S. olivaceus</i>	glucosa, lactosa	8.5	Terada (1959)
Bacterias metano- genicas	metanol	35.0	Richter G. (1975)
<i>Methanobacillus</i> <i>omeliansky</i>	metanol	8.8	Peniskhava (1966)
<i>Protoaminobacter</i> <i>ruber</i>	metanol	2.5	Kojima (1976)
<i>Nocardia gardneri</i>	hexadecano	4.5	Kyowa Hakko 1970

Fuente: Florent & Ninet, 1979.

En especial dos especies del genero de las Propionibacterias; *Propionibacterium shermanii* y *P. freudenreichii* (Florent & Ninet, 1979) y dos especies del genero Pseudomonas: *Pseudomonas denitrificans* (Lago, B.D., 1969 y Merck & Co, 1971) y *Pseudomonas AM-1* (Yongsmith, B. y P. Apiraktivongse, 1983), parecen ser las que presentan mejores características.

En el caso del genero *Propionibacterium*, numerosos trabajos de investigacion se han llevado a cabo para determinar los factores que afectan la produccion de vitamina B₁₂. A las bacterias de este genero se les ha considerado usualmente como anaerobias facultativas

o microaerofilicas (Yongsmith, B. y P. Apiraktivongse, 1983), y toman sus requerimientos energeticos de la fermentacion de lactato y de glucosa para producir acido propionico, acetato y bioxido de carbono (Lee, H.I., 1974). En el caso del acido propionico, su produccion disminuye cuando la bacteria se encuentra bajo condiciones aerobicas (Pritchard, G., 1977; I'bragimova, S., 1980a, 1980b; De Vries, W., 1973, 1972; Menon, A., 1967), por lo que el efecto inhibitorio del acido propionico sobre el crecimiento (Namba, A., 1983) no debe de existir cuando la bacteria se desarrolla bajo condiciones aerobicas.

Los requerimientos nutricionales para las propionibacterias son variados. Por un lado Hettinga, (1972) encontro que los aminoacidos, aunque beneficos, no son indispensables para el crecimiento ya que estas bacterias poseen las enzimas necesarias para la produccion de los aminoacidos que requieren. Por otro lado, Osman (1969) demostro que la alfa-alanina, la beta alanina y el acido aspartico, estimulan el crecimiento y la produccion de la vitamina. De Vries (1972) encontro que durante el crecimiento de *E. shermanii*, los aminoacidos alanina, cisteina y serina se agotan muy rapidamente.

Con respecto a otras fuentes de nitrogeno, este genero utiliza generalmente sales, como el nitrato de amonio, el citrato o el fosfato de amonio, asi como la urea, (Hettinga, D., 1972) y el agua de cocimiento de maiz (Santana, C., 1983; Cespades, E., 1986).

Se ha estudiado el efecto de diversas fuentes de carbono sobre la produccion de vitamina B₁₂ y se ha observado que las mejores

son la glucosa y el ácido láctico (Lee, H., 1974; Osman, R., 1966, y Bullerman, L., 1966). Osman, R. (1969) mostró que a concentraciones del 2%, ambas presentan una buena producción de masa celular y de vitamina, mejorándose cuando estas fuentes se acompañan de extracto de levadura.

En la tabla II, se encuentran resumidos los datos de varios reportes para la obtención de la vitamina B₁₂, el uso de diferentes sustratos como son: glucosa, lactato, suero de leche, extracto de levadura y subproductos industriales como el jugo cocido de limón, agua de cocimiento de maíz y licor de soya, mostrándose sus rendimientos en la misma tabla. En general, estos sustratos presentan dos fuentes de carbono: glucosa y ácido láctico, en forma de sustratos simples o complejos.

Una fuente completa de vitaminas es importante para el crecimiento y la producción de este metabolito. La tiamina es esencial cuando esta bacteria crece en medios deficientes de otras vitaminas, excepto en el caso especial de *P. pentosaceum*, que crece abundantemente en ausencia de esta. La riboflavina estimula el crecimiento, pero no es un requerimiento esencial para el medio de cultivo (Hettinga, D., 1972 y Osman, R., 1969).

El ácido pantoténico es un factor esencial para el crecimiento, lo mismo que la biotina y el ácido para-aminobenzoico. Cuando el ácido ascórbico se adiciona al medio, produce un aumento en el crecimiento y en la síntesis de la vitamina bajo condiciones

 TABLA II

PRODUCCION DE VITAMINA B₁₂ CON EL GENERO DE LAS
 PROPIONIBACTERIAS USANDO DISTINTAS FUENTES
 DE CARBONO Y NITROGENO

MICROORGANISMO	SUSTRATOS	VITAMINA B ₁₂ mg/L.	REFERENCIA
P. freudenreichii	remolacha	11.5	Grant, D. 1960
P. freudenreichii	glucosa, ext. levadura	14.5	Riley, P. 1961
P. freudenreichii	glucosa, glicina ext. levadura	22.0	Lim, R. 1968
P. freudenreichii	lactato	1.3	I'bragimova 1980b
P. shermanii	glucosa	23.0	Speedie & Hull, 1960
P. shermanii	lactico, amonio Co ⁺⁺	1.6	Vorob'eva, I. 1964
P. shermanii	suero leche, ext. levadura, Co ⁺⁺	11.2	Berry, E. 1966
P. shermanii	glucosa, ext. levadura	n.d.	Lee, H. 1974.
P. shermanii	lactico, ext. levadura	n.d.	Fritchard, G. 1977
P. shermanii	lactato	n.d.	I'bragimova, 1980a
P. shermanii	Jugo cocido de limon, ACM	6.35	Perez, M. 1983.
P. shermanii	Jugo cocido de limon, ACM	2.55	Santana, C. 1983
P. shermanii	glucosa, licor de soya	4.0	Yongsmith, B. 1983
P. shermanii*	glucosa, ext. levadura, caseina	15.0	Yongsmith, B. 1982 1983A.

 (*) células inmovilizadas, ACM: agua de cocimiento de maíz

7

anaerobicas de crecimiento de P. shermanii (Zodrow, K. y O. Stefaniac 1963a; 1963b; Caspedes, B. 1986.)

Berry y col. (1966), estudiaron el efecto de varias concentraciones de cobalto (5, 15 y 25 ppm.) para la producción de vitamina con P. shermanii en un medio conteniendo suero de leche y empleando diferentes niveles de aereación. Estos autores encontraron un efecto marcado en la producción de vitamina B₁₂ con 5 ppm. de Co⁺⁺ en todos los niveles de aereación. A mayores concentraciones de Co⁺⁺ no se detectó un aumento significativo en la producción de vitamina

La adición de 5,6-dimetilbencimidazol (5,6-DMB) al medio de cultivo para la producción de vitamina con el género de las propionibacterias, ha sido necesaria solo cuando el cultivo es en condiciones anaerobicas, ya que esta molecula se forma a partir de la riboflavina en condiciones aerobicas (Hollriegel, V. 1982)

La temperatura optima para crecimiento y la producción de vitamina B₁₂ por P. shermanii es entre 27 y 30°C, con un pH de fermentación de 6.85 (Zodrow, K., 1963a).

Los procesos de obtención de esta vitamina con el género de las propionibacterias, ha mostrado ser los que mejores rendimientos ofrece (tabla II). La producción de esta, normalmente se realiza en dos fases. La primera, en condiciones anaerobicas, para la obtención del anillo corrinoide (factor B), y una segunda fase, en condiciones

aerobicas para la sintesis del nucleotido 5,6-DMB (Florent y Ninet, 1979; Hollriegel, 1982.), con los cuales se obtiene asi, la vitamina B₁₂ en forma de coenzima B₁₂, la que posteriormente, durante el proceso de extraccion, se cianura para estabilizarla (Speedie & Hull, 1970).

Con base en lo anterior, varios autores reportan la produccion de vitamina en dos fases (tabla II_a), bien sea en procesos en lote (Yongsmith, B., 1983; I'bragimova, S., 1980b; Perez, M.J., 1983; Berry, E., 1966; Speedie & Hull, 1960; Vorob'eva, L., 1964; Grant, D., 1960), en procesos de cultivo continuo con *E. shermanii* (Lee, H., 1974; Pritchard, G., 1977 y Riley, P., 1961) y *Pseudomonas* (Tuschiga, Y., 1980), y con celulas inmovilizadas de *E. shermanii* (Yongsmith, B., 1982, 1983).

De los procesos en cultivo continuo, el de Riley (1961) es el mas completo para la produccion de cianocobalamina. El autor aclara que es un trabajo preliminar para examinar la potencialidad del proceso continuo en dos etapas, la primera anaerobia y la segunda aerobia, con tiempos de 33 horas para la primera fase y de 60 horas para la segunda, obteniendo 8 mg/L. y 14.5 mg/L. de vitamina B₁₂ en cada fase. Este trabajo fue realizado en dos fermentadores, el primero de 4.0 L. para la primera condicion y de 10.0 L. para la segunda condicion.

Como la produccion de vitamina es parcialmente asociada al crecimiento, dependiendo de los niveles de aereacion (Santana, C.,

TABLA II A

PROCESOS PARA LA PRODUCCION DE VITAMINA B12

Microorganismo	Componentes del medio de cultivo	Proceso de fermentacion	Condiciones	Referencia
<i>P. freudenreichii</i>	lactato	lote	anaerobico	I'bragimova, 1980b
<i>P. freudenreichii</i>	lactato	lote	microaerobico	I'bragimova, 1980b
<i>P. freudenreichii</i>	melazas de remolacha	lote	aerobico	Grant, 1960
<i>P. shermanii</i>	lactato	lote	aerobico 12% O ₂	I'bragimova, 1980a
<i>P. shermanii</i>	glucosa	lote	0.01/0.1 vvm	Speedie&hull, 1960
<i>P. freudenreichii</i>	Y.E., glucosa	C. continuo	anaerobio/aerobio	Riley, 1961
<i>Pseudomonas AM-1</i>	metanol	C. continuo	aerobico	Tuschiya, 1980
<i>P. shermanii</i>	glucosa, licor de soya	lote	microaerobico	Yongsmith, 1983
<i>P. denitrificans</i>	remolacha, betaina glutamico, 5,6-DMB	lote	aerobico	Merck & Co., 1971
<i>P. shermanii</i>	Y.E., Suero de leche	lote	anaerobico/.215vvm	Berry, 1966
<i>P. shermanii</i>	lactico, sulfato de amonio, Co.	lote	anaerobico	Vorav'eva, 1964
<i>P. shermanii</i>	Y.E. lactico	C. continuo	anaerobio/aerobio	Pritchard, 1977
<i>P. shermanii</i>	Jugo cocido de limon, ACM	lote	anaerobio/aerobio	Perez, 1983
<i>P. shermanii</i>	Jugo cocido de limon, ACM	lote	0.01/0.1 vvm	Santana, 1983
<i>P. shermanii</i>	Y.E., glucosa	C. continuo	anaerobico	Lee, 1974
<i>P. freudenreichii</i>	Y.E., glucosa glicina	lote	microaerobico	Lim, 1968
<i>P. shermanii</i>	Y.E., glucosa caseina	celulas inmovilizadas	microaerobico	Yongsmith, 1983, 1983a

(Y.E.) extracto de levadura

1983; Králova, B. 1985) y siendo un producto que no es liberado al medio, los estudios de I'bragimova (1980a, 1980b) y de Pritchard (1977) cobran importancia para el estudio de la obtencion de esta vitamina en una sola fase de aereacion.

Pritchard realizo experimentos en los cuales observo el aumento de masa celular de P. shermanii conforme se aumentaba la concentracion de oxigeno disuelto en el medio de cultivo, de 0.0 v.v.m. a 0.76 v.v.m. de oxigeno puro; concluyo que a partir de 0.24 v.v.m. y hasta 0.50 v.v.m. se triplico la masa celular, en tanto que baja considerablemente el crecimiento celular cuando se emplean niveles mayores de 0.50 v.v.m. de oxigeno. Esta respuesta, se debio, segun el autor "a una adaptacion del P. shermanii a un patron de metabolismo aerobico". Por otro lado, I'bragimova (1980a), llego a resultados semejantes, al aumentar hasta un 12% la concentracion de oxigeno del cultivo y observo un aumento en la velocidad especifica de crecimiento con el nivel de aereacion mas alto.

Como se puede ver, los esfuerzos realizados para la produccion de vitamina B₁₂ han sido muchos y variados, desde fermentacion en lote con diferentes condiciones de aereacion, pasando por cultivo continuo hasta el uso de celulas inmovilizadas. Se han probado diversos medios de cultivo, simples y complejos con el objetivo de aumentar la produccion de este metabolito.

CAPITULO IV

ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION

Como se ha podido observar en la informacion presentada anteriormente, los trabajos encaminados al estudio de la produccion de vitamina B₁₂ muestran el gran interes que existe por parte de la industria farmaceutica y alimentaria.

Actualmente Mexico es un importador de cianocobalamina, cuyo costo en el mercado internacional es de \$ US.15,000 a 20,000 por kilogramo, con una pureza del 95 al 98%. Nuestro pais importa por ano entre 750 y 850 kg/ano de polvo desecado de fermentacion con actividad de vitamina B₁₂, lo que indica la demanda de este producto. (Cespedes, 1986) y que su importacion se incrementara en los siguientes anos.

Para la obtencion de este metabolito, el genero de las propionibacterias parece mostrar las mejores caracteristicas por su capacidad de produccion (Kamikubo, T. y col. 1978). La ventaja del uso de este microorganismo en los procesos industriales de produccion de vitamina B₁₂ es la capacidad de producir el nucleotido 5,6-DMB, lo cual, visto desde el punto de vista economico, abate el costo de la produccion, caso que no se presenta en otros microorganismos usados para la produccion de esta vitamina, donde es necesario adicionar este compuesto (Merck & Co. 1971).

Dada la importancia de esta vitamina para Mexico, se destacan algunos estudios realizados en este pais para la obtencion de este metabolito usando fuentes diferentes a la glucosa, como es el acido citrico proporcionado por los jugos de desecho de la industrializacion del limon mexicano (Perez M,J. 1981). El objetivo de esta investigacion fue el de aprovechar los azucares presentes en este producto, que por su dificil eliminacion y gran riqueza en nutrientes, aumenta la demanda biologica de oxigeno en las aguas de desecho.

Los resultados de este trabajo mostraron un bajo aprovechamiento por parte del P. shermanii de los azucares de este sustrato. Este trabajo es considerado como un inicio de otros proyectos de investigacion encaminados a estudiar la produccion de esta vitamina.

Santana (1983) continuo esta linea de investigacion, donde a partir de sus resultados, desecha el uso del jugo cocido de limon como fuente de azucares para la produccion de la vitamina con P. shermanii, ya que el crecimiento celular y la produccion de vitamina es menor que cuando se utilizo glucosa como fuente de carbono. Bajo las mismas condiciones de estudio, la autora propone estudiar con mas profundidad los niveles de aereacion para incrementar la produccion de esta vitamina.

Cspedes, B. (1986) desarrollo un medio de cultivo para la produccion de esta vitamina, usando como fuente de carbono, jugos

provenientes de la industrialización de la paja, en fermentaciones con P. shermanii. Aunque la bacteria fue incapaz de aprovechar la sacarosa del medio de cultivo, la autora desarrolló un proceso de hidrólisis. Sus resultados compararon favorablemente con los medios con glucosa como única fuente de carbono.

En esta investigación se propone estudiar las condiciones que presenten una mayor producción de la vitamina B₁₂. Este proyecto forma parte de una serie de esfuerzos encaminados al estudio de los factores que intervienen en la síntesis de este metabolito, usando Propionibacterium shermanii ATCC13673.

Estos proyectos de investigación, en su conjunto, están encaminados a la presentación de una alternativa de producción de vitamina B₁₂ en México, ya que la demanda de esta vitamina muestra una tendencia a incrementarse con el tiempo, por lo que el estudio de las condiciones de producción cobran importancia.

CAPITULO V .

OBJETIVO

Establecer las condiciones de aereacion optimas de fermentacion con Propionibacterium shermanii ATCC 13673, en fermentador de 4.0 L. para la produccion de vitamina B₁₂ y generar los datos para estudios de cultivo continuo.

Para lograr este objetivo y con base en la informacion proporcionada por la literatura y a los trabajos realizados en este laboratorio, se plantea realizar cultivo en lote con Propionibacterium shermani ATCC 13673 en un medio de glucosa y agua de cocimiento de maiz (ACM), llevaran a cabo los siguientes pasos:

A.- Encontrar el nivel optimo de aereacion en una fase, con un fermentador de 4.0 L. para la obtencion de una mayor cantidad de vitamina B₁₂. Los niveles de aereacion a usarse van desde 0.01 v.v.m. (volumen de aire por volumen de medio por minuto) hasta 1.0 v.v.m..

B.- Realizar fermentaciones en lote, combinando dos diferentes niveles de aereacion en el fermentador de 4.0 L., incluyendo el mejor nivel de aereacion encontrado en la primera parte del trabajo (meta A), conforme a las siguientes propuestas:

B.1.- Una primera fase de 24 horas con un nivel de aereacion bajo (microaerofilico) y posteriormente el mejor nivel de aereacion encontrado anteriormente.

B.2.- Una primera fase de 24 horas con el mejor nivel de aereacion de produccion de vitamina y posteriormente, una segunda fase con un nivel de aereacion mayor al encontrado como optimo.

B.3.- Una primera fase de 24 horas con el nivel de aereacion mayor al mejor encontrado en la produccion de vitamina y posteriormente, una segunda fase con el nivel encontrado como mejor en A.

B.4.- Igual que B.1., pero la primera fase del proceso antes del cambio del nivel de aereacion, sera de 48 horas.

B.5.- Igual que B.2., pero la primera fase sera de 48 horas.

B.6.- Igual que B.3., pero la primera fase sera de 48 horas.

CAPITULO VI

MATERIALES Y METODOS

Microorganismo de trabajo: Propionibacterium shermanii ATCC 13673.

A.-Conservacion de la cepa: se conserva refrigerada previamente en tubos con medio de Krebs (lactosa-extracto de levadura) (Lapage, S., 1970). Se reactiva la cepa mediante la transferencia de 1 mL. del medio de cultivo a un tubo nuevo con 10 mL. del mismo medio, incubando durante 48 horas a una temperatura de 29°C, sin agitacion.

B.- Medio de cultivo: El medio de cultivo utilizado tanto para la adaptacion del microorganismo, preparacion del inculo y fase de produccion, es el siguiente: glucosa, 32.8 g/L.; nitrogeno (proporcionado por el agua de cocimiento de maiz (ACM) sin solidos en suspension) 3.15 g/L.; cobalto, (como cloruro de cobalto) 0.005 g/L.. Los componentes del medio fueron preparados por separado, se les ajusto el pH a cada uno, a la glucosa a 8.5 y al ACM a 8.0. Despues de ajustar el pH al ACM, se centrifugo a 10,000 RPM por 15 minutos a 4°C en una centrifuga Sorvall Dupont RC-5 para eliminar los solidos presentes y trabajar unicamente con el sobrenadante que, junto con la glucosa, se esterilizaron a 121 °C durante 20

minutos. El cobalto se esterilizo por separado y se agrego asepticamente al medio de cultivo.

C.- Preparacion del inoculo: La preparacion del inoculo se hace en dos etapas. En la primera, para adaptar al microorganismo, se transfirieron 10 mL del cultivo reactivado en el tubo de Krebs al matraz de 250 mL con 190 mL de medio de cultivo (esto permite condiciones microaerofilicas). Se incubo a 29°C por 48 horas con una agitacion de 125 rpm. Para la segunda etapa, la preparacion del inoculo a emplearse en el fermentador, se transfirieron 20 mL del cultivo anterior a un matraz con 180 mL de medio de cultivo. Se incubo a las mismas condiciones durante 36 horas. De este ultimo cultivo se tomo el suficiente volumen para obtener una masa celular en peso seco correspondiente a 0.27- 0.31 g/L. Se centrifugo y estas celulas se resuspendieron en 300 mL de medio de cultivo nuevo, con el cual se inoculo el fermentador que contiene 2700 mL de medio de cultivo.

D.- Cultivo en fermentador: Todos los experimentos se llevaron a cabo por duplicado en un sistema de fermentacion (Fermentation Design) con una jarra de 4.0 L de volumen nominal con 3.0 L de medio de cultivo. La velocidad de agitacion se ajusto a 350 rpm, la temperatura a 29°C y el pH se controlo entre 6.8 y 7.0 con NaOH al 20% durante todo el tiempo de la fermentacion. El flujo de aire se controlo de acuerdo a las condiciones deseadas, entre 0.01 v.v.m y 1.0 v.v.m.. Todas las fermentaciones se siguieron durante 120 horas, tomando muestras de 100 mL cada 24 horas. Cuando fue necesario,

sobre todo para el calculo de las velocidades de crecimiento, se tomaron muestras cada 3 horas como minimo durante las primeras 24 horas de la fermentacion.

E.-Determinacion del crecimiento celular: Una muestra de 1 mL

del caldo de cultivo se centrifugo durante 15 minutos a 5700 rpm en una centrifuga clinica (Wifug modelo Doctor). Se decanto el sobrenadante y el paquete celular se lavo por dos veces mas con 10 mL de agua destilada. Despues, el paquete celular se diluyo con agua en una proporcion de 1:100 para leer en un espectrofotometro (Bausch & Lomb, modelo Spectronic 20), a una longitud de onda de 540 nm. El peso seco, expresado en g/L, se calculo con base en una curva de calibracion de densidad optica en funcion del peso seco.

F.-Determinacion de acido lactico: Se cuantifico en un

Cromatografo de gases (Varian modelo 3700-FII). Columna: 3% OV-17 en Chromosorb WHP 80/100. El metodo se basa en la metilacion del acido lactico, formando un compuesto de alta volatilidad. Previo a la muestra que se quiere cuantificar, se hace una curva estandar de concentracion conocida de acido lactico, con el mismo tratamiento. La cantidad de acido lactico presente en la muestra se calcula por medicion de la altura de los picos y posterior comparacion con el estandar correspondiente (Garcia-Hernandez, en prensa).

Para determinar el acido lactico de la muestra, se toman 300 microl del caldo de cultivo y se colocan en un vial, se le agrega una gota de HCl al 20% y se deja secar a una temperatura de 60 °C

por 12 horas. Posteriormente, a la muestra seca se le añaden 0.5 mL de BF₃-metanol y se agita por 12 horas. Se le agraga posteriormente 0.8 mL de sulfato de amonio al 33%. Se agita por 5 minutos. Después se le agrega 1 mL de cloroformo y se vuelve a agitar por 5 minutos. Se usa la fase orgánica para la determinación del ácido láctico.

G.- Determinación de azúcares reductores: La determinación se realiza por la técnica de Ting (1956). El método se basa en la oxidación de los azúcares con una solución alcalina de ferricianuro de potasio. La cantidad reducida de este último compuesto se determina colorimétricamente a 515 nm. El desarrollo de color se debe a la formación de complejos entre los iones metálicos reducidos y compuestos como el arsenomolibdato, con el que forma un compuesto color azul. La muestra del caldo de fermentación se diluye 1:50 y se sigue la técnica, previa elaboración de una curva patrón con glucosa y fructosa.

H.- Determinación de nitrógeno: Se realizó por el método de Kjeldahl (AOAC, 1975).

I.- Determinación colorimétrica de vitamina B₁₂: El método de determinación usado es el reportado por Fischer (1954), que se basa en la extracción y estabilización de la vitamina de las células, por calentamiento de estas con propanol-cianuro. Se determina por lectura en el espectrofotómetro a 587.5 nm.

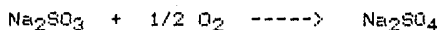
J.- Determinación de vitamina por cromatografía en capa fina:

Se llevo a cabo en placa Kiesgel 60 F254, en un sistema compuesto de alcohol n-butílico : agua : ácido acético (70:30:1), utilizando unicamente la fase inferior saturada por el alcohol. (Horig, J., 1980; Riley, P., 1961). Como soluciones estandar se usaron las siguientes: Vitamina B₁₂ (Merck); 5,6-DMB. (Sigma) y Factor B (Sigma), cada compuesto en una concentración de 1 mg/mL, disueltos en una solución de propanol-cianuro. Para correr las placas, se aplicaron 10 microlitros de los estandares y de las muestras problema.

K.-Determinación del coeficiente de transferencia de oxígeno (K_{La}): Se calcula por el método del transiente, utilizando sulfito de sodio para abatir el oxígeno disuelto y cobalto como catalizador. La concentración de oxígeno disuelto se lee con un electrodo de oxígeno de membrana intercambiable (New Brunswick serie 900). Este electrodo es de tipo galvanico que contiene un ánodo de plomo y el cátodo de platino, con una membrana de stilen fluorinado (FEP), de 25 micras de espesor para respuesta rápida.

El K_{La} determina la capacidad del equipo para transferir oxígeno al seno del líquido, donde se llevan a cabo las reacciones bioquímicas por parte de las células. El K_{La} esta en función de la agitación, la velocidad de flujo de aire, las características geométricas del reactor y del sistema de agitación, así como de las características reológicas del medio de cultivo y de las condiciones de temperatura y presión (Spriet, J., 1984; Schultz, J., 1956).

La técnica consiste en agitar y aerear el agua en las condiciones deseadas, dentro del reactor, hasta saturarla de oxígeno. Se le agrega 0.75 g. de sulfito de sodio y 1 mL. de CoCl_2 1N. como catalizador. El sulfito se oxida a sulfato de acuerdo a la siguiente reacción:



por lo que se consume todo el oxígeno disponible en el medio.

A partir del momento que se le agrega la solución del sulfito al reactor, se lee periódicamente el % de oxígeno disuelto en el medio tal como se muestra en la figura 3.

La expresión matemática que define el coeficiente de transferencia de oxígeno al emplear este método, es:

$$C_1 = C^* - 1/K_L a \, dC_1/dt$$

que a su vez es la ecuación de la recta de la gráfica de la figura 4. La pendiente de esta recta es $-1/K_L a$, expresado como h^{-1} . C^* es la concentración de oxígeno del líquido que está en equilibrio con la fase gaseosa, su valor corresponde al de la intersección en el eje de las ordenadas.

Los valores de velocidad de transferencia de oxígeno, se calcularon en base a los valores del $K_L a$.

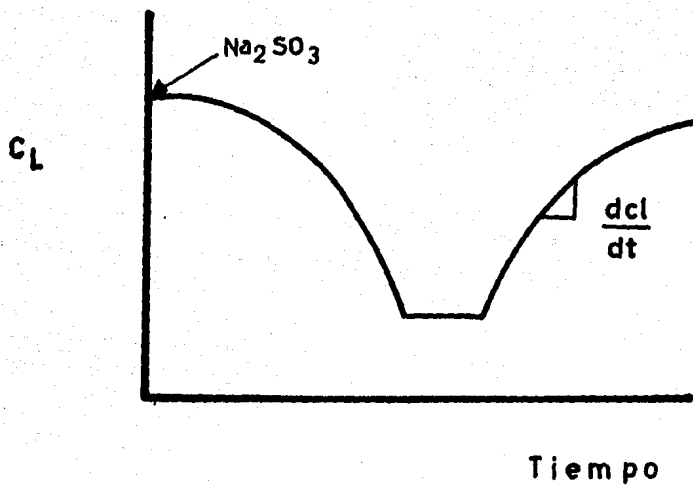


FIGURA 3. Curva de concentración de oxígeno contra tiempo por el método del transiente con sulfito de Na.

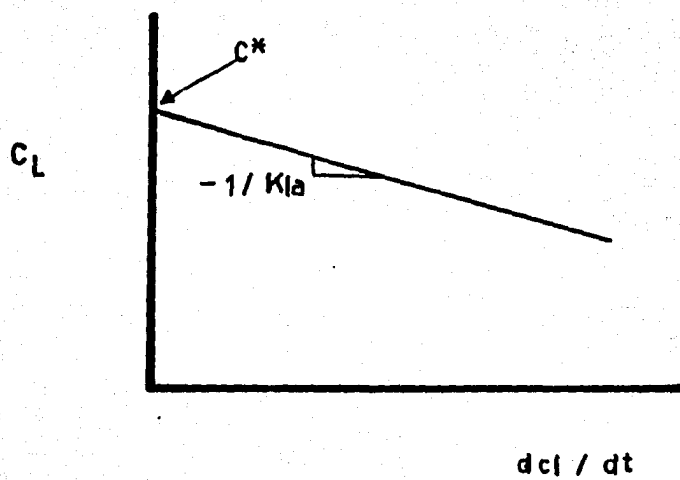


FIGURA 4. Metodo de estimacion del coeficiente de transferencia de oxigeno (K_{1a}) por el metodo del transiente con sulfito de sodio

CAPITULO VII

RESULTADOS Y DISCUSION

Las fermentaciones realizadas se dividen en 3 partes: fermentaciones con un nivel de aereación constante, fermentaciones con dos fases en el nivel de aereación y cultivo continuo.

Previamente a la realización de estos estudios, se determinaron los valores del coeficiente de transferencia de oxígeno (K_{La}) para contar con una medida de operación del reactor.

Una práctica común en las fermentaciones aeróbicas es la predicción de los resultados para estudios de escalamiento. Los criterios de escalamiento son varios, pero en los casos de procesos aeróbicos, el K_{La} es uno de los más usados en el escalamiento (Bartholomew, W., 1960; Wang, D., 1979), ya que este proporciona un parámetro para repetir un proceso, para comparar equipo, su mejoramiento o cambio (Wang, D., 1979).

Los valores de los K_{La} obtenidos se muestran en la tabla III, a partir de los cuales se calculó la velocidad de transferencia de oxígeno (V.T.O.). Como se observa en esta tabla, a partir de una

aeración de 0.5 v.v.m. hasta 1.0 v.v.m. con la misma velocidad de agitación, no hay un aumento significativo del K_{La} ni en la V.T.O., esto puede deberse a que se presenta el fenómeno de coalescencia de las burbujas de aire, en función de las características del medio de cultivo, y disminuye entonces el área superficial de contacto entre la fase gaseosa (aire) y la fase líquida (agua), o a que las turbinas de disco no son capaces, bajo estas condiciones, de dispersar el aire, disminuyendo en consecuencia la transferencia de oxígeno al seno del líquido. Cuando se aumenta la velocidad de agitación, el valor de K_{La} aumenta hasta casi un valor de $90h^{-1}$. (tabla III)

 TABLA III
 VALORES DEL COEFICIENTE DE TRANSFERENCIA DE OXIGENO
 (K_{La}), VELOCIDAD DE TRANSFERENCIA DE OXIGENO Y
 VELOCIDAD SUPERFICIAL DEL AIRE PARA CADA NIVEL DE
 AERACION EMPLEADO

nivel de aeración (v v m)	K_{La} h^{-1}	V T O $mMO_2/L.h$	V s $cm/seg \times 10^{-3}$
0.01	4.86	0.59	0.037
0.10	9.30	1.55	0.369
0.20	10.30	2.12	0.738
0.35	20.22	3.50	1.290
0.50	30.00	5.60	1.840
0.65	25.00	5.20	2.400
0.80	36.76	6.99	2.950
1.00	27.79	5.30	3.690
1.00*	89.47	17.43	n.d.

en todos los casos la velocidad de agitación fue de 350 rpm, excepto en (*) donde se aumentó la agitación a 690 rpm.

FERMENTACIONES CON UN SOLO NIVEL DE AERACION:

Se llevaron a cabo 9 experimentos, cada uno de ellos con un nivel de aereación constante durante toda las fermentaciones. Cada nivel de aereación estudiado, se realizó por triplicado.

En la figura 5 se muestran los resultados de estos experimentos. Se observa que en todos los casos la mayor cantidad de masa celular se obtuvo entre las 72 y 96 horas de fermentación, y se observa un efecto de la aereación sobre el crecimiento y la producción de vitamina B₁₂, lo cual se aprecia mejor en la figura 6. Solo en tres condiciones de las nueve estudiados se logró un crecimiento mayor a los 11.0 g/L, estos procesos corresponden a 0.20, 0.80 y 1.0 v.v.m., y solo en el primero de ellos coincide con la máxima productividad de 0.172 g.células/Lhr. Los valores de masa celular que se presentan en la tabla IV, se obtuvieron a las 68, 94 y 118 horas respectivamente, lo cual sugiere que una aereación de 0.20 v.v.m. es la condición que favorece el crecimiento celular durante las primeras 68 horas, ya que los valores de producción y de productividad son los mas altos que se encontraron.

En el caso de procesos con un mayor coeficiente de transferencia de oxígeno, se esperaba una mayor producción de masa celular, pero esto no sucede así, ya que se logran valores altos de células, pero no comparables en su productividad con el proceso de 0.20 v.v.m., ya que los mayores valores de concentración de masa celular se obtienen en tiempos mas largos, como se observa en las figuras 5 y 6.

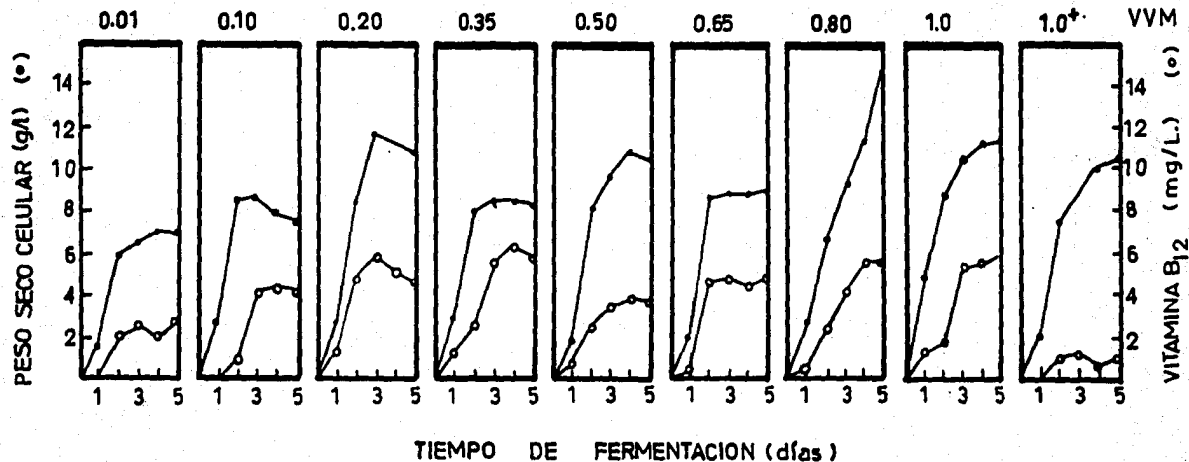


FIGURA 5. Crecimiento de *E. shermanii* ATCC 13673 y producción de vitamina B₁₂ a diferentes niveles de aereación + velocidad de agitación 690 rpm.

TABLA IV
RESULTADO DE LOS PROCESOS EN UN SOLO NIVEL DE AERACION CONSTANTE

nivel de aeracion vvm	Kla l/hr	tiempo de maxima produccion vitamina hr	maxima de de mg/L	produccion celular g/L	productividad de vitamina mg/L\$hr	velocidad especifica produccion (Op) mgV/g.cel\$hr	produccion especifica mgV/g.cel	productividad celular g/L\$hr	velocidad especifica l/hr
0.01	4.9	67.3	2.6	6.64	0.039	0.006	0.3916	0.099	0.067
0.10	9.3	97.0	4.3	7.97	0.044	0.006	0.5395	0.082	0.073
0.20	10.3	68.4	5.9	11.77	0.086	0.007	0.5013	0.172	0.108
0.35	17.0	93.0	5.4	8.63	0.058	0.007	0.6257	0.093	0.109
0.50	30.0	94.0	3.9	10.88	0.041	0.004	0.3585	0.116	0.107
0.65	25.0	69.3	4.7	8.83	0.068	0.008	0.5323	0.127	0.102
0.80	36.7	94.0	5.7	11.40	0.061	0.005	0.5000	0.121	0.100
1.00	27.0	118.3	5.9	11.60	0.050	0.004	0.5086	0.098	0.130
1.00*	89.5	72.0	1.4	9.00	0.019	0.002	0.1556	0.125	0.125

(*) 890 rpm

En la figura 5 se muestra la tendencia de producción de vitamina B₁₂ en cada una de las condiciones estudiadas. Como se observa, con niveles de aereación menores a 0.20 v.v.m., la producción de vitamina se retrasa por 24 horas con respecto a los otros experimentos. Este mismo fenómeno se observa también con un nivel de aereación de 1.0 v.v.m. y agitación de 690 rpm, lo que da un valor de K_La de 89 h⁻¹.

En la tabla V se comparan los valores de transferencia de oxígeno para cada nivel de aereación con la cantidad de vitamina detectada durante las primeras 24 horas de iniciada la fermentación. Cuando la velocidad de transferencia de oxígeno está entre 2 y 7 mM/L.h., la célula produce vitamina desde el inicio de la fermentación; no así para velocidades de transferencia de oxígeno menores a 2 mM/L.h. (K_La < 10 h⁻¹) y para valores mayores a 7 mM/L.h. (K_La > 30 h⁻¹). Estos resultados indican la importancia de posteriores estudios sobre los efectos de la aereación en la producción de vitamina bajo estas condiciones.

TABLA V
 PRODUCCION DE VITAMINA B₁₂ DURANTE LAS PRIMERAS 24 HORAS
 DE INICIADA LA FERMENTACION A LOS DIFERENTES NIVELES
 DE AEREACION

nivel de aereación (v v m)	velocidad de transferencia de oxígeno (mM _O ₂ /L.h)	producción de vitamina B ₁₂ (mg/L.)
0.01	0.59	0.0
0.10	1.55	0.0
0.20	2.12	1.0
0.35	3.50	1.3
0.50	5.60	0.9
0.65	5.20	0.6
0.80	7.00	0.4
1.00	5.30	1.3
1.00*	17.43	0.0

*) 690 rpm

En la figura 7 se observa que la producción de vitamina fue mayor en el nivel de aereación correspondiente a 0.20 v.v.m., coincidiendo esto con la mayor productividad. Como se apunta en la tabla IV, con respecto a la producción de vitamina para todas las fermentaciones, la mayor cantidad de esta se obtuvo en las fermentaciones con un flujo de aire de 0.20; 0.35; 0.80 y 1.0 v v m. respectivamente aunque en los 3 ultimos, la mayor concentración se logro entre las 93 y 118 horas de fermentación y para el primer caso a las 68 horas.

Tambien, como se observa en las figuras 5, 6 y 7, el mejor proceso se encontró bajo la condición de aereación que corresponde a 0.20 v.v.m.. La ventaja de este proceso es el tiempo corto en los que se llega a la maxima producción. En los otros procesos con producción de vitamina B₁₂ superior a los 5.0 mg/L, estos valores se encontraron 24 y 48 horas despues que en el proceso anterior.

Estos resultados sugieren que en relación a la producción y productividad de vitamina, la aereación que permitio los máximos valores, fue de 0.20 v v m, con una agitación de 350 rpm (equivalente a un K_La de 10.3 h⁻¹), lo cual coincide con la mayor producción y productividad celular, como se mostró anteriormente.

En la figura 8 se presentan los valores de velocidad específica de crecimiento en relación a las diferentes condiciones de aereación. Se observa que conforme aumentan los niveles de aereación en el medio de cultivo, los valores de la velocidad de crecimiento aumentan, manteniendo velocidades de crecimiento entre 0.10 y 0.12 h⁻¹, para

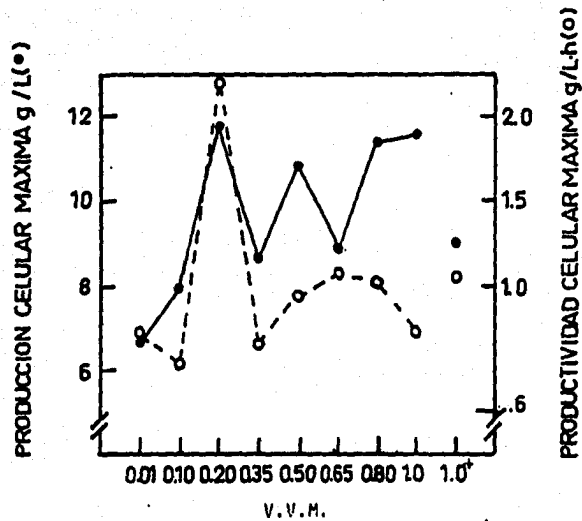


FIGURA 6. Producción y productividad máximas de P. shermanii a diferentes niveles de aeración. Los puntos graficados corresponden a los valores máximos obtenidos en cada caso. (+) 690 rpm

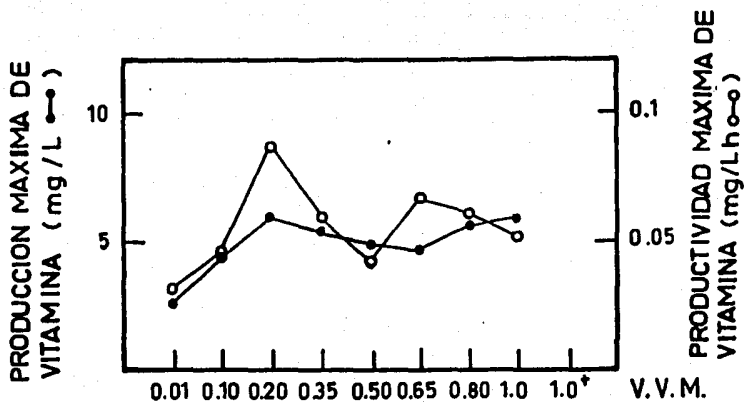


FIGURA 7. Producción y productividad de Vitamina B₁₂ a los diferentes niveles de aereación. (+) 690 rpm.

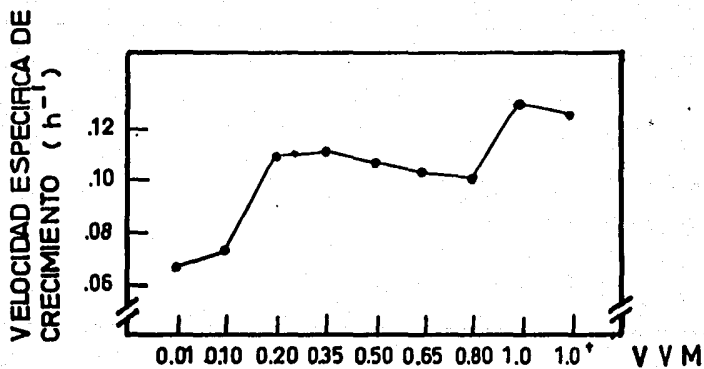


FIGURA 8. Velocidad de crecimiento promedio en las primeras 24 horas de fermentación de *P. shermanii*. (+) 690 rpm.

los flujos que corresponden a 0.20-0.80 v.v.m., y la velocidad de crecimiento aumenta a valores mayores de 0.12 h^{-1} para niveles de aereación de 1.0 v v m. Estos resultados son comparables a los reportados bajo otras condiciones por Pritchard (1977) e I'bragimova (1980a), donde reportan la adaptación a un metabolismo aeróbico de esta bacteria y un aumento de la velocidad específica de crecimiento. Cuando se trabajó a niveles de aereación menores a 0.20 v v m., la velocidad de crecimiento fue menor en un 30%.

Después de haber encontrado que el nivel de aereación de 0.20 v.v.m. mostró ser el mejor en lo que respecta a producción y productividad tanto de células como de vitamina B_{12} , aunque no en producción específica ya que en los niveles de aereación de 0.8 y 1.0 v v m. se lograron los mismos valores al de 0.20 v v m.. En la tabla IV se presentan estos resultados y la diferencia en horas de fermentación. Se repitió la fermentación a estas condiciones con el fin de seguir una cinética completa; los resultados se muestran en la figura 9 y en la tabla VI.

En los resultados de esta nueva fermentación, observamos que la producción de masa celular fue menor en un gramo a la obtenida bajo idénticas condiciones (tabla IV y figura 5). Así también, la producción de vitamina a las 69 horas fue menor en 0.4 mg/L., incrementándose al final del proceso hasta 6.5 mg/L. Este cambio, aunque pequeño, posiblemente se debió al cambio de lote del agua de cocimiento de maíz. Aquí, la velocidad específica de crecimiento con este nuevo lote fue de 0.13 h^{-1} , mayor al anterior.

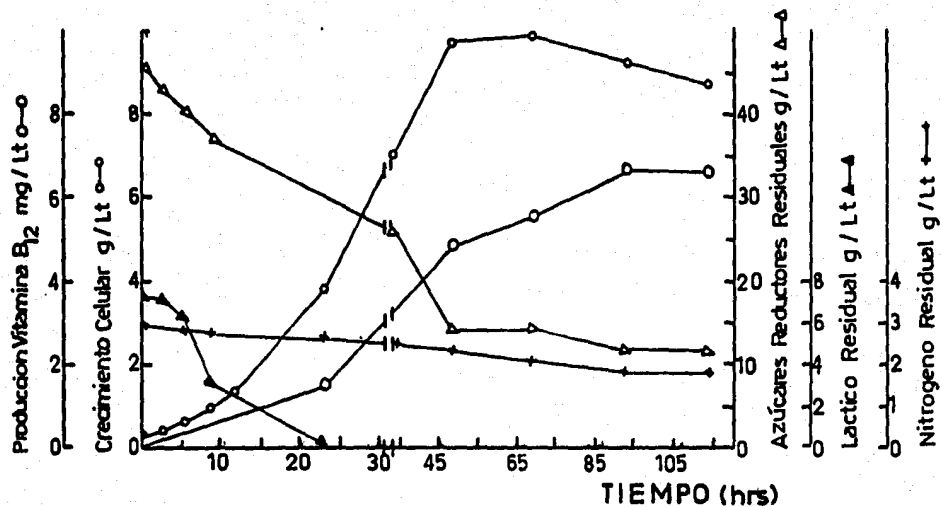


FIGURA 9. Cinética completa de la fermentación de *E. shermanii* ATCC 13673 a una velocidad de aereación de 0.20 v.v.m. y agitación de 350 rpm.

TABLA VI
 RESULTADO DE LA FERMENTACION A UN NIVEL DE AERACION DE 0.20 VVM

tiempo hr	produccion celular g/L	produccion vitamina mg/L	azucares residuales g/L	nitrogeno residual g/L	lactico residual g/L	productividad vitamina mg/L#hr	produccion especifica mgV/g.cel	velocidad crecimiento 1/hr
0.0	0.00	n.d.	45.4	2.94	7.36	n.d.	n.d.	---
3.0	0.11	n.d.	42.6	n.d.	7.03	0.0000	0.0000	0.122
6.0	0.28	n.d.	40.4	2.90	6.29	0.0000	0.0000	0.151
9.0	0.65	n.d.	36.7	2.86	3.25	0.0000	0.0000	0.135
12.0	1.06	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.0000	0.0000	0.100
23.3	3.51	1.5	36.1	2.63	0.00	0.0644	0.4274	0.060
33.5	6.80	n.d.	26.3	2.54	0.00	0.0000	0.0000	0.040
48.0	9.49	4.9	13.9	2.31	0.00	0.1021	0.5163	0.007
69.3	9.62	5.5	13.9	2.17	0.00	0.0794	0.5717	---
93.3	8.94	6.6	11.9	1.90	0.00	0.0707	0.7383	---
118.0	8.44	6.5	11.6	1.92	0.00	0.0551	0.7701	---

En el consumo de las fuentes de carbono, la glucosa se adicionó al medio en una concentración de 32.8 g/L. pero al determinar azúcares al inicio de la fermentación se obtuvo una mayor concentración de la adicionada, esto se debe a los azúcares reductores que son proporcionadas por el ACM. Al final de la fermentación quedan 11.6 g/L.. Estos azúcares, aunque reductores, no son metabolizables. En el caso del ácido láctico, proporcionado por el ACM, este se consume durante las primeras 24 horas de iniciada la fermentación. Parece ser que bajo las condiciones de cultivo existentes, el *P. shermanii*, prefiere el lactato a la glucosa ya que la velocidad de consumo para lactato, durante las primeras 24 horas de la fermentación es de 0.31 g/Ltxhr y para la glucosa de 0.38 g/Ltxhr, son los dos juntos lo que probablemente le ayuda a alcanzar su mayor velocidad de crecimiento. Lee (1985) reporta que el crecimiento de *P. shermanii* en presencia de glucosa y lactato presenta un crecimiento diáuxico, primero, con un consumo de ácido láctico y posteriormente de glucosa. En este caso no se observa este comportamiento, posiblemente por los tiempos de toma de muestra.

En lo que respecta a la fuente de nitrógeno, durante el proceso, solo se consume un tercio de la cantidad inicial.

Otro parámetro que permite comparar procesos diferentes, es la velocidad específica de producción de vitamina B₁₂ (Q_p mgV.B₁₂/g.celulaxhr), (Wang, D., 1979), que describe la eficiencia de las células para producir la vitamina. En la tabla VII se comparan las velocidades específicas de producción (Q_p) a los 3 días de iniciada cada fermentación en función del flujo de aire para cada una. Se puede ver que aún siendo mejor el valor de Q_p para el proceso de 0.35 v.v.m. con respecto al de 0.20 v.v.m., el primero

implica un flujo de aire 1.75 veces mayor. En la fermentación con una aereación de 0.65 v.v.m., el valor de Q_p es de 0.0076, pero que también es mayor por un factor de 3 en el flujo de aire al reactor. Ello implica un mayor gasto de energía para valores de Q_p semejantes; si bien a nivel de laboratorio no es tan importante, en una escala mayor es un parámetro importante para la economía del proceso.

 TABLA VII
 VELOCIDAD ESPECIFICA DE PRODUCCION DE VITAMINA B₁₂ (Q_p)
 A LOS DIFERENTES NIVELES DE AEREACION.

nivel de aereación (v v m)	Q_p * (mgVB ₁₂ /g celxh)	aumento relativo del flujo de aire
0.01	0.0058	1
0.10	0.0065	10
0.20	0.0070	20
0.35	0.0078	35
0.50	0.0052	50
0.65	0.0076	65
0.80	0.0066	80
1.00	0.0072	100
1.00**	0.0030	100

*a los tres días de inicio de cada proceso.

** a 690 rpm.

FERMENTACIONES CON DOS NIVELES DE AEREACION:

La mayor parte de los autores reportan que la producción de vitamina se lleva a cabo en dos fases, la primera, bajo condiciones anaeróbicas para la producción del anillo corrinoide y la segunda, en condición aeróbica para la producción del nucleótido 5,6-DMB., que completa la molecula de vitamina B₁₂.

Por esta razón, consideramos necesario realizar el estudio de producción de la vitamina en fermentaciones con dos fases, combinando diferentes niveles de aereación.

De los resultados encontrados en la primera parte de este estudio, se escogió una aereación de 0.20 vvm y una agitación de 350 rpm, que corresponde a un valor de K_{1a} de 10.3 h^{-1} , para la primera o segunda etapa, como se indica en la tabla VIII, donde se muestran los experimentos planteados para el logro de este objetivo.

 TABLA VIII
 NIVELES DE AEREACION PARA LAS FERMENTACIONES CON
 DOS NIVELES DE AEREACION COMBINADOS

PROCESO	1º NIVEL AEREACION V.V.M.	DURACION HORAS	2º NIVEL AEREACION V.V.M.	DURACION HORAS
B.1	0.01	0 a 24	0.20	24 a 120
B.2	0.20	0 a 24	1.00	24 a 120
B.3	1.00	0 a 24	0.20	24 a 120
B.4	0.01	0 a 48	0.20	48 a 120
B.5	0.20	0 a 48	1.00	48 a 120
B.6	1.00	0 a 48	0.20	48 a 120

Los criterios usados para escoger los niveles de aereación en los experimentos B.1. y B.4., se basaron en asemejarlo lo más posible a las condiciones de producción de vitamina a nivel industrial (Speedie & Hull, 1960) donde la primera fase es anaeróbica y la segunda aeróbica. Para los procesos B.2. y B.5., el primer nivel de aereación es por la adaptación del *P. shermanii* a producir vitamina, tal como se observó en los experimentos anteriores (tabla IV, figura 5), ya que está adaptada la bacteria este nivel de oxígeno, el cambio a un nivel de aereación alto se espera que se incremente la masa

celular y la producción de vitamina B₁₂. En los experimentos B.3. y B.6., se pensó favorecer primero un mayor crecimiento celular y posteriormente la síntesis de la vitamina, que suponemos se incrementaría por una mayor masa celular.

Fermentaciones con cambio a las 24 horas:

Para las fermentaciones con dos niveles de aereación con cambio a las 24 horas fué necesario realizar un nuevo control con un solo nivel de aereación de 0.20 v/m que se mantuvo constante toda la fermentación, ya que se utilizó un nuevo lote de ACM.

En lo que respecta al crecimiento celular en cada uno de los experimentos que se muestran en la figura 10, se observa que el crecimiento es similar al control durante las primeras 24 horas, esto es, antes del cambio. La única diferencia es en la fermentación que se inició con un mayor nivel de aereación y que durante estas primeras 24 horas, la masa celular fue mayor en 0.8 g/L, con respecto a las otras, lo que indica que este nivel de aereación es mejor para inducir la masa celular, manteniéndose esta tendencia hasta el final del experimento.

En la tabla IX se observa que a las 72 horas de iniciados los experimentos (donde encontramos la mayor producción de vitamina en el control), la productividad de células es mayor en aquellos con mayor

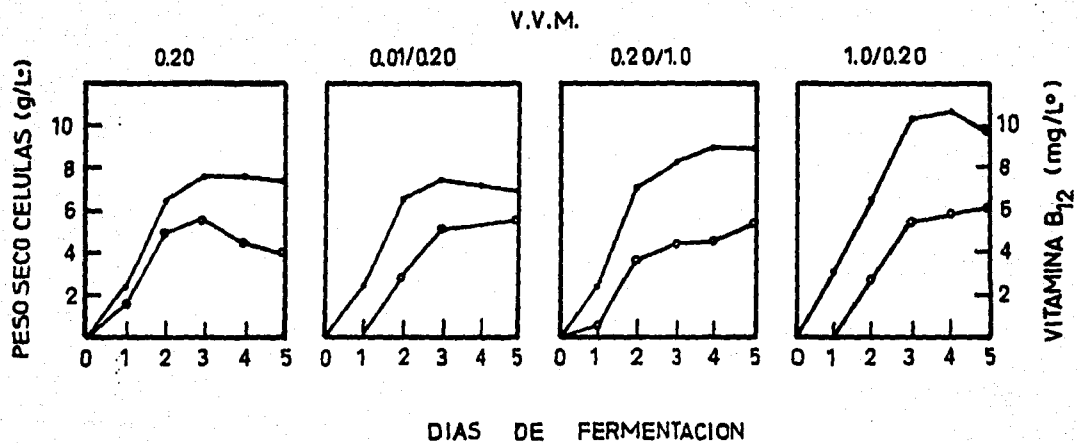


FIGURA 10. Crecimiento de *P. shermanii* ATCC 13673 y producción de Vitamina B₁₂ para las fermentaciones con niveles de aereación combinados con cambio a las 24 horas

TABLA IX
 RESULTADO DE LAS FERMENTACIONES A DOS NIVELES
 DE AEREACION CON CAMBIO A LAS 24 HORAS.

proceso	tiempo (hrs)	produccion max. V.B ₁₂ mg/L	produccion celular g/L	productividad		produccion especifica mgV/g.cel
				<u>mgV.</u> L*hr	<u>g.cel</u> L*hr	
control	72	5.4	7.62	0.077	0.105	0.733
B.1	72	5.1	7.40	0.070	0.102	0.697
B.2	72	4.2	8.31	0.058	0.115	0.502
B.3	72	5.4	10.30	0.075	0.143	0.525

TABLA X
 RESULTADO DE LAS FERMENTACIONES A DOS NIVELES
 DE AEREACION CON CAMBIO A LAS 48 HORAS.

proceso	tiempo (hrs)	produccion max. V.B ₁₂ mg/L	produccion celular g/L	productividad		produccion especifica mgV/g.cel
				<u>mgV.</u> L*hr	<u>g.cel</u> L*hr	
control	72	3.6	6.70	0.050	0.095	0.530
B.1	72	2.1	7.20	0.030	0.100	0.290
B.2	72	3.5	7.30	0.040	0.101	0.479
B.3	72	3.5	9.30	0.040	0.129	0.370

nivel de aereación, tal como se muestra en la figura 11.a.. La mayor velocidad específica de crecimiento la encontramos en el proceso B.3. lo que coincide con los resultados obtenidos en la primera parte de este trabajo.

Ahora, comparando estos valores de velocidad de crecimiento para los experimentos de aereación constante y los de cambio a las 24 horas, se observa en estos últimos una disminución en el valor de la velocidad. Creemos que esto se debe a que se trabajó con un lote diferente de A.C.M., que es la que aporta principalmente la fuente de nitrógeno, aparte de otros metabolitos, que tal vez por encontrarse en menor concentración, se hayan agotado más rápidamente, limitando la velocidad de crecimiento, así como el nivel de oxígeno.

En el caso de la producción de vitamina B₁₂, la mayor concentración se encontró a las 72 horas en el experimento control, siguiéndole en producción el proceso B.3., tal como se muestra en la figura 10 y en la tabla IX. Igualmente, los valores de productividad y rendimiento de vitamina son mayores en el control que en los demás procesos. En aquellos que iniciaron con un nivel de aereación de 0.01 v.v.m. y de 1.0 v.v.m., se detectó vitamina hasta las 48 horas, lo que no es congruente con los resultados obtenidos en la primera parte, por lo menos en lo que se refiere a procesos con estos niveles de aereación. Esto puede deberse a la calidad del lote de ACM, que más adelante se trata explicar.

Para entender mejor estos resultados, se llevó a cabo una serie de cromatografías en placa fina, tal como se indica en materiales y

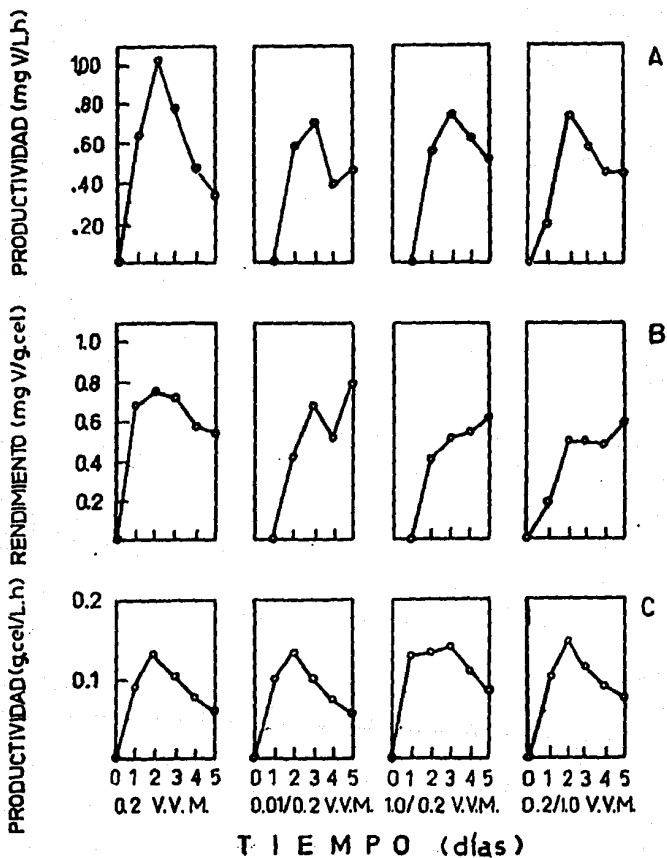


FIGURA 11. (A) Productividad de vitamina; (B) Rendimiento de vitamina y (C) Productividad celular de *P. shermanii* para las fermentaciones combinadas con cambio en el nivel de aereación a las 24 horas

métodos. Se analizaron las muestras donde se determinó la vitamina, concentrando estas a sequedad en una estufa al vacío, con una temperatura de 50°C, agregando luego 0.5 mL. de la solución de propanol-cianuro; de aquí se tomaron 10 microlitros para correr la cromatografía. Los resultados se muestran en la figura 12. Aquí se observa que en el control, a las 24 horas de iniciada la fermentación, aparece la mancha que corresponde a la vitamina B₁₂, y hasta las 72 horas la que corresponde al 5,6-DMB, el cual ya está produciéndose en exceso, lo que indica que en este momento su síntesis es mayor a la del factor B (anillo corrinoide).

Para el proceso B.1., es hasta las 48 horas que aparece la primera mancha, correspondiendo al nucleótido 5,6-DMB, y la vitamina completa hasta las 72 horas. Sin embargo, por la técnica de determinación de vitamina, a las 48 horas se detectaron 2.8 mg/L. de vitamina, sin detectarse la mancha en el cromatograma. Tampoco aparece en el cromatograma a este tiempo la mancha que corresponde al factor B, que tampoco se encontró durante las primeras 24 horas. Esto nos indicaría que no es este el nivel adecuado de aereación para la producción de la vitamina, aun teniendo una cantidad similar de masa celular a la del control.

La razón de que fuera hasta las 48 horas de iniciado este proceso (pero ya a 24 horas del cambio) apareciera primero la mancha que corresponde al nucleótido 5,6 DMB, puede deberse al cambio de aereación, ya que se aumentó 20 veces el flujo del aire al fermentador, y entonces este cambio en la concentración de oxígeno afectó a la síntesis de este compuesto.

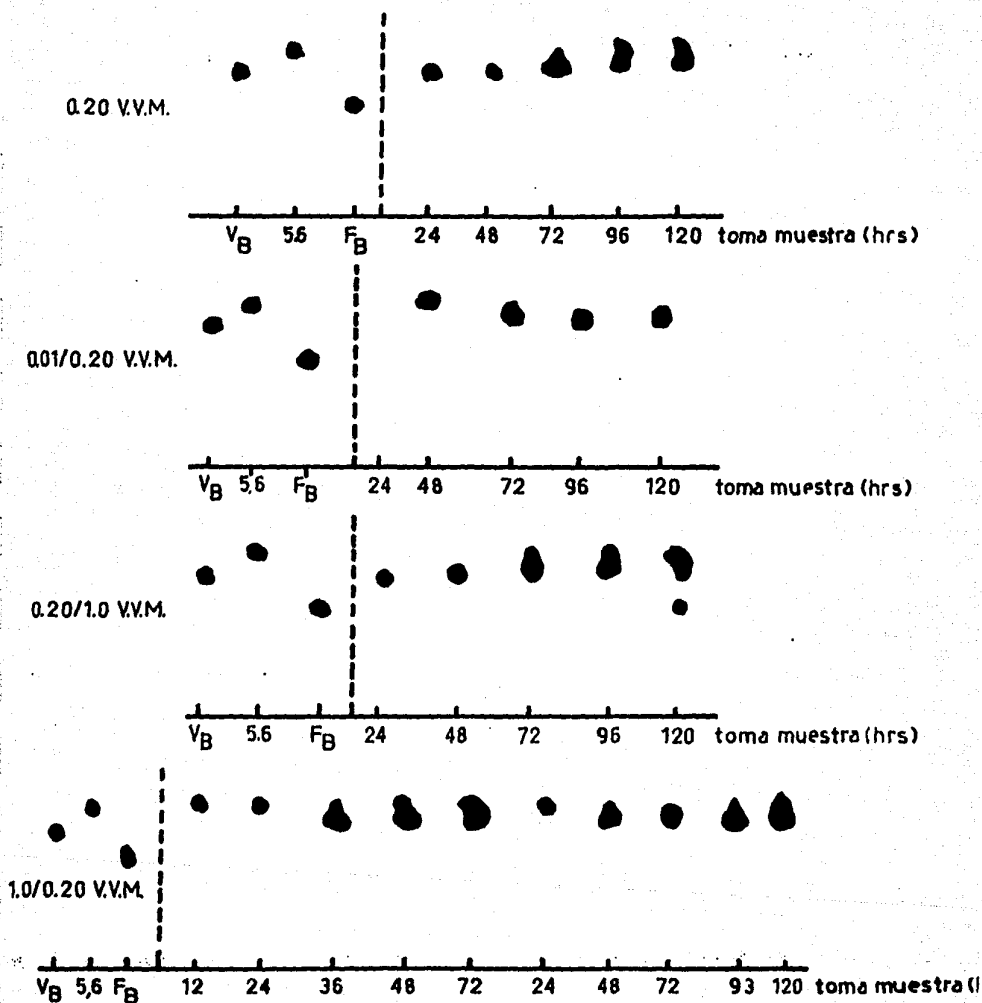


FIGURA 12. Cromatogramas de las fermentaciones combinadas con cambio en el nivel de aereación a las 24 horas. Los estandares son Vitamina B₁₂ (V_B); Nucleótido 5,6-DMB (5,6) y Factor B (F_B).

Esto no sucede en el proceso B.2., donde se observa que a las 24 horas de iniciado el proceso, ya aparece la mancha que corresponde a la vitamina B₁₂ y hasta las 72 horas la que corresponde al 5,6-DMB, cuando el cambio en el nivel de aereación fue 48 horas antes. Al contrario que el caso anterior, parece ser que el cambio en el nivel de aereación no afectó la producción de vitamina. En este proceso, el cambio de aereación significó un aumento de 5 veces el flujo de aire; por lo que podemos pensar que cambios drásticos en la concentración de oxígeno, como es el caso del proceso B.1. si puede afectar a las enzimas que controlan la síntesis de la vitamina B₁₂ en células completas.

En el proceso B.3. aparece la mancha que corresponde a la vitamina a partir de las 36 horas, cuando han transcurrido 12 horas del cambio en el nivel de aereación, y se mantiene esta hasta el final del proceso. Es significativo el hecho de que 12 horas después de haberse dado el cambio de aereación ya aparezca la vitamina, lo que no sucede en los procesos anteriores. Este resultado ayuda a seguir afirmando que el nivel de aereación correspondiente a un K_La de 10.3 h⁻¹ es, hasta este momento, el adecuado.

Fermentaciones con cambio a las 48 horas:

Para las fermentaciones con dos niveles de aereación con cambio a las 48 horas, se volvió a realizar un nuevo control con un nivel constante de aereación de 0.20 v v m, ya que se cambió el lote de

ACM por uno nuevo. Los siguientes experimentos corresponden a los procesos B.4.; B.5. y B.6..

Para el crecimiento celular en la figura 13 se muestra el comportamiento de estos experimentos y el nuevo control. Se observa que el crecimiento celular de los procesos B.4. y B.5. es semejante al control, no así para el proceso B.6., donde el crecimiento celular a las 48 horas (momento del cambio de aereación), fue mayor por 2 g/L., resultado igual que el proceso B.3., donde se inició con un nivel de aereación de 1.0 v v m.

En la tabla X, observamos la productividad celular a las 72 horas de iniciados los procesos, donde el menor valor corresponde al control y luego al proceso B.5., que tienen como característica común, las primeras 48 horas con aereación igual. Los valores de productividad se encuentran graficados en la figura 14c, siendo la mayor productividad celular la del proceso B.6.

Con respecto a la producción de vitamina B₁₂, en la figura 13 se muestra la producción en cada experimento estudiado, comparándolo con el nuevo control. Este nuevo control lo podemos comparar en la figura 15 y 16, donde es menor la producción y el crecimiento celular para los experimentos con cambio a las 48 horas, debido tal vez al cambio de lote de ACM.

La mayor cantidad de vitamina se obtuvo en el control a las 72 horas del inicio de la fermentación, siguiéndole en producción los procesos B.5. y B.6., En el B.5. la producción de vitamina sigue aumentando hasta el final de la fermentación, esto como consecuencia

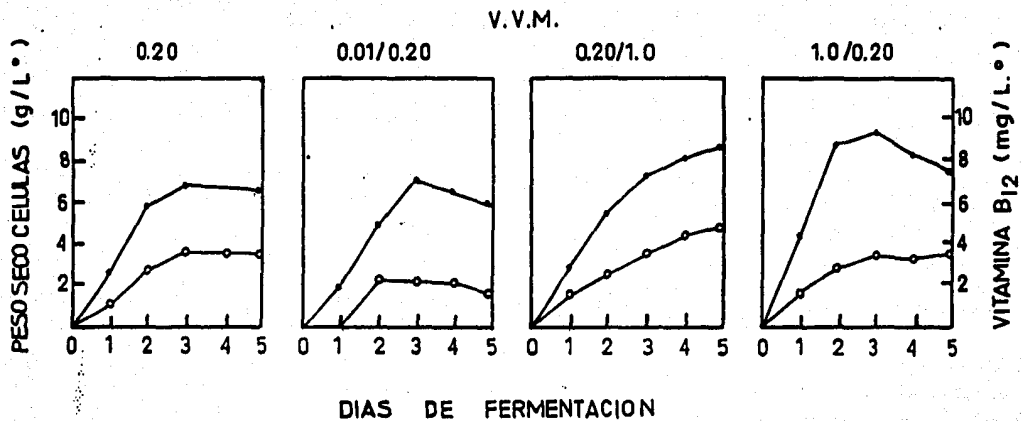


FIGURA 13. Crecimiento de *P. shermanii* ATCC 13673 y producción de Vitamina B₁₂ para las fermentaciones con niveles de aereación combinados con cambio a las 48 horas.

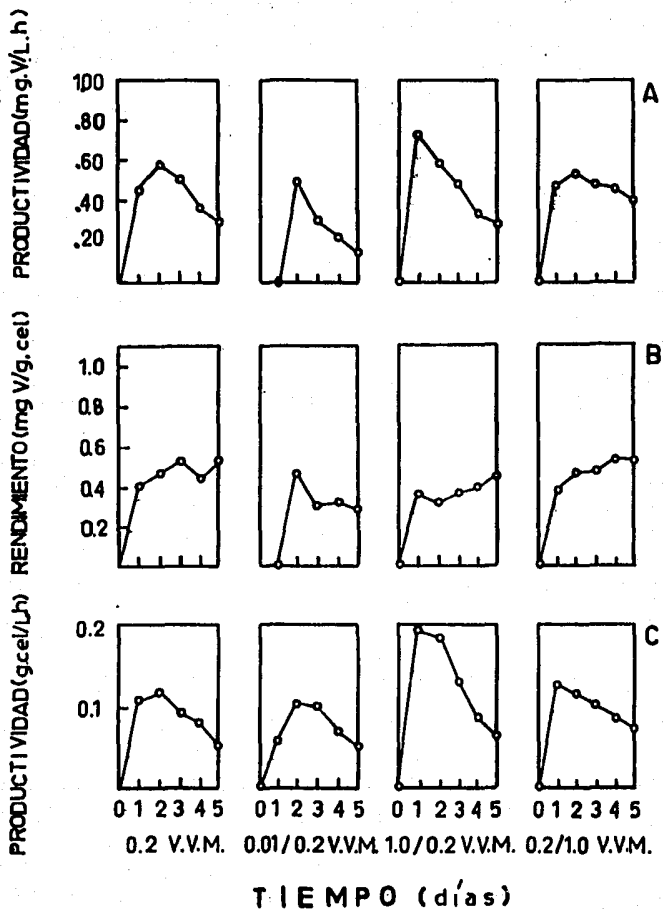


FIGURA 14. (A) Productividad de Vitamina; (B) Rendimiento de Vitamina y (C) Productividad celular de *P. shermanii* para las fermentaciones combinadas con cambio de aereación a las 48 horas.

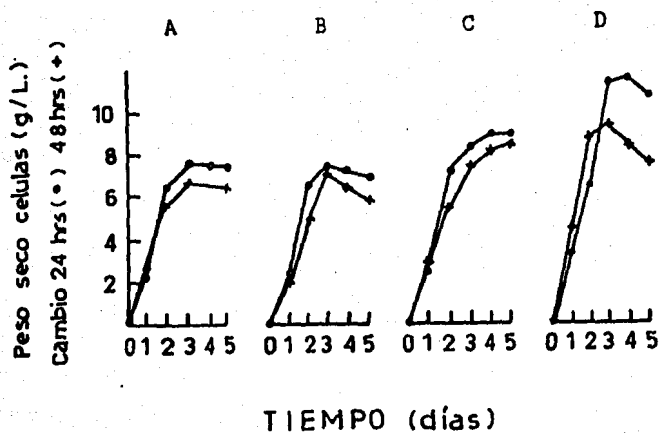


FIGURA 15. Comparación del crecimiento de E. Shermanii para las fermentaciones combinadas con cambios de aereación a las 24 y 48 horas. (A) control (B) 0.01/0.20 ; (C) 0.20/1.0 y (D) 1.0/0.20 v.v.m..

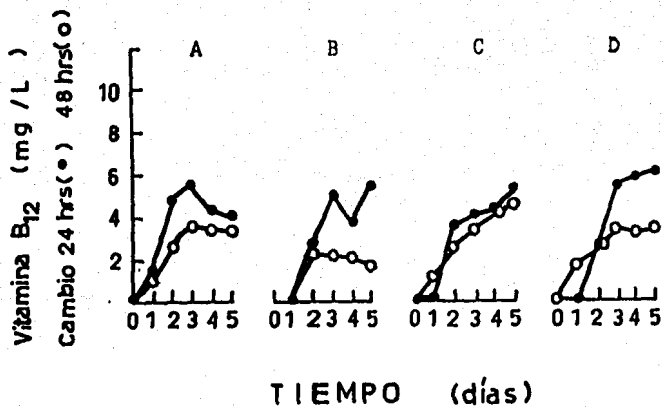


FIGURA 16. Comparación de la producción de Vitamina B₁₂ para las fermentaciones combinadas con cambio de aereación a las 24 y 48 horas. (A) control (B) 0.01/0.20; (C) 0.20/1.0 y (D) 1.0/0.20 v.v.m..

del aumento de masa celular provocado por el cambio de nivel de aereación y en consecuencia, un aumento en la síntesis de la vitamina cuando el microorganismo se encuentra adaptado al nivel de aereación de 0.20 v v m. Este resultado se puede comparar al proceso B.6., donde a las 72 horas se inicia un descenso en la concentración de la masa celular, donde la concentración de vitamina permanece casi constante hasta el final.

En la tabla X se muestra que la productividad de vitamina a las 72 horas es semejante entre el control y los procesos B.5. y B.6., no así en el proceso B.4., donde el cambio de aereación afectó la producción de vitamina (Fig. 14a). En el caso del proceso B.5., hacer el cambio de aereación a las 48 horas resultó benéfico, ya que las células se encontraron un mayor tiempo en el nivel de aereación en el cual la biosíntesis de la vitamina fué mejor.

En las figuras 15 y 16, se comparan los 6 experimentos anteriores con sus controles. Es de notarse que en los tres últimos procesos, junto con su control, la producción de vitamina disminuyó con respecto a los tres primeros y su control. En el caso de la producción de masa celular, es semejante a todos los experimentos anteriores, por lo menos durante las primeras 24 horas y disminuyen gradualmente para los procesos B.4. al B.6., que fueron llevados a cabo con un lote diferente de A C M.

La diferencia mayor en estos experimentos, aparte del tiempo de cambio en el nivel de aereación, fue la calidad de la fuente de nitrógeno, que en estos casos fué el agua de cocimiento de maíz. Para este sustrato solo se ajustó el contenido de nitrógeno para el medio

de cultivo, sin embargo debe haber diferencias en cantidad o calidad de algun otro sustrato que aporta esta fuente, que siendo tan compleja, es igualmente dificil controlar todos sus componentes.

Comparando ambos procesos y sus controles, nos damos cuenta de que el agua de cocimiento de maiz es buena para soportar el crecimiento celular, y en algunas ocasiones, deficiente para inducir una buena producción de la vitamina, o bien, mantener los niveles de producción. Huber y colaboradores (1963), realizaron un estudio con diferentes lotes de agua de cocimiento de maiz, donde llegaron a la conclusión de que los nutrientes que aporta este sustrato son de dificil control, ya que se depende de la calidad del maiz y de las condiciones de su tratamiento. Los autores concluyen en este estudio, que si el ACM produce lo esperado, es buena, aunque no da parametros para comparar la calidad del sustrato.

En conclusión sobre los experimentos de aereación constante y con cambio a las 24 y 48 horas, se puede decir que el mejor proceso es con un nivel de aereación constante de 0.20 v.v.m., que corresponde, bajo las condiciones experimentales de trabajo, a un valor de k_1a de 10.3 h^{-1} (en agua). Esto se muestra a lo largo de la investigación, donde la productividad y la producción de vitamina a las 72 horas de iniciados en los diferentes lotes de agua de cocimiento de maiz, siempre fueron mayores en los controles.

Si la célula se adapta a este nivel de aereación desde el inicio del proceso, no se verá afectada la producción de vitamina, como sucede en los procesos donde primero se trabajó con 0.20 v.v.m. y posteriormente se elevo a 1.0 v v m.

Lascelles (1960, 1966) y Burton (1981), reportaron que las enzimas que inician y controlan la biosíntesis de los tetrapirroles, están reguladas por el oxígeno, que impide la formación de los productos finales de esta vía. Ahora, por los resultados obtenidos en este trabajo se puede deducir que cambios drásticos en el nivel de aeración provocan una alteración en la tendencia de producción de vitamina, como fué el cambiar de 0.01 v.v.m. a 0.20 v.v.m. (x 20), no así cuando el cambio fué de 0.20 v.v.m. a 1.0 v.v.m. (x5) o al contrario.

El trabajar primero con niveles altos de aeración, puede provocar que la producción de vitamina se retarde hasta por 24 horas, lo mismo cuando se inicia con niveles bajos de aeración, por lo que es preferible no cambiar las condiciones del proceso, ya que como se observa, en los controles se mantiene una tendencia en la producción de vitamina. Esto implica la necesidad de profundizar los estudios de regulación de esta vía, con células completas y bajo las condiciones de aeración probadas en este trabajo

Por otro lado, el uso de un sustrato complejo como el A C M presenta varios problemas que se resolverán hasta determinar todos los componentes que de ella forman parte, y tratar de mantener la concentración de ellos en otros lotes. Si no es posible controlar la calidad del A C M, se deben de fijar límites inferiores donde la producción es aceptable para las diversas calidades del sustrato.

El proceso industrial de producción de vitamina B₁₂ por fermentación de P. shermanii implica una primera fase de 48 horas en condiciones anaeróbicas, saturando el reactor con nitrógeno (Aries,

R. 1974; Speedie & Hull, 1960). Ahora, el usar un solo nivel de aereación durante la fermentación, implica un menor costo, por ser más económico el uso de aire desde el principio.

Para lograr valores de 10.3 h^{-1} en el $K_L a$, bajo las condiciones experimentales se fijaron: un flujo de aire de 0.20 vvm y una agitación de 350 rpm. Para efectos de escalamiento, este dato es importante.

Como el objetivo de este trabajo fue determinar las condiciones de producción de vitamina para el proceso de cultivo continuo, este se logró al encontrar que un nivel de aereación constante durante todo el proceso es suficiente para producir este metabolito. Como es una sola fase, no será necesario el trabajar con dos reactores como la propuesta de Riley (1961), que ya se discutió anteriormente. El uso de un solo nivel de aereación, implica el uso de un solo reactor, disminuyendo en consecuencia las necesidades de equipo, así como el costo de operación y de control. Si esto es posible, se abre la necesidad de proseguir estos estudios, ya que la literatura no reporta antecedentes sobre la producción de vitamina en cultivo continuo, en una sola fase de aereación.

Hasta ahora parece ser que el mejor nivel de producción de la vitamina B_{12} es cuando se trabaja con 0.20 vvm. En las figuras 17, 18 y 19 se muestran los valores de producción, producción específica y productividad de vitamina, reportados en porcentaje (%) con respecto al proceso control, ya que así se facilita la interpretación de los resultados obtenidos en los procesos combinados. El 100% de producción representa la máxima cantidad de

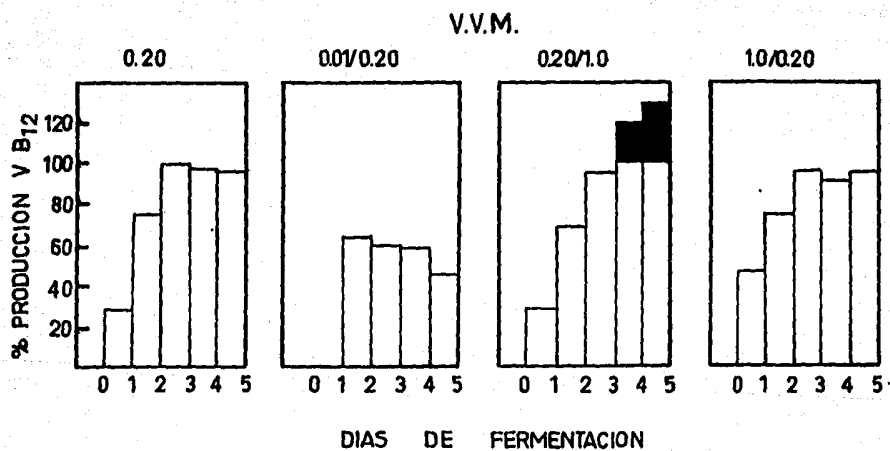
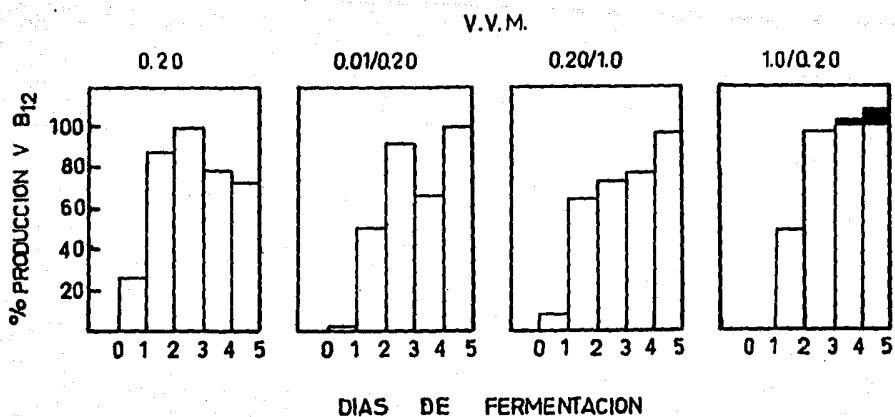


FIGURA 17. Porcentaje de producción de Vitamina B₁₂ para las fermentaciones combinadas con cambio de aereación a las 24 horas (A) y las 48 horas (B) con respecto al nivel constante de aereación (control). El 100% de producción se fijó a los 3 días del inicio de la fermentación. Las zonas oscuras indican valores superiores al 100%

vitamina obtenida en el control a las 72 horas de iniciados los experimentos. La parte sombreada de las barras indica valores mayores al 100%.

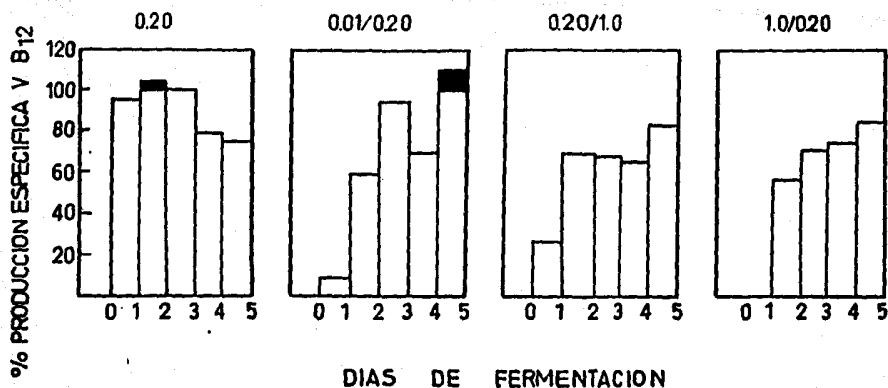
En la figura 17, se muestra el porcentaje de producción respecto al control de vitamina para los procesos con cambio en el nivel de aereación a las 24 horas (fig. 17-A) y a las 48 horas (fig. 17-B). Aquí se observa que en los controles, la máxima producción de vitamina (100%) fue a las 72 horas, mejorandose la producción hasta en un 30% en el nivel combinado de 0.20/1.0 v v m, desde las 96 hasta las 120 horas.

La figura 18 muestra el porcentaje de producción específica con respecto al control para ambos procesos combinados, tomándose el 100% a las 72 horas de iniciado el proceso. La figura 19 muestra los porcentajes de la productividad con respecto al control cuyo 100% se fijó a las 72 horas.

Para fines prácticos y siendo de importancia para nosotros la capacidad de producción de vitamina B₁₂ por P. shermanii bajo nuestras condiciones de trabajo, se comparan unicamente los porcentajes de productividad y producción específica, que teniendo significados diferentes, muestran la eficiencia del proceso sobre la célula misma (producción específica) en un caso y el de productividad sobre el proceso en general.

Para la producción específica (Fig. 18) y la productividad (fig. 19), encontramos que entre los procesos control para el cambio a las 24 y 48 horas, se observa variación entre los resultados, para los distintos lotes de agua de cocimiento de maíz. Este

V.V.M.



V.V.M.

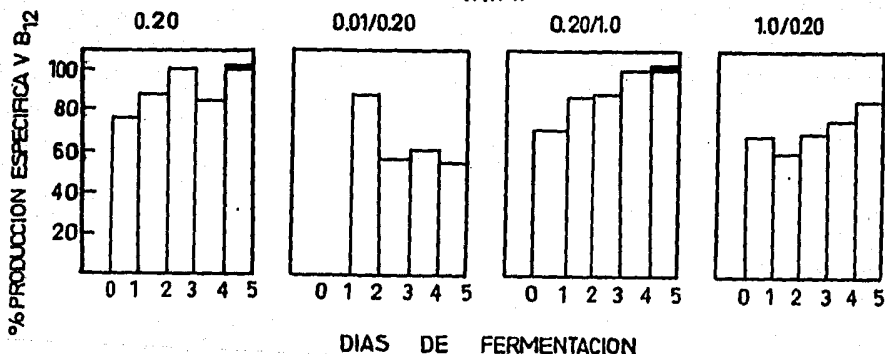


FIGURA 18. Porcentaje de producción específica de vitamina B₁₂ para las fermentaciones combinadas, con cambio de aireación a las 24 horas (A) y a las 48 horas (B) con respecto al nivel constante de aireación (control). El 100% de producción se fija a los tres días del inicio de la fermentación. Las zonas oscuras indican valores superiores al 100%

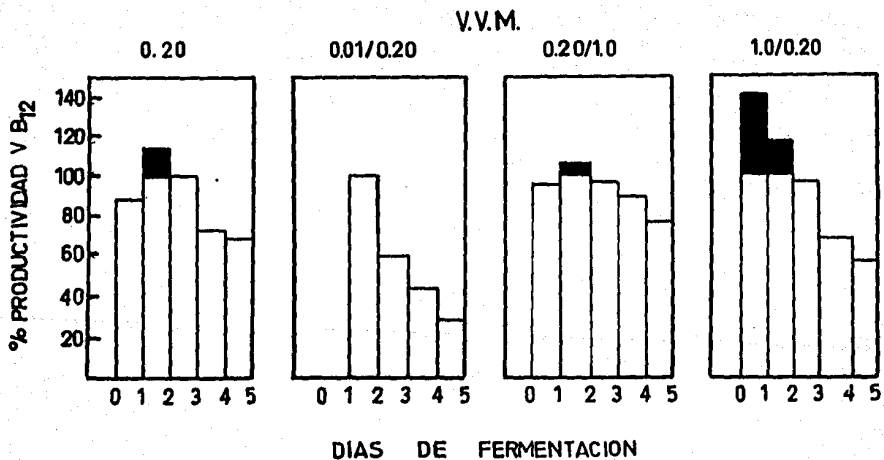
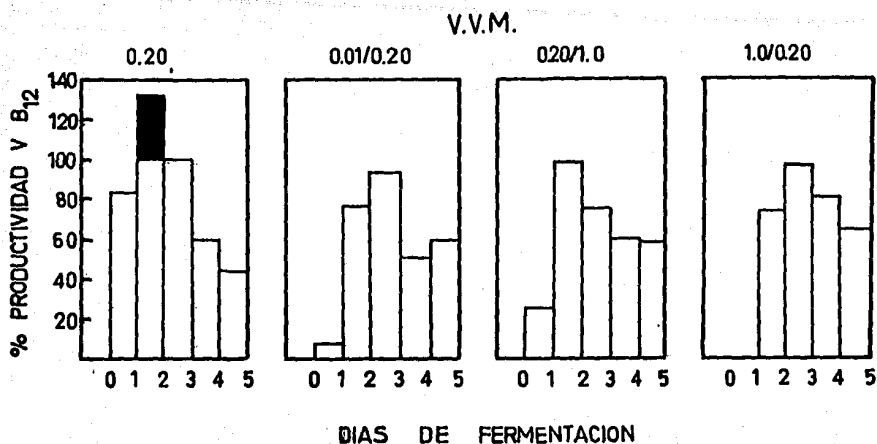


FIGURA 19. Porcentaje de productividad de vitamina B₁₂ para las fermentaciones combinadas, con cambio de aereación a las 24 horas (A) y a las 48 horas (B) con respecto al nivel constante de aereación (control). El 100% de producción se fijó a los tres días del inicio de la fermentación. Las zonas oscuras indican valores superiores al 100%

comportamiento lo encontramos de una manera mas drastica cuando se comparan ambos procesos combinados. Esto puede ser una indicación mas de que los distintos lotes de agua de cocimiento de maíz afectan el proceso. La observacion se acentua cuando se realizan cambios en el nivel de aereación.

Cultivo Continuo:

La producción de vitamina B₁₂ se ha llevado a cabo normalmente en procesos en lote y la obtencion de este metabolito mediante otros procesos no ha sido muy usado. En la tabla II_a encontramos que solo los reportes de Riley. (1961), Pritchard, (1977), Lee, (1974) son en cultivo continuo y el de Yongsmith (1983) fué con células inmobilizadas.

Riley, (1961) establecio un proceso continuo de obtención de esta vitamina tomando en cuenta la producción tradicional en lote, primero una fase anaerobia y posteriormente una fase a la que se le adiciona oxígeno, cada fase en un reactor distinto.

Otro proceso en una sola fase, bajo condiciones de oxigenación es el propuesto por Tsuchiya (1980), pero trabajando con Pseudomonas AM-1 que crece y produce la vitamina en concentraciones de 3 ppm de oxígeno, así como el reporte de Pritchard (1977) sobre el comportamiento de P. shermanii en cultivo continuo, donde cuantifica la aparición de enzimas del tipo de los citocromos, sin haber estudiado la aparición de vitamina B₁₂

Con base en los resultados obtenidos a lo largo de este proyecto y ante la posibilidad de producir la vitamina bajo una fase aerobia constante durante todo el tiempo que dure el proceso, se abre la posibilidad de probar el cultivo continuo como un proceso de obtención de la vitamina B₁₂. Esto plantea una perspectiva distinta a la planteada por Riley.

Para esto se procedió a montar una nueva fermentación en lote bajo las condiciones bajo las cuales se logro la mayor producción de la vitamina, es decir, con una aereación de 0.20 v.v.m. y agitación de 350 rpm ($K_L a = 10.3 \text{ h}^{-1}$) pero con un nuevo lote de agua de cocimiento de maiz, lo que llevo a determinar el comportamiento del proceso con este nuevo lote de sustrato.

Los resultados de este estudio en lote se muestran en la figura 20 y en la tabla XI donde se señala la cinética completa con los valores de rendimientos y velocidades específicas y volumétricas, necesarios para la elaboración del medio de cultivo que fluirá al reactor para mantener un estado estacionario.

En este proceso en lote, a las 24 horas de iniciado se obtuvo una concentración de vitamina, la cual fué más o menos constante durante todo el proceso. A este tiempo la velocidad de crecimiento tiende a disminuir, lo cual pareció conveniente para mantener en este momento un estado estacionario más estable estando muy lejos de llegar a la velocidad de dilución crítica por trabajar con altos valores de tasa de dilucion (D). En este momento, tanto la productividad y el rendimiento de la vitamina son altos.

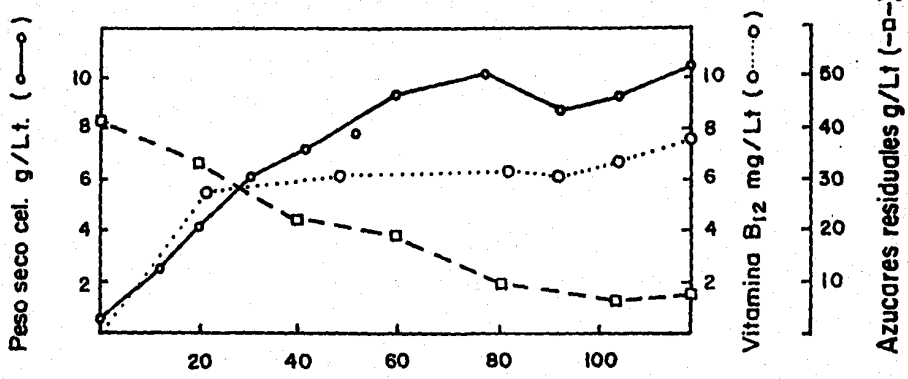


FIGURA 20. Cinetica de la fermentacion de *P. shermanii* ATCC 13673 a un nivel de aereacion de 0.20 v.v.m. y 350 rpm.

TABLA XI
CULTIVO EN LOTE PARA DETERMINAR
LOS PARAMETROS DEL CULTIVO CONTINUO

tiempo (hrs)	peso seco (g/L)	Vitamina B ₁₂ (mg/L)	glucosa residual (g/L)	productividad vitamina (mg/L*h)	productividad celular (g/L*h)
0.0	0.70	n.d.	43.6	n.d.	n.d.
4.0	0.98	n.d.	41.2	n.d.	0.0068
8.0	1.59	n.d.	40.6	n.d.	0.1106
12.4	2.50	n.d.	38.1	n.d.	0.1443
16.0	3.21	n.d.	n.d.	n.d.	0.1562
20.0	4.10	n.d.	36.4	n.d.	0.1695
24.2	4.98	5.49	31.9	0.22	0.1764
28.0	5.20	n.d.	29.5	n.d.	0.1803
32.0	6.13	n.d.	n.d.	n.d.	0.1910
40.0	6.66	n.d.	22.7	n.d.	0.1665
48.0	7.44	6.11	n.d.	0.12	0.1550
70.0	8.54	4.96	18.1	0.07	0.1220
83.0	9.02	6.33	9.37	0.07	0.1086
93.0	8.68	6.13	8.65	0.06	0.0933
120.0	10.48	7.7	8.61	0.06	0.0875

Con base en este resultado se concluyo fijar bajo estas mismas condiciones, el cultivo continuo a las 20 horas de iniciado el proceso, con los siguientes parametros importantes para la elaboracion del proceso.

concentracion celular a las 20 horas: 4.1 g/L.

velocidad de crecimiento (μ): 0.0527 h⁻¹

azucar consumido: 7.17 g/L.

nitrógeno consumido: 0.43 g/L.

q_s (glucosa): 0.5076 g/L.h.

q_s (nitrógeno): 0.024 g/L.h

Q_s (glucosa): 0.1238 g.gluc./g.cel.h

Q_s (nitrógeno): 0.0048 g.N₂/g.cel.h.

$Y_{x/s}$ = 0.5718 g.cel/g.glucosa

De acuerdo a las ecuaciones que fijan el estado estacionario; para el cultivo continuo (Wang, D.I., 1979):

$$X = Y(S_0 - S) \quad \text{-----(1)} \quad \text{y:} \quad D = F/V = \quad \text{-----(2)}$$

$$\text{y} \quad \mu = D$$

Sustituyendo valores en (1):

$$4.1 \text{ g.cel/L.} = 0.5718 \text{ g.cel/g.gluc (S}_0 - \text{S)}$$

$$(\text{S}_0 - \text{S}) = 4.1 \text{ g.cel.L}^{-1} / 0.5718 \text{ g.cel.} \times \text{g.gluc}^{-1}$$

$$(\text{s}_0 - \text{S}) = 7.17 \text{ g.gluc/L.}$$

Para la ecuacion (2), despejando el flujo:

$$F = D \times V = 0.0527 \text{ h}^{-1} \times 3000 \text{ mL.} = 158.1 \text{ mL/h}$$

Si los valores de consumo de sustrato a las 20 horas de iniciado el proceso son:

$$q_s \text{ glucosa} = 0.5076 \text{ g/L.h.} \quad \text{para 3 L.} \quad q_s = 1.523 \text{ g/3L.h.}$$

$$q_{sN_2} = 0.0247 \text{ g/L.h.} \quad \text{para 3 L.} \quad q_{sN_2} = 0.074 \text{ g/3L.h.}$$

y

$$Q_s \text{ glucosa} = 0.1238 \text{ g/g.cel.h.}; \text{ para 4.1 g.células/L.}$$

$Q_s \text{ glucosa} = 0.5075 \text{ g/4.1 g.cel.h.}$; y para 3L. de volumen del reactor:

$$Q_s \text{ glucosa} = 1.525 \text{ g.glucosa/12.3 g.cel.h.},$$

y para el nitrógeno:

$$Q_{sN_2} = 0.048 \text{ g/g.cel.h.}; \text{ para 4.1 g.células/L}$$

$$Q_{sN_2} = 0.02 \text{ g/4.1 g.cel.h.}; \text{ y para 3L. de volumen del reactor}$$

$$Q_{sN_2} = 0.06 \text{ g/12.3 g.cel.h.}$$

Con estos datos ya es posible formular el medio de cultivo que servirá como afluente al reactor para mantener el estado estacionario. El medio se formulo con una concentración de 10g/L. de glucosa, 1g/L. de nitrógeno aportado por el agua de cocimiento de maíz y 5ppm de cobalto, teniendo así una concentración de glucosa en el flujo de entrada de:

158.1g.glucosa/158.1 mL.h. y de nitrógeno:

0.158g.N₂/158.1 mL.h.,

con lo que se mantiene constante el valor de Q_g para glucosa y se sobrepasa el valor de Q_g para nitrógeno, por lo que el sustrato limitante será la glucosa. La fuente de nitrógeno permanece en exceso, así como el cobalto, que se encuentra en una concentración de 5 ppm.

En la figura 21 se muestra el diagrama del montaje del equipo y accesorios necesarios para el reactor acondicionado para cultivo continuo.

En las figuras 22 y 23 se muestran los perfiles de comportamiento del cultivo continuo y en las tablas XII y XIII los resultados de cada proceso respectivo a las figuras anteriores.

En la figura 22 se muestra el de comportamiento del primer cultivo continuo, fijándose este a las 20.5 horas de iniciado el proceso de fermentación. Se observa una tendencia al lavado celular en el reactor, sin lograr un estado estacionario. Igualmente en la

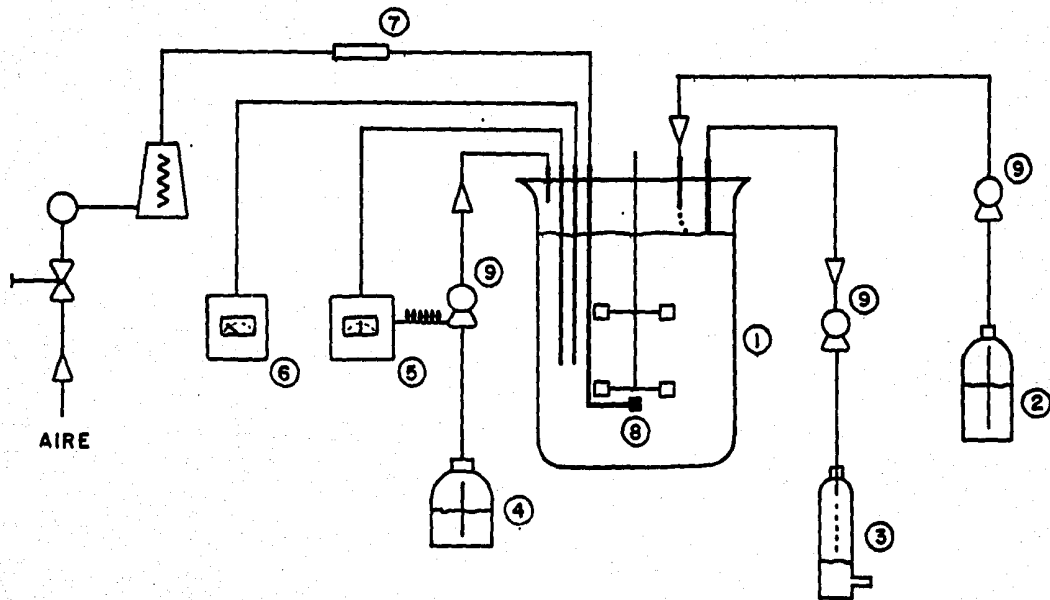


FIGURA 21. Diagrama del equipo para el proceso del Cultivo Continuo
 (1) fermentador, (2) medio de cultivo nuevo, (3) caldo gastado
 (4) NaOH, (5) potenciómetro, (6) detector de oxígeno disuelto
 (7) filtro de aire, (8) difusor, (9) bombas peristálticas.

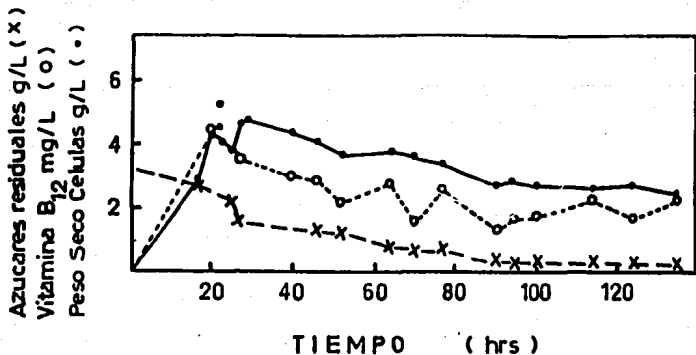


FIGURA 22. Perfil del cultivo continuo con una velocidad de dilución (D) de 0.0527 h⁻¹.

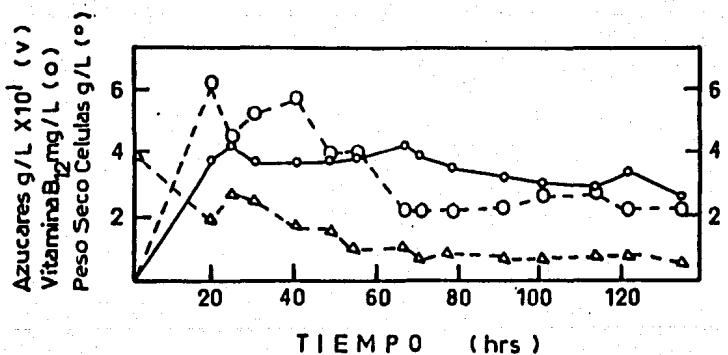


FIGURA 23. Perfil del cultivo continuo con una velocidad de dilución de 0.047 h⁻¹.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

TABLA XII
CULTIVO CONTINUO CORRIDA NUMERO I

tiempo hrs	peso seco gcel/L	Vit B12 mg/L	pH	% O2O	azucar residual g/L	N2 residual g/L	produc tividad mgV/Lh	produc- tividad g. cel/Lh	rendia ento mgV/g.cel
0.900	0.000	0.000	7.00	0.000	31.750	3.000	0.000	0.000	0.000
17.000	2.960	4.330	6.80	0.000	27.240	2.200	0.255	0.174	1.463
20.500	4.230	0.000	7.00	0.000	n.d.	n.d.	0.000	0.206	0.000
22.000	4.430	5.220	7.00	0.000	38.370	2.200	0.237	0.201	1.178
23.100	4.020	0.000	6.25	0.000	n.d.	n.d.	0.000	0.174	0.000
25.200	3.700	2.980	6.90	0.000	21.760	2.100	0.118	0.147	0.805
27.200	4.550	3.500	6.85	0.000	17.340	1.700	0.129	0.167	0.769
29.200	4.750	0.000	6.95	0.000	n.d.	n.d.	0.000	0.153	0.000
40.400	4.460	3.000	6.85	0.000	21.670	1.400	0.074	0.110	0.673
46.100	4.160	2.800	6.85	0.000	14.510	0.000	0.061	0.090	0.673
52.100	3.530	2.100	6.90	0.000	11.590	0.000	0.040	0.070	0.579
64.400	3.830	2.900	6.80	0.000	6.130	0.000	0.045	0.059	0.757
70.300	3.630	1.700	6.80	0.000	6.800	0.000	0.024	0.052	0.469
77.100	3.460	2.600	6.80	0.000	6.470	0.000	0.034	0.045	0.751
90.100	2.810	1.200	6.90	0.000	4.870	0.000	0.013	0.021	0.427
94.000	2.910	1.700	6.80	0.000	4.870	0.000	0.013	0.031	0.524
100.000	2.810	1.800	6.80	0.000	4.870	0.000	0.018	0.028	0.541
114.000	2.530	2.000	6.80	0.000	4.230	0.000	0.018	0.023	0.760
124.000	22.730	1.700	6.90	0.000	3.610	0.000	0.014	0.193	0.075
135.000	2.430	2.200	6.80	0.000	2.380	0.000	0.016	0.018	0.905

TABLA XIII
 CULTIVO CONTINUO CORRIDA NUMERO 2

tiempo hrs	peso seco gcel/L	vit B12 mg/L	pH	% O2O	azucar residual g/L	lactico residual g/L	N2 residual g/L	produc tividad mgV/Lh	produc tividad g.cel/Lh	rendimi ento mgV/g.cel
0.00	0.00	0.00	6.90	2.00	38.19	12.00	3.00	0.000	0.000	0.000
20.00	3.67	6.00	6.90	0.00	18.38	0.00	2.96	0.300	0.185	1.626
25.00	4.13	4.50	6.90	0.00	26.98	1.30	1.97	0.160	0.165	1.090
30.00	3.65	5.20	6.90	0.00	24.27	0.00	2.01	0.173	0.122	1.425
41.30	3.63	5.70	6.90	0.00	16.80	0.00	1.63	0.138	0.088	1.570
48.10	3.78	3.80	6.00	0.00	15.11	0.00	1.03	0.079	0.079	1.005
54.30	3.85	3.90	6.60	0.00	8.80	0.00	n.d.	0.072	0.071	1.013
66.55	4.25	2.10	6.70	0.00	9.35	0.00	1.05	0.032	0.064	0.494
71.00	3.85	2.20	6.90	0.00	6.80	0.00	n.d.	0.031	0.054	0.571
78.30	3.52	2.10	6.90	0.00	7.46	0.00	0.67	0.027	0.045	0.597
91.30	3.23	2.20	6.80	0.00	6.60	0.00	n.d.	0.024	0.035	0.681
101.00	3.10	2.60	6.80	0.00	6.34	0.00	0.54	0.026	0.031	0.839
113.40	2.94	2.70	6.60	0.00	6.90	0.00	n.d.	0.024	0.026	0.918
122.10	3.31	2.20	6.80	0.00	6.80	0.00	0.71	0.018	0.027	0.665
136.40	2.57	2.30	6.90	0.00	5.18	0.00	0.57	0.017	0.019	0.688

concentración de vitamina, la tendencia es a disminuir su producción. Para corregir este problema, a las 70 horas de iniciada la fermentación, se disminuyó la velocidad de dilución a un valor de 0.047 h^{-1} , fijándose un flujo de 141 mL/h, notándose un equilibrio semejante al estado estacionario entre 20 y 25 horas después del cambio en la velocidad de flujo, conservándose una concentración de masa celular de 2.5 a 2.9 g/L. y de vitamina B₁₂ de 1.8 a 2.2 mg/L.

A partir de este resultado se monto otro experimento de cultivo continuo con las mismas condiciones que el anterior, variando unicamente la velocidad de flujo de entrada y de salida del reactor. Se fijo con una tasa de dilución $D=0.044 \text{ h}^{-1}$ y $F=132 \text{ mL/h}$. En la figura 23 y en la tabla XIII se muestra el comportamiento de este nuevo proceso. Se observa que comienza una estabilización del proceso aproximadamente a las 47 horas de su inicio, momento en el que solo se había dado un cambio de volumen, manteniéndose esta tendencia por 60 horas más, donde ya se había cambiado tres veces el volumen del reactor y también fue el momento en el que se corta el experimento por haberse agotado la reserva de sustrato, en este caso, el agua de cocimiento de maíz.

Bajo las condiciones de trabajo experimental, fijar el cultivo continuo con *E. shermanii* tiene que ser a velocidades bajas de crecimiento, es decir, cuando en el cultivo en lote la bacteria ya sobrepasó la máxima velocidad de crecimiento y la concentración de azúcares, que en este caso actuaron como limitantes del crecimiento, se encuentra en una concentración menor a los 10 g/L. Los resultados parecen indicar que el factor limitante de la velocidad de crecimiento del microorganismo es el sustrato pero no el escogido,

que en este caso fue la glucosa, sino algun sustrato que aporta el agua de cocimiento de maiz, que al fluir en muy bajas cantidades al reactor, se consume el posible sustrato con gran velocidad, impidiendo tener un valor constante de masa celular, por lo que es importante continuar este tipo de experimentos bajo un rango mucho mucho más amplio de velocidades de dilución y aumentar la concentración de ACM en el medio para que no actue como el sustrato limitante.

Si se compara la producción total de vitamina entre el proceso en lote que sirvió como control para esta última parte del trabajo experimental (fig. 20 y Tabla XI) y el último proceso de cultivo continuo, se observa que para el primero la concentración de vitamina obtenida al final fue un promedio de 6.4 mg/L, para 3 litros de volumen del reactor da un total de 19.2 mg de vitamina, mientras que para el cultivo continuo, donde se recolectaron 14.7 litros de medio de cultivo, la cantidad total de vitamina fue de 43.3 mg, lo que hace un promedio de 3.05 mg/L. La productividad para el lote fue de 0.053 mg/L*h y para el cultivo continuo de 0.026 mg/L*h, es decir, la productividad en lote fue mayor al cultivo continuo.

Estos resultados, no tomando en cuenta a las fermentaciones en lote, no son indicativos de la factibilidad del proceso, ya que las condiciones bajo las cuales se montó el cultivo continuo no son las más adecuadas. En primer lugar, el control de flujos se llevó a cabo con 2 bombas peristálticas, la primera para fijar el flujo de entrada y la segunda para el de salida. Estas bombas son muy sensibles a cambios de voltaje en la corriente eléctrica, por lo que se observaron variaciones de flujo durante el proceso. También, la

manguera unida al cabezal de la bomba peristáltica sufrió daños severos, como es rotura de las paredes de la manguera, con una consecuente caída de la presión y del flujo.

En el primer experimento el mayor problema fué mantener igual flujo de entrada que de salida, con las 2 bombas paristálticas. Para el segundo experimento de cultivo continuo el flujo de salida se controló unicamente por volumen del reactor, se colocó la manguera recolectora del medio de cultivo en la superficie del volumen de 3 litros y todo exceso fue arrastrado al exterior.

En este último experimento de cultivo continuo el flujo de entrada se fijó a una velocidad de 132 mL/h. y el de salida calculado por el volumen recolectado en cierto tiempo, dio un promedio de 122 mL/h. Esta diferencia señala un mayor tiempo de residencia de las células y del sustrato, lograndose en consecuencia la estabilidad del cultivo continuo. Este problema de equipo es la mayor limitación en los procesos de cultivo continuo, cuando se realiza con equipo no adecuado para este proceso específico.

Comparando los resultados obtenidos, el cultivo continuo no parece ser una técnica muy adecuada para la obtención de una mayor cantidad de vitamina. Ambos procesos tuvieron una duración de 120 a 130 horas, siendo la mayor producción final de vitamina total para el lote, y para el caso del cultivo continuo, el gasto de glucosa se duplicó en comparación con la usada en las fermentaciones en lote, obteniendose solo la mitad de vitamina en estos últimos experimentos.

Estos parametros son importantes para elaborar un estudio económico de factibilidad de producción de este metabolito bajo condiciones continuas, teniendo en cuenta la necesidad de equipo y de control del proceso. Este fué el mayor limitante para este trabajo experimental.

CAPITULO VIII

CONCLUSIONES

Bajo condiciones normales, la vitamina B₁₂ producida por fermentación de P. shermanii requiere de dos fases. La primera, anaerobia, donde se produce el nucleótido 5,6-DMB y la segunda, aerobia, necesaria para la producción del anillo corrinoide. Ahora, en esta investigación se ha demostrado la capacidad del Propionibacterium shermanii para producir vitamina bajo condiciones de aereación constante y con cambios en dichos niveles de aereación .

Bajo las condiciones de aereación probadas, desde 0.01 v v m hasta 1.0 v v m con una velocidad de agitación de 350 r p m , y de 1.0 v v m y pero a 690 rpm, se observaron comportamientos distintos, esto es, a niveles de aereación muy bajos, de 0.01 v v m y a niveles de aereación muy altos de 1.0 v v m, la producción de vitamina se detectó hasta las 49 horas de iniciada la fermentación. Bajo los niveles de aereación entre 0.10 y 0.80 v v m la producción de vitamina fue posible detectarla a partir de las 24 horas de iniciada cada fermentación.

De todas las fermentaciones con aereación constante estudiadas,

la que mejores resultados presento en lo que respecta a la produccion, productividad y rendimiento, fue la que se llevo a cabo con una aereacion constante de 0.20 v v m y 350 rpm, que corresponde a un K_{La} de 10.3 h^{-1} en agua.

Como este nivel de aereacion fue el mejor bajo las condiciones del trabajo experimental, se escogio este como control para los procesos en los que se combinaron dos niveles de aereacion, haciendo los cambios a las 24 horas para una serie de experimentos y a las 48 horas para otra serie, usando en ambos casos las mismas condiciones de aereacion.

Los resultados de estos procesos combinados muestran que en todos estos experimentos, los valores de productividad fueron mayores cuando se inicio la fermentacion con una aereacion alta y posteriormente se cambio el flujo de aire a 0.20 v.v.m.. Aunque estos resultados son los mejores para estas condiciones de trabajo, los controles que se prepararon de estos experimentos con un nivel de aereacion constante de 0.20 v v m, siempre fueron mejores que las fermentaciones combinadas.

En el caso de los experimentos de cultivo continuo, donde se siguio usando el nivel de aereacion de 0.20 v v m, la productividad fue un 50% menor con respecto a los procesos de fermentacion en lote con la misma aereacion.

Aunque solo se hicieron dos corridas de cultivo continuo, los resultados aqui presentados para estos experimentos muestran la necesidad de seguir experimentando pero con tasas de dilucion (D) menores a las probadas, para asegurar una masa celular constante durante todo el proceso.

Una gran limitante para nuestro estudio fue el no contar con un solo lote de Agua de Cocimiento de Maiz (A C M.), que aparte de aportar el nitrogeno y las vitaminas necesarias para el desarrollo de la bacteria, aporta otra serie de elementos que son importantes para la produccion de la vitamina B₁₂. Fue por esta razon que para cada serie de experimentos, se realizo siempre una fermentacion control con un flujo de aire de 0.20 v v m.

Como se puede ver en los resultados, los controles siempre presentaron diferencias en la produccion de la vitamina. Estos resultados muestran la importancia de contar con lotes grandes de este sustrato y de contar con metodos de conservacion para evitar su degradacion.

En lo que respecta al crecimiento celular, la velocidad de crecimiento aumenta conforme se incrementa el nivel de aereacion. Es por esta razon que en los procesos combinados donde se uso en una primera parte de estos estudios, un nivel alto de aereacion, se obtuvo la mayor productividad de vitamina, pero esto es debido seguramente a la mayor cantidad de celulas en el reactor. Es importante recalcar que en estos estudios los controles siempre

fueron mejores.

Tambien, cuando se comparan los procesos combinados y sus controles, con respecto al crecimiento celular, y tomando en cuenta que la variable fue el agua de cocimiento de maiz, se puede observar que el crecimiento celular siguió la tendencia que se esperaba; a mayor aereacion mayor masa celular. Pero para la produccion de vitamina, los resultados no fueron comparables. En este caso se puede concluir que para hacer mas notorio el efecto de la aereacion, se debe de tener un control muy estricto del medio de cultivo, ya que en este caso la fuente de nitrogeno es buena para el incremento de masa celular, no asi para la produccion del compuesto de interes.

En el objetivo de este trabajo no se encontraba el mejoramiento del medio de cultivo para la produccion de la vitamina, por lo que se propone para su optimizacion, estudiar bajo estas condiciones de trabajo los resultados obtenidos por otros companeros de trabajo que estudiaron compuestos y condiciones para aumentar la produccion de la vitamina B₁₂.

BIBLIOGRAFIA

- AOAC, Association of Official Analytical Chemists. Official methods of Analysis. 8th ed., Washington EUA. Method 47.021.1975.
- Aries, R. 1974. Patente Francesa 2.209.842.
- Bandyopadhyay, B. & A. E. Humfrey. (1967). *Biotechnology & Bioengineering*, 9:533-544.
- Bartholomew, W. H. (1960). *Adv. Appl. Microb.* 2:289-300
- Berry, E. C. et. al. (1969). *Applied Microbiology*, 4(3):356-360
- Bullerman, L. B. (1966) *Applied Microbiology* 4(3):353-355
- Burton, G. et. al. (1961), *Biochemical J.* 194:627-631.
- Bykhovskii, V. Y. & N. I. Zaitseva, (1976). *Mikrobiologiya* 12(3):365-370.
- Céspedes, B. A. (1986), Tesis Maestría. UNAM, Mexico.
- Cohen, G. *El Metabolismo Celular y su Regulación*. Ed. Omega, 1ra. Edición. 1979.
- De Vries, W. et. al. (1972). *J. of Gen. Microbiology*, 71:515-524.
- De Vries, W. et. al. (1973). *J. of Gen. Microbiology*, 76:31-41.
- Fischer, M. (1954), *J. Agric. Food Chemistry*, 1:951-953.
- Fencl, Z. & M. Novak, (1969). *Folia Microbiologica*, 14:314
- Florent, J. N. & L. Ninet., *Microbial Technology*, 2da. ed. Vol. 1 cap 15. Academic Press. 1979.
- Grant, D. (1960) U. S. Patent 2,956,932.
- Harder, W. et. al. (1972), *J. of Applied Bacteriology* 43:1
- Hettinga, D. H. et. al. (1972) *J. of Milk & Food Technology*, 35 (5):

- Horig, J. A. & P. Renz. (1978), *J. of Biological Chem.* 253(20): 7410-7414.
- Horig, J. A. & P. Renz, (1980), *European J. Biochemistry*, 105: 587-599.
- Hollriegel, V. et. al. (1982), *Arch. Microbiol.* 132: 155-158.
- Huber, J., W. Schacknies & I. Rueckbeil. (1963), *Pharmazie* 18: 37-47.
- I'bragimova, S. I. et. al. (1980a), *Mikrobiologiya* 48(4): 668-671.
- I'bragimova, S. I. et. al. (1980b), *Mikrobiologiya* 48(5): 845-848.
- Kasiro, Y. & S. Ochoa. (1964), *The Metabolism of Propionic Acid.* en *Advances in Enzimology*, 23: 283-374.
- Kamikubo, T. et. al. (1978). *Appl. & Envir. Microbiol.* 35(5): 971-973.
- Kralova, B. & P. Rauch. (1985). *Applied Microbiology & Biotechnology* 21:331-335
- Lago, B. D. (1969). *J. of Bacteriology*, 99(1): 347-349.
- Lapage, S. P., J. P. Shelton & T. G. Mitchell. *Media for the Maintenance and Preservation of Bacteria.* en *Methods in Microbiology.* Ed. por J. R. Norris & D. W. Ribbons. Academic Press Inc. Londres. 1970.
- Lascelles, J. (1960), *J. General Microbiology*, 23: 487-498.
- Lascelles, J. (1966), *Biochem. J.* 100: 184-189.
- Lee, H. I. (1974), *Applied Microbiology* 28(5): 831-835.
- Lehninger, A. *Biochemistry.* 2da. Ed. Worth Pub. Inc. 1975.
- Lim, R. (1968), U.S. Patent 3,411,991.
- Lowe, D. A. & J. M. Turner, (1970), *J. of General Microbiology* 64: 119-122.
- Menon, A. I. & D. Shemin, (1967), *Arch. of Biochem. & Biophys*, 121:

- Merck & Co. Inc. (1971) Patente Francesa 2,038,828.
- Namba, A. et. al. (1983), J. Ferment. Technology. 61(6): 551-556.
- Osman, R. et. al. (1966), J. Chem. U.A.R., 11(3): 353-361.
- Perez, M. J. & F. Garcia Hernandez. (1983), Biotechnology Letters, 5(4): 259-264.
- Pritchard, G. G. et. al. (1977), J. of General Microbiology, 102:223-233.
- Riley, P. B. et. al. (1961), Monographs: Society of Chemical Industry, 12: 127.
- Rose, A. H.. Economic Microbiology. vol 2, cap. 8. Academic Press, 1978.
- Santana, C. L. (1983), Tesis Profesional. UNAM.
- Schultz, J. Z. & E. L. Gaden. (1956). Industrial & Engineering Chemistry. 48(12): 2209-2212.
- Schwartz, B. A., K. Ikeda, J. M. Miller & J. S. Watson. (1959), Science 129: 40.
- Scott, A. I. et. al. (1975), J. Am. Chem. Society, 97(9): 2548.
- Skot, G. (1977), Dechema 25(3): 34.
- Speedie, J. & G. Hull (1960), U.S. Patent 2,951,017.
- Spriet, J. A. & J. H. Botterman, (1984), Chem. Tech. Biotechnol 34(A): 137-153.
- Ting, S. V. (1956), Agricultural & Food Chemistry 6(3): 63-66.
- Tuschya, Y., et. al. (1980), J. Ferment. Technol. 58(5): 485-487.
- Vorob'eva, L. I., (1964). Mikrobiologiya 33(1): 21-24.
- Wang, D. I. C. et. al., Fermentation & Enzyme Technology. Ed John Wiley & Sons. N.Y., 1979.
- Yeliseev, A. A. et. al. (1986). Biochem & Biophys. Acta. 880:131-138.

Yongsmith, B. et. al. (1982). European J. Applied Biotechnol. 16:
70-74

Yongsmith, B. & P. Apiraktivongse, (1983a), J. Ferment. Technol.
61(1): 105-107.

Yongsmith, B. & K. Chutina. (1983). J. Ferment. Technol. 61(6):
593-598.

Yoshinobo, T. (1972). J. Ferment. Technol. 58(5): 485.

Zodrow, K. & O. Stefaniac., (1963a). Acta Polonica Microbiologica 12:
263-266.

Zodrow, K. & O. Stefaniac., (1963b). Acta Polonica Microbiologica 12:
271.