

Universidad Nacional Autónoma de México.

Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado  
del Colegio de Ciencias y Humanidades.

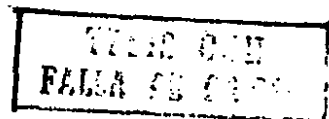
Estudio de la Producción de Vitamina B<sub>12</sub> por Fermentación  
de Desechos de la Industrialización de la Piña (Ananas  
comosus)

T E S I S

que para optar por el Grado de Maestría en Biotecnología  
presenta:

Asunción María Céspedes Brito

1 9 8 6





Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

Todo el material contenido en esta tesis 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.

# I N D I C E

	Página
RESUMEN	
INTRODUCCION	1
1.1 CARACTERISTICAS DE LA PLANTA DE PIÑA	6
1.1.1 Generalidades	6
1.1.2 Variedades	7
1.1.3 Madurez fisiológica	7
1.1.4 Cambios composicionales durante el desarrollo	8
1.1.5 Acidos	10
1.1.6 Pigmentos	10
1.1.7 Otros componentes	10
1.1.8 Localización e industrialización de la piña	11
1.1.9 Proceso de industrialización	12
1.1.10 Desperdicios	16
1.2 VITAMINA B <sub>12</sub>	17
1.2.1 Importancia de la vitamina B <sub>12</sub> : funciones bioquímicas	20
1.2.2 Estructura de la vitamina B <sub>12</sub>	22
1.2.3 Biosíntesis de la vitamina B <sub>12</sub>	24
1.2.4 Características: propiedades físicas y químicas	26
1.2.5 Producción de vitamina B <sub>12</sub>	28

1.2.6	Extracción y purificación de la vitamina B <sub>12</sub>	35
1.3	PRECURSORES Y/O FACTORES DE CRECIMIENTO QUE PUDIERAN AFECTAR A LAS PROPIONIBAC- TERIAS	36
1.3.1	Pantotenato de calcio	37
1.3.2	Biotina	37
1.3.3	Fosfato de piridoxal	37
1.3.4	Betaína	38
1.3.5	Metionina	39
1.3.6	Treonina	39
1.3.7	Histidina	40
1.3.8	Acido glutámico, alanina, valina y arginina	40
2	ANTECEDENTES	42
3	OBJETIVO	48
4	JUSTIFICACION DE LA INVESTIGACION	50
5	MATERIALES Y METODOS	55
5.1	MICROORGANISMO	56
5.2	OBTENCION DEL JUGO DE PIÑA	57
5.3	TRATAMIENTO DE LOS JUGOS DE PIÑA	58
5.4	ORIGEN Y TRATAMIENTO DEL AGUA DE COCI- MIENTO DE MAIZ (FUENTE DE NITROGENO)	58
5.5	COMPOSICION DE LOS MEDIOS DE FERMENTA- CION USADOS	60
5.6	PREPARACION DEL MEDIO DE FERMENTACION	61
5.7	REACTIVACION DEL MICROORGANISMO	62

5.8	PREPARACION DEL INOCULO	62
5.9	CONDICIONES DE FERMENTACION	65
5.10	DETERMINACIONES ANALITICAS	65
	Crecimiento celular	65
	Acido láctico	66
	Vitamina B <sub>12</sub> en el paquete celular	66
	Azúcares reductores	67
	Nitrógeno	68
6	RESULTADOS Y DISCUSION	69
6.1	HIDROLISIS DE UNA SOLUCION DE SACAROSA EN CONDICIONES DE ESTERILIZACION	70
6.2	ANALISIS Y ACONDICIONAMIENTO DEL JUGO DE PIÑA	71
6.3	PRUEBA DE CRECIMIENTO DE <u>P. shermanii</u> CON EL EMPLEO DE MEDIO CON JUGO DE PIÑA	73
6.4	EDAD DE CRECIMIENTO DE LAS CELULAS DEL INOCULO	78
6.5	FERMENTACIONES A VARIOS NIVELES DE AERACION	79
6.6	CINETICA DE LA FERMENTACION CON JUGO DE PIÑA USANDO 100 ml DE MEDIO/MATRAZ DE 250 ml.	87
6.7	FERMENTACIONES DE SIETE DIAS DE DURACION:	93
	6.7.1 En medio con jugo de piña	93
	6.7.2 En medio con sacarosa	93

6.8	FERMENTACION EN LA QUE SE EMPLEA GLUCOSA COMO FUENTE DE CARBONO	104
6.9	EFFECTO DE CONTROL DEL pH	114
6.9.1	Fermentación en la que se empleó un amortiguador	116
6.9.2	Ajuste de pH cada 12 horas	118
6.10	PRUEBA DE PRECURSORES Y/O FACTORES DE CRECIMIENTO	124
6.10.1	Pantotenato de calcio	125
6.10.2	Biotina	128
6.10.3	Empleo de fosfato de piridoxal	130
6.10.4	Fermentación en la que se adicionó betaína	134
6.10.5	Efecto de aminoácidos adicionados al tiempo cero: Acido glutámico, metionina y treonina	140
6.10.6	Adición de aminoácidos (0.5 g/l) a las 36 horas de fermentación	146
6.11	PRUEBA INTEGRAL DE PRECURSORES Y/O FACTORES DE CRECIMIENTO	151
6.11.1	Empleo de glucosa como fuente de carbono	152
6.11.2	Empleo de jugo de piña como fuente de carbono	159
7	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	166
8	BIBLIOGRAFIA	173

## LISTA DE FIGURAS

		Página
I	Pulpa aprovechable y residuos de la industrialización de la piña.	3
II	Fermentación propiónica.	23
III	Estructura de la vitamina B <sub>12</sub> .	25
IV	Ruta general para la biosíntesis de cobalaminas.	27
V	Obtención de jugo de piña.	59
VI	Reactivación, adaptación e inóculo para <u>P. shermanii</u> ATCC 13673, en medios con glucosa, sacarosa y jugo de piña, respectivamente.	64
VII	Hidrólisis de una solución de sacarosa a varios valores de pH, en condiciones de esterilización.	72
VIII	Proceso de acondicionamiento del jugo de piña.	75
IX	Curva de crecimiento celular en función de tiempo para <u>P. shermanii</u> crecido en jugo de piña, sin fuente de nitrógeno y sin cloruro de cobalto.	77
X	Curva de crecimiento celular y producción de vitamina B <sub>12</sub> en función de tiempo para <u>P. shermanii</u> , en un medio a base de jugo de piña, agua de cocimiento de maíz y cloruro de cobalto.	77
XI	Crecimiento celular en función de tiempo, para inóculo crecido en un medio con jugo de piña.	80

XII	Crecimiento celular en función de tiempo en un medio con jugo de piña, empleando diferentes volúmenes de medio.	83
XIII	Efecto de la oxigenación sobre la $\delta$ -ALA sintetasa.	85
XIV	Crecimiento celular, producción, productividad y producción específica de vitamina B <sub>12</sub> Vs volumen de medio.	86
XV	Crecimiento celular, producción de vitamina B <sub>12</sub> y evolución de los diferentes sustratos y del pH, para la fermentación en un medio con jugo de piña.	89
XVI	Velocidades específicas de crecimiento ( $\mu$ ) de <i>P. shermanii</i> y de producción de vitamina B <sub>12</sub> ( $q_p$ ), para la cinética de una fermentación en medio con jugo de piña.	90
XVII	Cromatograma del caldo de fermentación a las 24 y a las 48 horas en medio con jugo de piña.	95
XVIII	Crecimiento celular, producción de vitamina B <sub>12</sub> y evolución de sustratos para una fermentación de siete días en medio con jugo de piña.	99
XIX	Crecimiento celular, producción de vitamina B <sub>12</sub> y evolución de sustratos para una fermentación de siete días en medio con sacarosa.	99
XX	Producción de vitamina B <sub>12</sub> en función de tiempo en medio con jugo de piña, y en medio con sacarosa, respectivamente.	102
XXI	Productividad de vitamina B <sub>12</sub> en medio con jugo de piña y en medio con sacarosa, respectivamente.	102



XXII	Producción específica de vitamina - B <sub>12</sub> en medio con jugo de piña y en medio con sacarosa, respectivamente.	102
XXIII	Crecimiento celular, producción de vitamina B <sub>12</sub> , y evolución de sustra- tos y del pH para una fermentación en un medio con glucosa.	106
XXIV	Velocidades específicas de crecimien- to de <u>P. shermanii</u> en medio con jugo de piña y en medio con glucosa.	107
XXV	Producción de vitamina B <sub>12</sub> en fun- ción de tiempo para fermentación en medio con jugo de piña y en medio con glucosa, respectivamente.	109
XXVI	Productividad de vitamina B <sub>12</sub> para - fermentación en medio con jugo de pi- ña y en medio con glucosa, respecti- vamente. -	109
XXVII	Producción específica de vitamina B <sub>12</sub> para fermentación en medio con jugo de piña y en medio con glucosa, res- pectivamente.	109
XXVIII	Curva concentración Vs tiempo para <u>P. shermanii</u> en un medio con glucosa, empleando un amortiguador de carbona- to-bicarbonato de sodio 0.1 M.	119
XXIX	Curva concentración Vs tiempo para <u>P. shermanii</u> en fermentación con glu- cosa en la que se ajusta el pH cada 12 horas.	119
XXX	Velocidades específicas de crecimien- to de <u>P. shermanii</u> a varias condicio- nes de pH.	121
XXXI	Productividad de vitamina B <sub>12</sub> para <u>P. shermanii</u> a varias condiciones de pH.	122

XXXII	Efecto del pantotenato de calcio sobre el crecimiento celular y sobre la producción de vitamina B <sub>12</sub> , en un medio con glucosa.	127
XXXIII	Efecto de la adición de diferentes concentraciones de biotina, sobre el crecimiento celular y sobre la producción de vitamina B <sub>12</sub> .	129
XXXIV	Crecimiento celular y producción de vitamina B <sub>12</sub> Vs concentración de fosfato de piridoxal adicionado a las 24 horas de fermentación.	132
XXXV	Crecimiento celular y producción de vitamina B <sub>12</sub> Vs concentración de fosfato de piridoxal adicionado a las 48 horas de fermentación.	132
XXXVI	Crecimiento bacteriano y producción de vitamina B <sub>12</sub> al quinto día de fermentación para experimentos en los que se adicionan 10 y 20 g/l de betaína, respectivamente, a la cero hora de fermentación.	136
XXXVII	Efecto de la adición de dos concentraciones de betaína, 5 g/l y 10 g/l, cuando se añade el compuesto a las 48 horas de fermentación.	138
XXXVIII	Determinaciones de crecimiento bacteriano y de vitamina B <sub>12</sub> al quinto día de fermentación. En los experimentos se adicionan 5 y 10 g/l de betaína, respectivamente, a las 72 horas.	138
XXXIX	Crecimiento celular en función de tiempo, para experimentos con adición de 0.5 g/l de ácido glutámico, metionina e histidina, respectivamente, adicionados a la cero hora de fermentación.	145

- XL Crecimiento celular en función de tiempo para experimentos con adición de 0.5 g/l de aminoácidos a las 36 horas de fermentación. 149
- XLI Crecimiento celular, producción, productividad y producción específica de vitamina B<sub>12</sub> para fermentación en la que se adicionan todos los compuestos reportados en la Tabla XIX. Se emplea glucosa como fuente de carbono. 155
- XLII Velocidades específicas de crecimiento de una fermentación con adición de todos los agentes reportados en la Tabla XIX, con el empleo de glucosa como fuente de carbono. 157
- XLIII Crecimiento celular, producción, productividad y producción específica de vitamina B<sub>12</sub> para fermentación en la que se adicionan todos los agentes reportados en la Tabla XIX. Se emplea jugo de piña como fuente de carbono. 161
- XLIV Velocidad específica de crecimiento de una fermentación en la que se adicionan todos los agentes reportados en la Tabla XIX, con el uso de jugo de piña como fuente de carbono. 164

## LISTA DE TABLAS

		Página
I	Rendimiento de la industrialización de la piña.	4
II	Composición del jugo de piña.	9
III	Destino de la producción de piña fresca.	13
IV	Capacidad anual instalada de las empresas industrializadoras de piña, localizadas en la cuenca del Papaloapan.	14
V	Componentes del complejo B.	19
VI	Estabilidad de la Cianocobalamina.	29
VII	Formas de la vitamina B <sub>12</sub> .	30
VIII	Procesos para la producción microbiana de vitamina B <sub>12</sub> .	32
IX	Importaciones de polvo desecado con actividad de vitamina B <sub>12</sub> .	52
X	Análisis de la materia prima (jugo de piña).	74
XI	Velocidades volumétricas y específicas de consumo de la fuente de carbono para <u>P. shermanii</u> en un medio con jugo de piña.	92
XII	Velocidades volumétricas y específicas de consumo de la fuente de nitrógeno para <u>P. shermanii</u> en un medio con jugo de piña.	94

XIII	Velocidades volumétricas y específicas de consumo de la fuente de carbono de una fermentación en la que se usa jugo de piña, y de otra en la que se emplea sacarosa como fuente de carbono.	100
XIV	Velocidades volumétricas y específicas de consumo de la fuente de carbono para <u>P. shermanii</u> (ATCC 13673) en medio con glucosa, y en medio con jugo de piña, respectivamente.	110
XV	Velocidades volumétricas y específicas de consumo de nitrógeno para <u>P. shermanii</u> en medio con glucosa y en medio con jugo de piña, respectivamente.	111
XVI	Rendimientos celulares y de producción de vitamina B <sub>12</sub> en relación a la fuente de carbono, para una fermentación en medio con glucosa y para otra en medio con jugo de piña.	113
XVII	Efectos de la concentración de ácido propiónico y del pH sobre la velocidad de crecimiento de <u>P. shermanii</u> a 30°C.	115
XVIII	Composición en aminoácidos del agua de cocimiento de maíz.	142
XIX	Precusores y/o factores de crecimiento que afectan positivamente el crecimiento de <u>P. shermanii</u> y/o la producción de cianocobalamina.	153
XX	Incrementos en el crecimiento celular y en la producción de cianocobalamina, con la adición de precursoros y/o factores de crecimiento en un medio con glucosa.	156

XXI Incrementos en el crecimiento bacteriano y en la producción de cianocobalamina, con la adición de precursores y/o factores de crecimiento en un medio con jugo de piña.

162

## R E S U M E N

En el proceso de industrialización de recursos vegetales y animales, se generan grandes volúmenes de diversos residuos. La mayoría de éstos presentan características importantes que los hacen apropiados para ser aprovechados mediante transformación biotecnológica. Sin embargo, en la actualidad todavía se desconocen las propiedades de muchos de ellos, por lo cual es muy limitado su uso en procesos industriales.

Esta investigación está enfocada a estudiar la producción de vitamina B<sub>12</sub>, mediante el uso de los jugos residuales de la industrialización de la piña, empleando Propionibacterium shermanii ATCC 13673 como microorganismo de prueba. Se usaron jugos extraídos directamente de la piña, porque a la fecha de iniciado el trabajo no era época de procesamiento de la fruta, y por tanto no había disponibilidad de desechos de la misma. Se realiza la investigación a escala laboratorio, ya que en la actualidad no se conoce ninguna en la que se haya intentado estudiar la producción de cianocobalamina, con el uso de la mencionada materia prima como sustrato.

En este trabajo se incluyen varios aspectos entre los que destacan la caracterización y acondicionamiento de los jugos de piña, para la formulación de un medio de



fermentación, y para investigar el aprovechamiento de sus componentes por Propionibacterium shermanii. En principio se emplearon diferentes volúmenes de medio en matrazes de 250 ml. Posteriormente, y en base a los resultados obtenidos, se usaron 100 ml de medio para todas las demás fermentaciones. Los valores de crecimiento bacteriano (máximo de 11.60 g/l) y de producción de vitamina B<sub>12</sub> (máximo de 5,033 µg/l) compitieron favorablemente con los de otras fermentaciones en las que se usó glucosa y sacarosa, respectivamente.

Otro aspecto de interés fue probar el efecto de ciertos agentes precursores y/o factores de crecimiento, que pudieran tener repercusión positiva en el crecimiento del microorganismo y/o en la producción de cianocobalamina, pudiendo contribuir a mejorar la productividad del proceso. Estos experimentos se realizaron en medio con glucosa y posteriormente se probaron todos los efectos positivos en medio formulado con jugo de piña. Por su efecto en el proceso fermentativo destacan el pantotemato de calcio y el fosfato de piridoxal. El crecimiento se vió incrementado en 17% con el primero, y no hubo ningún efecto por el segundo, mientras que la producción de cianocobalamina se aumentó en 22.5% con la adición de

pantotenado de calcio y en 32.78% con fosfato de piridoxal.

Se concluyó que los jugos de piña resultan atractivos para su uso como fuente de carbono en proceso fermentativo para producción de vitamina B<sub>12</sub>. En vista de los resultados obtenidos con este sustrato y en razón de que los desechos de la industrialización de la piña tienen la misma composición que los jugos extraídos de piña, se deja abierta la posibilidad de usar los desechos de la industrialización de esa fruta, en la producción de un metabolito de alto valor agregado como es el caso de la vitamina B<sub>12</sub>.

CAPITULO 1

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

En el proceso de industrialización de los desperdicios agrícolas se genera una alta cantidad de residuos, entre los que se encuentran las melazas de caña de azúcar, pulpa de henequén, subproductos de papa, agua de cocimiento de maíz, semillas de algodón, etc. Al provenir de fuentes renovables, se facilita su utilización para la obtención de materia prima que puede ser usada en la industria química, farmacéutica, alimentaria u otra, o bien como productos terminados. A nivel internacional mucho de esos residuos tienen utilidad práctica ya sea como fuente de nitrógeno, de carbono y/o de factores de crecimiento, en procesos de producción de muchas sustancias. Cabe mencionar la producción de proteasas, glucosa isomerasa, vitamina B<sub>12</sub>, lisina, penicilina, gentamicina, etc. (13).

Entre los desechos agroindustriales existentes en México y que presentan perspectivas interesantes, se encuentran los jugos de desperdicios de la industrialización de la piña. Estos podrían ser usados como fuente de carbono para obtener cualquier metabolito de importancia industrial, en función de su composición y de sus volúmenes de producción.

En el proceso de industrialización de la piña (enla

tado, producción de mermelada, otros) se utiliza solo el cilindro quedando como residuo las cáscaras, los corazones fibrosos, las coronas, los ojos, y los jugos escurridos (Fig. 1, Tabla 1). La cantidad de los desperdicios se estima en un 60% en peso del total de fruta procesada. El jugo extraído de los residuos constituye el 60%, (p/v), y su composición es interesante para su uso como fuente de carbono de azúcares fácilmente metabolizables (13).

En 1983 la producción de piña a nivel nacional alcanzó un total de 477,750 toneladas, de las cuales se procesó aproximadamente el 44% (210,210 toneladas), y de esta cantidad, 75,676 toneladas correspondieron a jugos residuales (B.V. Téllez, Comunicación Personal).

Actualmente las cáscaras de piña, corazones fibrosos y otros desperdicios son utilizados para la obtención de salvado que se destina a la alimentación de ganado (13). También se ha intentado utilizar los jugos escurridos y los extraídos de la cáscara y otros residuos, en la producción de vinagre por métodos fermentativos, pero lo inadecuado de las instalaciones destinadas a tal proceso han hecho imposible esos intentos.

En este trabajo se plantea estudiar la posibilidad

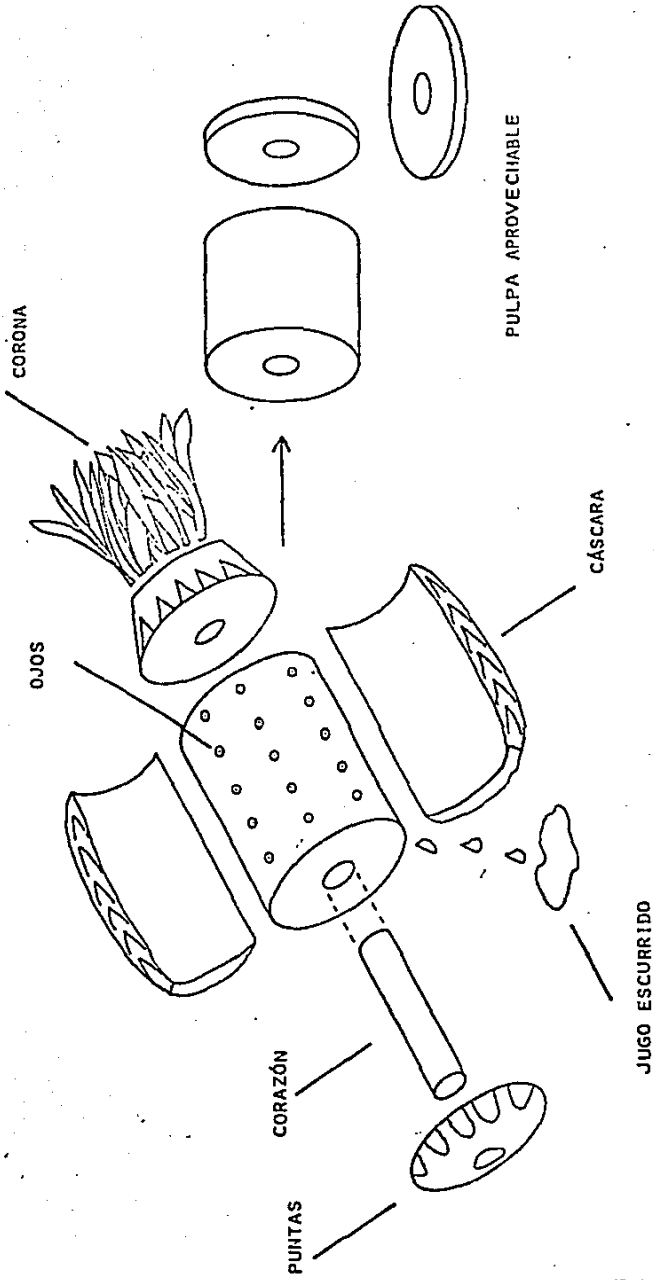


FIG. 1. PULPA APROVECHABLE Y RESIDUOS EN LA INDUSTRIALIZACION DE LA PIÑA.

TABLA 1: RENDIMIENTO DE LA INDUSTRIALIZACION DE LA PIÑA

TAMAÑO PROMEDIO	CHICA	MEDIANA	GRANDE
Peso medio (Kg)	1.585	2.205	3.230
Corona (%)*	16.970	12.970	9.121
Puntas (%)	6.255	6.325	8.195
Cáscaras (%)	17.765	18.920	16.665
Ojos (%)	8.250	8.345	9.325
Corazones (%)	9.270	7.960	8.730
Jugo Escurrido (%)	5.055	3.990	5.985
Pulpa Aprovechable (%)	36.435	41.490	41.975

Fuente: García, H.F. y Pérez M., J.L. ( 13 )

\*Todos los porcentajes son con relación al peso de la piña.

de utilizar esos jugos residuales, como sustrato para la producción de vitamina B<sub>12</sub> por fermentación, en función de su aportación de carbohidratos y de otros nutrientes, previa aplicación del tratamiento adecuado (sacarificación y estandarización).



## 1.1 CARACTERIZACION DE LA PLANTA DE PIÑA.

1.1.1 Generalidades. La piña se conoce científicamente con los nombres de Ananas sativa, Ananas comosa y Bromelia ananas. Es una planta herbácea, vivaz hasta los cuatro años. Su tallo central y único alcanza hasta 1.20 m de altura, según la variedad y el terreno donde se coseche ( 1 ).

Se cultiva con verdadero provecho en las zonas tropicales y subtropicales, en terrenos arcillosos y limosos y con buen desague ( 30 ). Necesita una altura sobre el nivel del mar no superior a los 800 metros, con temperatura media entre 25 y 26°C y mínima de 13°C, y precipitación pluvial anual de alrededor de 1,000 mm, sin largos períodos de sequía ( 49 ). La siembra se efectúa entre Agosto y Diciembre, y tarda en fructificar de 18 a 20 meses, según las condiciones ecológicas y el método de cultivo.

La piña es una fruta compuesta, ésto es, está constituida por una colección de pequeñas frutas llamadas frutillas. Cada una de esas frutillas nace separadamente sobre el pedúnculo, y a consecuencia de un proceso evolutivo se fusionan y forman así la fruta compuesta ( 27 ).

1.1.2 Variedades. Se consideran más de 100 variedades de piña, entre las que se encuentran cuatro grupos principales: tipo Reyna, Puerto Rico, Española y Cayena lisa. La que se cultiva en México corresponde principalmente a la variedad Cayena lisa, cuyo fruto es grande, de color amarillo anaranjado y más jugosa que las otras variedades. Además los ojos en la Cayena lisa son poco profundos, y el corazón es pequeño en relación al tamaño de la fruta. Su sabor y aroma agradables, junto a las características mencionadas la hacen apropiada para la industrialización (12). Fue introducida al Estado de Oaxaca en el año de 1906, y en la actualidad se cultiva con gran éxito en esa región (49).

1.1.3 Madurez Fisiológica. Las diferentes etapas de desarrollo de un fruto son: -sazonamiento, -maduración y -senescencia. Estos nombres fueron asignados en base a una serie de cambios físicos y bioquímicos ocurridos en tiempos específicos durante el desarrollo de la fruta. El conocimiento de los cambios que normalmente ocurren en la piña es de gran importancia, ya que nos permite saber el estado de madurez adecuado en que debe ser cosechada (27).

En la práctica, determinar el estado de madurez en

base a los cambios bioquímicos sucedidos en el fruto resulta laborioso e impráctico. Para esta finalidad se han establecido escalas comerciales que facilitan la identificación del estado de madurez basados simplemente en la coloración de la cáscara. Se considera que una piña está madura cuando el 100% de la cáscara es amarilla (27).

1.1.4 Cambios composicionales durante el desarrollo. La mayor parte de los carbohidratos solubles de la piña son, en orden de importancia: disacáridos (sacarosa) y monosacáridos (glucosa y fructosa) (Tabla II). De la presencia de éstos depende parte del sabor del fruto, que es un factor importante para su aceptación o rechazo. Durante el período de maduración de la fruta la cantidad de sacarosa presenta un máximo de concentración y posteriormente declina. Lo contrario ocurre con los azúcares reductores directos y totales, los cuales continúan su incremento durante todas las etapas de desarrollo de la fruta. El mayor incremento se observa cuando la concentración de sacarosa disminuye, lo cual indica que el aumento en la cantidad de azúcares reductores viene en parte de la hidrólisis de la sacarosa, y por otro lado, debido a los que se generan durante el proceso de fotosín-

TABLA II: COMPOSICION DEL JUGO DE PIÑA (Por 100 g)

Calorías	49.0 cal/g	Manganeso	0.6 mg
Agua	86.2 %	Fierro	0.6 mg
Carbohidratos	14.0 %	Sodio	0.5 mg
Azúcares Totales		Cobre	0.04 mg
invertidos	13.9 %	Vitamina A	80.0 IU
Acidez		Vitamina C	9.0 mg
(Acido Cítrico)	0.6 %	Vitamina B <sub>6</sub>	0.76 mg
Cenizas	0.4 %	Vitamina B <sub>1</sub>	0.05 mg
Proteínas	0.3 %	Vitamina B <sub>2</sub>	0.02 mg
Grasas	0.1 %	Ac. nicotínico	0.2 mg
Fibra	0.1 %	Ac. pantoténico	0.1 mg
pH	3.7	Ac. fólico	0.001 mg
Potasio	140.0 mg	Bromelina	41.1 mg
Calcio	15.0 mg	Oxalatos	6.3 mg
Magnesio	12.0 mg	Azúcares:	
Fósforo	8.0 mg	Sacarosa	66 %
		Glucosa	17 %
		Fructosa	17 %

INCAP. Food Composition Table.

tesis. Cabe mencionar que no existe acumulación de almidón en la fruta, por lo cual no hay reservas una vez cosechada.

1.1.5 Acidos. Los ácidos de mayor importancia en la piña, basado en su concentración son el cítrico y el málico. De éstos, el primero aporta alrededor del 80% de la acidez total. También existe en la fruta pequeña cantidad de ácido ascórbico, pero éste contribuye en muy baja proporción a su acidez. Durante la postcosecha la acidez titulable exhibe un leve aumento, pero posteriormente tiende a bajar hasta llegar ligeramente arriba de su punto inicial.

1.1.6 Pigmentos. El proceso de maduración de la piña está asociado con una disminución en la concentración de clorofila en la cáscara. En la pulpa, los carotenoides pasan de una concentración mínima a los 40 días antes de la etapa conocida como maduración, a una concentración máxima en el punto en que la fruta está completamente madura. Posteriormente el proceso continúa, pero más lentamente.

1.1.7 Otros Componentes. En la última etapa de maduración del fruto se producen ésteres y compuestos volátiles.

tilés como acetaldehído, acetato de etilo, acetona, etanol, propionato de etilo, etc. Los compuestos nitrogenados varían con el estado de desarrollo de la fruta; los principales constituyentes son complejos enzimáticos tales como bromelina. Sin embargo, no se considera que las sustancias peptídicas contribuyan considerablemente con la calidad de la fruta (27).

#### 1.1.8 Localización e Industrialización de la Piña.

De acuerdo a las estimaciones, existe en México una superficie apropiada para cultivo de piña de 50,000 hectáreas, de las cuales se aprovechan poco más del 25%. Los estados productores son: Tabasco, Nayarit, Veracruz, Oaxaca, Chiapas y Yucatán. Desde hace algunos años la producción se ha concentrado en la cuenca del Papaloapan, que comprende parte de los estados de Veracruz y Oaxaca, y en la actualidad representa alrededor del 90% de la producción del país.

En la cuenca del Papaloapan la cosecha de piña se realiza desde noviembre hasta julio. En los primeros meses de este período los productores satisfacen las necesidades de las plantas procesadoras; en los meses finales la abundancia del fruto así como su maduración acelerada por las altas temperaturas, los obligan a canalizar

gran parte de la producción de piña al mercado de frutas frescas. Otra parte se destina a la exportación (Tabla III).

En la región existen seis plantas procesadoras cuya capacidad es de 256,000 toneladas por año. En éstas se procesa alrededor del 95% de la cantidad total de piña industrializada (Tabla IV).

1.1.9 Proceso de Industrialización. La piña que se usa para industrializar es la que se encuentra en el período de maduración denominada "pintona" y madura. En la "pintona" algunas de las partes de la cáscara empiezan a tomar un color amarillo, y predomina éste en la base del fruto. En la madura la cáscara está completamente amarilla, así como la totalidad de la pulpa que es más jugosa y suave.

El proceso de enlatado de piña comprende principalmente tres líneas de operación:

- Piña rebanada a la que se agrega jarabe para aumentar su concentración en azúcares de 13° a 18°, 24° ó 32° Brix, de acuerdo a las normas del mercado.
- Enlatado de pulpa de piña molida.

TABLA III: DESTINO DE LA PRODUCCION DE PIÑA FRESCA (Toneladas)

AÑOS	PRODUCCION TOTAL	Demanda Aparente		
		INDUSTRIALIZACION	EXPORTACION	MERCADO INTERNO
Total	2'281,606	912,642	114,475	1'254,489
1974	397,781	159,112	12,145	225,524
1975	371,258	148,503	17,153	205,602
1976	441,564	176,626	18,736	246,202
1977	510,003	204,001	27,822	278,180
1978	561,000	224,400	37,619	298,981
1983*	477,750	210,210	N.D.	N.D.

Fuente: García H., F. y Pérez M., J.L. (13)

\*(B.V. Téllez, Comunicación Personal)

N.D.: Información no disponible.



TABLA IV: CAPACIDAD ANUAL INSTALADA DE LAS EMPRESAS INDUSTRIALIZADORAS DE PIÑA, LOCALIZADAS EN LA CUENCA DEL PAPALOAPAN.

LOCALIZACION Y NOMBRE DE LA EMPRESA	CAPACIDAD (ton/año)
Loma Bonita, Oaxaca Complejo Agrícola Industrial de la cuenca del Papaloapan, S. A. (Cofrinsa) <sup>1</sup>	62,500
Productos de Loma Bonita, S.A.	60,000
Empacadora Azteca, S.A. <sup>2</sup>	6,000
Villa Isla, Veracruz Cofrinsa	62,500
Procesadora, S.A. <sup>3</sup>	N.D.
Herdez, S.A. <sup>4</sup>	35,000
Rodríguez Clara, Veracruz Empacadora Clara, S.A.	30,000

<sup>1</sup>Originalmente esta empresa operó bajo el nombre de Empacadora Ejidal, S.A. de C.V., creada en 1951. A partir de 1974 trabaja con la razón social reportada en esta tabla.

<sup>2</sup>Elabora piña verde en salmuera.

<sup>3</sup>Produce piña glaceada.

<sup>4</sup>Capacidad estimada.

Fuente: García H., F. y Pérez M., J.L. (13).

-Enlatado de jugo de piña al natural.

La fruta cosechada se transporta y almacena en bodega, aquí se le quita el penacho de hojas por torsión a mano. Los frutos se colocan en bandas transportadoras por donde entran a la planta para el proceso general (30).

En primer término la piña pasa a la máquina mondadora (ginaca) en la cual, por mecanismos completamente automáticos se le quita la cáscara, los extremos y el eje de la infrutescencia (corazón), así como la pulpa adherida a la cáscara. Donde no existe este tipo de maquinaria el mondado se efectúa a mano por trabajadoras, y el corazón se le quita en la máquina conformadora. Por ambos métodos se llega a obtener cilindro de pulpa más o menos limpio. Estos pasan por una banda en donde las trabajadoras les quitan los trozos de cáscara y la pulpa en malas condiciones. Los cilindros limpios pasan a la máquina rebanadora, en donde son cortadas en rebanadas de media pulgada de espesor, se seleccionan y se envasan en latas. Posteriormente pasan a los dispensadores de jarabe los cuales vierten un volumen precalculado y a determinada concentración de azúcar. De ahí pasan a una cámara de vapor y después a una máquina en donde se les

extrae completamente el aire, luego a la máquina engargoladora en donde son cerradas. Pasan a la cocedora-enfriadora y se someten a un baño a 90°C durante 10 minutos, y enseguida se enfrían a unos 40°C y se etiquetan.

-Las rebanadas rotas, los trozos de cilindros y las raspaduras de las cáscaras, pasan a un molino de pulpa. Se transporta esta última a una criba vibratoria, para que la relación de pulpa a jugo se ajuste a las normas del mercado. La pulpa aprovechable pasa a las pailas de cocimiento en donde se calienta a 95°C y se procede a llenar las latas, se cierran en la engargoladora sin esterilización posterior.

-El jugo obtenido en la criba vibratoria se clarifica por calentamiento, y es bombeado a un esterilizador (cambiador de calor). Allí se somete el jugo a 90°C por un minuto. Pasan a la llenadora de latas y estas se cierran en la engargoladora sin esterilización posterior.

1.1.10 Desperdicios. En cada operación en el proceso de enlatado se desechan grandes cantidades de desperdicios. Estos están integrados por las cáscaras, corazones fibrosos, las partes obtenidas de la limpieza de los cilindros, los residuos de los extractores de jugo y

las coronas. Se estiman en un 60% de la fruta procesada. De esta cantidad el 60% está constituida por jugos residuales, los que contienen alrededor del 13% de  $\text{Brix}$  (30).

## 1.2. VITAMINA B<sub>12</sub>.

A principios de este siglo se encontraron algunos factores químicos entre los que cuentan las vitaminas, que son indispensables para el buen funcionamiento del cuerpo humano. En la actualidad se ha demostrado que la carencia de ellas produce cuadros clínicos aparatosos que no pasan desapercibidos, aunque se consuma una dieta rica en los demás nutrientes. Se les considera indispensables porque la mayoría de ellas no son sintetizadas por el organismo (excepto la vitamina D, el ácido fólico, la biotina y la vitamina K), por lo que es necesario ingerirlas en la dieta diaria (3).

La vitamina B<sub>12</sub> forma parte del llamado complejo B (Tabla V), el cual es una mezcla de varias sustancias cuya función es su participación en ciertos sistemas enzimáticos muy específicos del metabolismo. Este complejo pertenece a las vitaminas hidrosolubles, razón por la que el hombre debe consumirlas continuamente, pues no

son almacenadas por el organismo y cualquier exceso es eliminado por la orina ( 26 ).

De mucho tiempo se conocía que la anemia perniciosa se curaba con extracto de hígado, y luego de muchas investigaciones se logró aislar el factor curativo: la vitamina B<sub>12</sub> o cianocobalamina. Fue obtenida por primera vez en forma cristalina casi simultáneamente por Smith en Inglaterra (año 1948) y por Folkers y sus colaboradores en los Estados Unidos ( 42 ). Su contenido en el hígado es de aproximadamente 1 mg/kg ( 39 ).

Por otra parte, ni los animales, ni los vegetales pueden sintetizarla, por lo que sus formas comerciales se obtienen por procesos fermentativos. Es producida por un amplio número de bacterias y por algunas algas, pero no existen reportes de su producción por hongos y levaduras ( 45 ).

La obtención de cianocobalamina por síntesis química requiere aproximadamente 96 pasos. Por tanto, si se trata de obtenerla por esa vía o a partir del hígado, resultarían procesos antieconómicos. Es por lo que se obtiene por fermentación ( 39 ).

TABLA V: COMPONENTES DEL COMPLEJO B

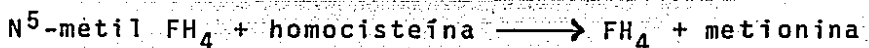
---

Vitamina B <sub>1</sub> (tiamina)	Vitamina B <sub>6</sub> (piridoxina)
Vitamina B <sub>2</sub> (riboflavina)	Vitamina B <sub>12</sub> (cianocobalamina)
Acido Nicotínico (niacina)	Biotina
Acido Pantoténico	Acido $\alpha$ -lipoico

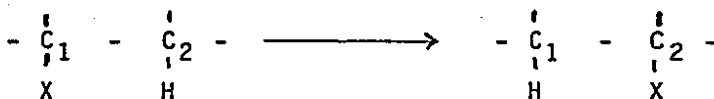
---

Fuente: Lehninger, A.L. (26 ).

1.2.1 Importancia de la vitamina B<sub>12</sub>: Funciones Bioquímicas. La vitamina B<sub>12</sub> participa como intermediario en la transferencia del grupo metilo del N<sup>5</sup>-metilte-trahidrofolato a la homocisteína, para la formación de metionina:



Por otra parte, la vitamina B<sub>12</sub> interviene en la ca-tálisis enzimática de los desplazamientos 1,2 de átomos de hidrógeno, entre átomos de carbono adyacentes. Esto es, actúa como portador intermediario de hidrógeno, para cambiar un átomo de hidrógeno unido a un carbono, por un grupo sustituyente de un carbono vecino. Este grupo sustituyente puede ser hidroxilo, un amino, un alquilo o un carboxilo. El mecanismo de la reacción es de gran complejidad y todavía no ha sido completamente definido.

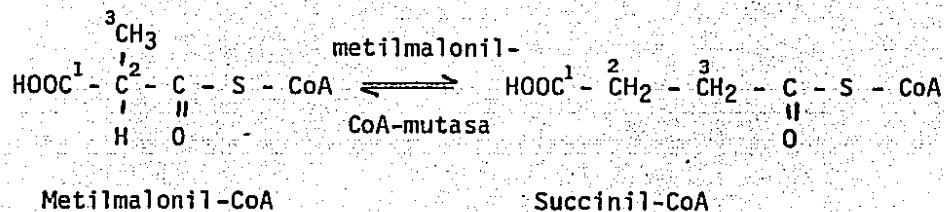


Desplazamiento 1,2 de un átomo de hidrógeno, en in-tercambio con el grupo X provocado por las enzimas depen-dientes de la coenzima B<sub>12</sub>.

También hay que señalar que la cianocobalamina se conoce como agente cofactor de la metilmalonil-CoA mutasa. Esta enzima interviene en la oxidación de los ácidos grasos de número impar. Para el caso de los enfermos aquejados de anemia perniciosa, que son deficientes de vitamina B<sub>12</sub>, se sabe que excretan por la orina grandes cantidades de ácido metilmalónico, así como del precursor de éste, el ácido propiónico, lo cual demuestra que en tales pacientes la reacción de la metilmalonil-CoA-mutasa, dependiente de la coenzima B<sub>12</sub>, es defectuosa ( 26 ).

En lo referente al género Propionibacterium se tiene que el proceso metabólico de mayor importancia en estos microorganismos está representado por la producción de ácido propiónico. La coenzima B<sub>12</sub> juega un papel importante sobre la metilmalonil-CoA mutasa, la cual cataliza la interconversión de metilmalonil-CoA y succinil-CoA, en el proceso de conversión del piruvato a propionato (Fig. II). Sin embargo, todavía no está claro el papel que juega la coenzima B<sub>12</sub> en la reacción. Esta última viene dada como sigue:





De acuerdo a los estudios realizados con trazadores isotópicos esta reacción ocurre mediante la migración del grupo -C-S-CoA, desde el átomo de carbono 2 del metilmalonil-CoA hasta el átomo de carbono metílico, en intercambio por un átomo de hidrógeno (26).

Finalmente hay que destacar que la cianocobalamina es esencial para la maduración normal y el desarrollo de los eritrocitos.

1.2.2 Estructura de la Vitamina B<sub>12</sub>. La cianocobalamina es la vitamina de estructura química más compleja, y su peso molecular es de aproximadamente 1,500 (Fig. III). Posee dos componentes característicos: el mayor es el sistema de anillos de corrina, que se parece al sistema de la porfirina de la hemoglobina. Contiene cuatro anillos del tipo pirrol, y un par de estos anillos de cinco términos se halla unido directamente, en vez de estarlo por un puente meteno. Coordinado con los cuatro

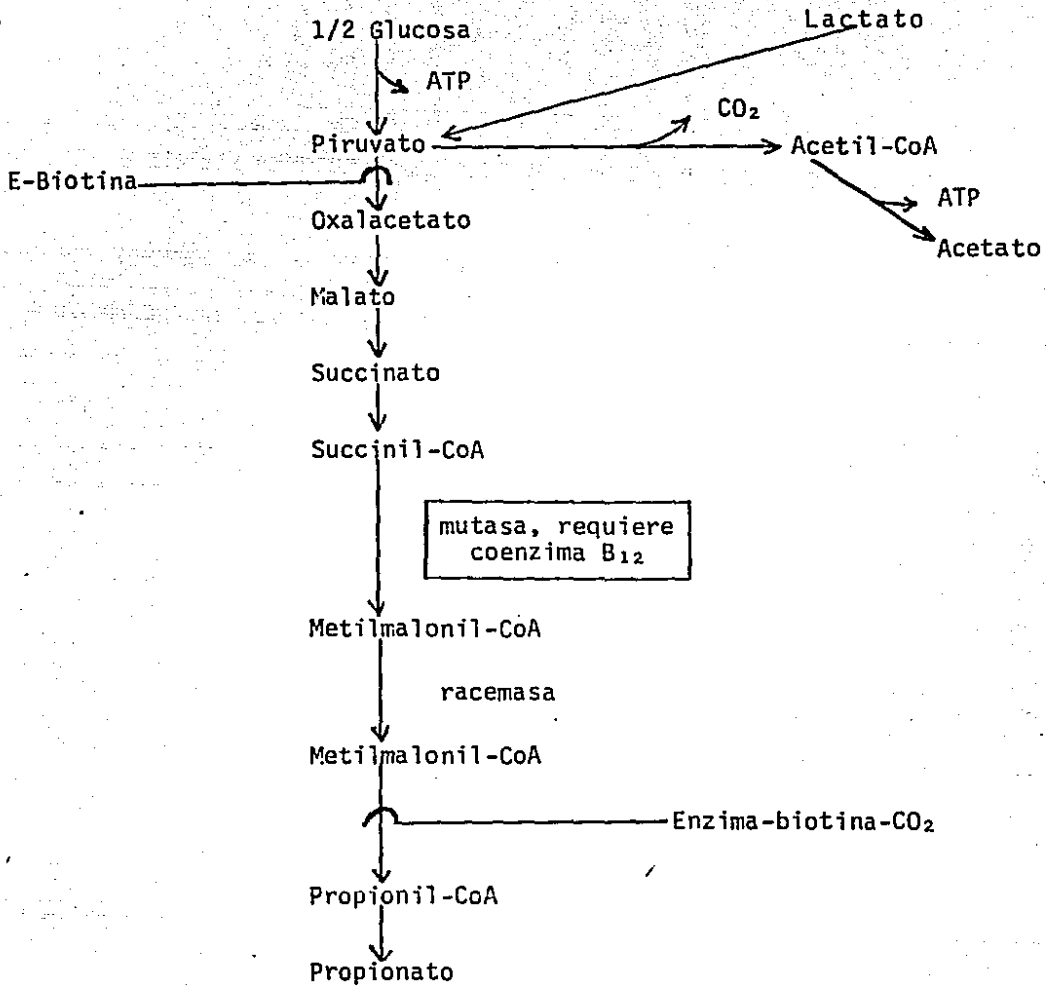


FIG. II: FERMENTACION PROPIONICA

átomos de nitrógeno internos del sistema de la corrina hay un átomo de cobalto, que es conocido desde hace tiempo por su importancia esencial en el crecimiento. Este átomo de cobalto se encuentra en la misma posición que ocuparía el hierro en la molécula de hemoglobina. El segundo componente principal de la vitamina B<sub>12</sub> es un ribonucleótido, el 5,6-dimetilbenzimidazol, unido por el enlace  $\alpha$ -N-glucosídico con la D-ribosa, en lugar de estarlo por el enlace  $\beta$  presente en la mayor parte de los demás nucleótidos. El cianuro ocupa una de las posiciones de coordinación del átomo de cobalto, de ahí el nombre de cianocobalamina.

1.2.3 Biosíntesis de la Vitamina B<sub>12</sub>. Las investigaciones acerca de la biosíntesis de la vitamina B<sub>12</sub> han sugerido que esa ocurre con la formación del sistema de la corrina (parecido al de la porfirina), con posterior incorporación del nucleótido. De acuerdo a los estudios realizados, dos moléculas de ácido  $\delta$ -aminolevulínico se condensan para formar porfobilinógeno, el cual es la unidad básica del macroanillo. La biosíntesis prosigue pasando por porfobilinógeno a uroporfirinógeno III, y este es luego sometido a metilación y rearreglo, con la introducción de la molécula de cobalto, para dar el cromóforo B<sub>12</sub>.

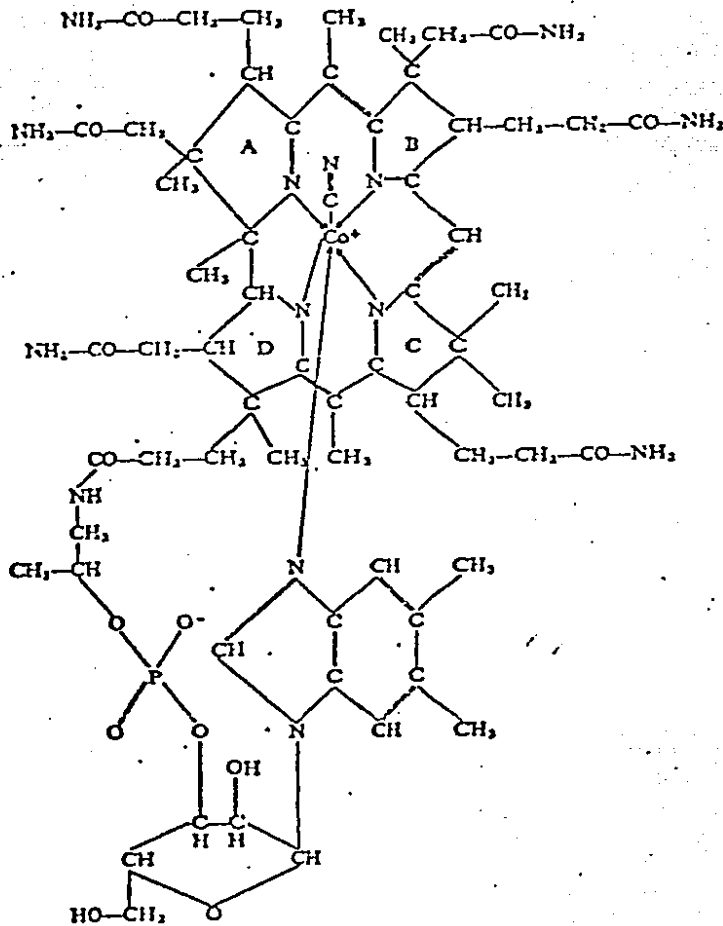


FIG. III. ESTRUCTURA DE LA VITAMINA B<sub>12</sub>.

Se ha demostrado que la metionina es la fuente de los seis grupos metilos (20), y se ha sugerido que el proceso de metilación ocurre después de la formación del macrociclo. Los demás grupos metilos provienen de la descarboxilación del ácido acético originado del ácido aminolevulínico (39). La molécula de aminopropanol proviene de la descarboxilación de la treonina, o de un derivado relacionado (5,6). El dimetilbenzimidazol se incorpora en la vitamina como el 5'-nucleótido. La ribosa viene a ser esterificada al C-3 con el fosfato de la DGP-cobinamida, y el producto es vitamina B<sub>12</sub> 5'-fosfato. Después el fosfato es removido en el último paso de la secuencia biosintética por una fosfatasa específica (Fig. IV).

1.2.4 Características: Propiedades Físicas y Químicas. La cianocobalamina es insípida e inodora, existe en forma de polvo rojo o en cristales en forma de agujas de color rojo. En su estado anhidro es muy higroscópica, pero se puede eliminar su humedad a 105°C a presión reducida. La vitamina B<sub>12</sub> es soluble en agua en concentración hasta 1.25%, relativamente soluble en alcoholes de bajo peso molecular y en fenoles, pero es insoluble en la mayoría de los solventes orgánicos. Los

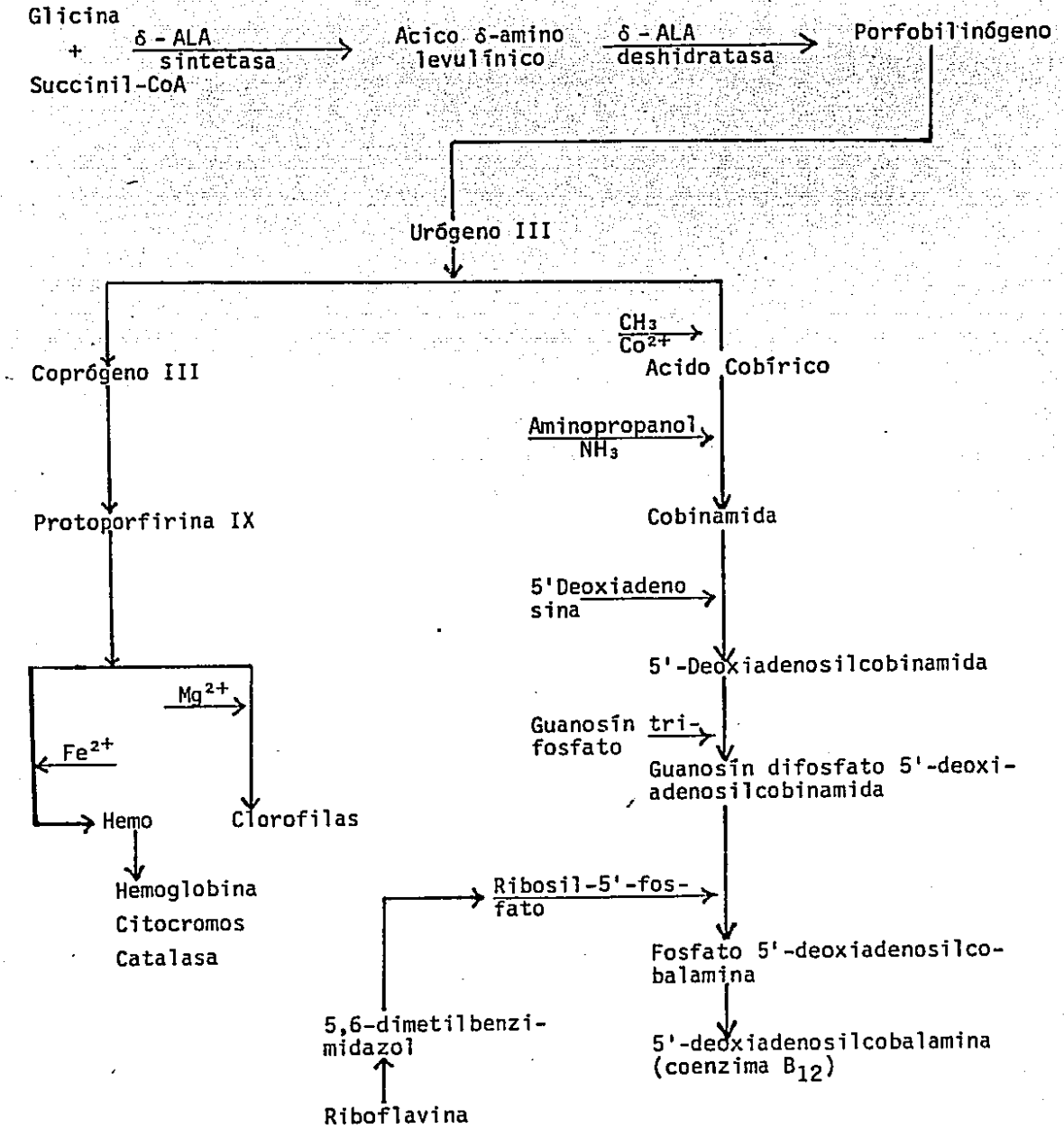


FIG. IV: RUTA GENERAL PARA LA BIOSINTESIS DE COBALAMINAS.

cristales se funden por encima de los 300°C. En la Tabla VI se describen otras propiedades relacionadas con la estabilidad de esta vitamina.

Aunque la forma más común de la vitamina es la cianocobalamina, existen otras en las que el grupo ciano está sustituido por el  $\text{OH}$  (hidroxicolamina),  $\text{NO}_2$  (nitrocobalamina),  $\text{HSO}_3$  (sulfitocobalamina), y otras (Tabla VII).

1.2.5 Producción de Vitamina B<sub>12</sub>. Aunque a la fecha se han descrito más de 100 procesos para la producción de vitamina B<sub>12</sub>, tan sólo seis de ellos han sido usados a escala comercial. Entre ellos cuenta la recuperación de vitamina B<sub>12</sub> como un subproducto de las fermentaciones de antibiótico (estreptomicina, clortetraciclina o neomicina), basado en el uso de Bacillus megaterium; otro en el que se emplea un estreptomiceto no identificado; uno en el que se usa Propionibacterium freudenreichii y Propionibacterium shermanii; y otro proceso en el que se usa Pseudomonas denitrificans.

En la Tabla VIII se resumen las características de varios de los procesos mencionados, de los cuales los más productivos son aquellos en los que se emplean

TABLA VI: ESTABILIDAD DE LA CIANOCOBALAMINA

pH 7	E
pH ácido	E
pH alcalino	E
Oxígeno o aire	I
Luz	I
Calor	E
Temperatura y esterilización a pH entre 4 y 6	E

E = Estable

I = Inestable

Fuente: Baduñ, S. ( 3 )



TABLA VII: FORMAS DE LA VITAMINA B<sub>12</sub>

LOS PRODUCTOS DE LA VITAMINA B<sub>12</sub> QUE EN PRINCIPIO SE OFRECEN AL MERCADO NACIONAL DE ACUERDO AL DIRECTORIO DE EMPRESAS, PRODUCTOS, SERVICIOS Y DISTRIBUIDORAS DE LA INDUSTRIA QUIMICA SON:

---

Cianocobalamina U.S.P.

Hidroxicobalamina

Vitamina B<sub>12</sub> en diferentes concentraciones

Vitamina B<sub>12</sub> grado alimenticio

Coenzima B<sub>12</sub>

Clorhidrato de hidroxicobalamina

Acetato de hidroxicobalamina

---

Fuente: Instituto Mexicano de Comercio Exterior (19).

Propionibacterium y Pseudomonas denitrificans, y en los que se producen títulos superiores a los 50 mg/l (39). 39

Se han descrito tanto procesos por lote como continuos, en los que se han empleado diferentes medios para el crecimiento del microorganismo y para la acumulación de vitamina B<sub>12</sub>. Entre esos medios se incluyen materiales de diversos orígenes como son el suero de queso, agua de la industrialización de la papa, hidrolizados de caseína, agua de cocimiento de maíz, etc. En los medios de fermentación se incluye cobalto, ya que forma parte de la molécula de vitamina B<sub>12</sub>.

Uno entre los procesos más productivos es el de Speedie & Hull (44), en el que se usan cultivos de Propionibacterium. El microorganismo es crecido anaeróbicamente durante 2 ó 4 días, y posteriormente es aereado vigorosamente durante 3 ó 4 días. En la fase anaerobia se forma gran cantidad de cobinamida (cobinamida 5'-deoxiadenosina), luego este compuesto es convertido a 5,6-dimetilbenzimidazolcobamida-5-deoxiadenosina durante la fase aeróbica (39).

Otro proceso importante es aquel que emplea Pseudomonas denitrificans crecida en un medio al que se adicio

TABLA VIII: PROCESOS PARA LA PRODUCCION MICROBIANA DE VITAMINA B<sub>12</sub>

Microorganismo	Componentes del Medio	Producción (mg/l)	Comentario
<i>Bacillus megaterium</i>	Melaza de betabel; fosfato de amonio; sales inorgánicas; sal de cobalto.	0.45	Aerobiosis
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	Glucosa; agua de cocimiento de maíz; sal de cobalto; control de pH hasta 7.0 con hidróxido de amonio.	19	3 días anaerobiosis y 3 aerobiosis
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	Glucosa; agua de cocimiento de maíz; sal de cobalto.	8	Cultivo continuo en dos etapas; tiempo de retención de 33 horas
<i>Propionibacterium shermanii</i>	Glucosa; agua de cocimiento de maíz; sal de cobalto.	23	3 días anaerobiosis y 4 días de aerobiosis

Cont. TABLA VIII.

Microorganismo	Componentes del Medio	Producción (mg/l)	Comentario
<i>Streptomyces</i>	Glucosa; harina de soya; sal de cobalto; fosfato de potasio dibásico.	5.7	Fermentación en lote de 6 días de duración
<i>Streptomyces olivaceus</i>	Glucosa; harina de soya; sales inorgánicas; vinazas; sal de cobalto.	3.3	Fermentación en lote de 6 días de duración y en aerobiosis
<i>Micromonospora</i>	Glucosa; harina de soya; carbonato de calcio; sal de cobalto.	11.5	Fermentación en lote de 7 días de duración y en aerobiosis
<i>Pseudomonas denitrificans</i>	Sacarosa; ácido glutámico; betaina; 5,6-dimetilbenzimidazol; sal de cobalto.	15	2 días aerobiosis

Cont. TABLA VIII.

Microorganismo	Componentes del Medio	Producción (mg/l)	Comentario
<i>Butyribacterium rettgeri</i>	Glucosa; agua de comiento de maíz; sal de cobalto.	5	4 días anaerobiosis.

Fuente: Modificado de Perlman, D. (39).

na betaína y 5,6-dimetilbenzimidazol (39,23).

#### 1.2.6 Extracción y Purificación de la Vitamina B<sub>12</sub>.

Prácticamente, toda la cobamida formada en las fermentaciones en las que se usan propionibacterias es retenida en las células, y el primer paso es la separación de estas últimas del medio de fermentación, lo que se hace por centrifugación hasta concentrar las células en una crema. Luego de una trituración de este material cremoso resulta un producto con actividad de vitamina B<sub>12</sub> y que puede ser usado como suplemento de alimento para animales. La actividad de vitamina B<sub>12</sub> es liberada de las células por ácido, calentamiento, cianuro u otros tratamientos. La adición de soluciones de cianuro (ya sea directamente a las células o al filtrado obtenido después del tratamiento de éstas) convierten la coenzima B<sub>12</sub> en vitamina B<sub>12</sub>. La cianocobalamina así formada es aislada de la solución por procesos variados: se ha reportado que la adsorción y elución de una resina de intercambio iónico IRC-50 proporciona una alta purificación inicial, y la adsorción en carbón y una elución selectiva también son recomendables. Las soluciones de cianocobalamina son luego purificadas con solventes fenólicos (fenol, cresol, etc.) y agua. La vitamina finalmente es cristalizada de soluciones acetona-agua (38).

### 1.3 PRECURSORES Y/O FACTORES DE CRECIMIENTO QUE PUDIERAN AFECTAR A LAS PROPIONIBACTERIAS.

Hasta ahora se han llevado a cabo muchas investigaciones sobre los requerimientos nutricionales de las propionibacterias. Sin embargo, aún no existen informaciones apropiadas en ese sentido, ni sobre la relación entre dichos requerimientos y la habilidad que tienen esos microorganismos de producir vitamina B<sub>12</sub>. Por ejemplo, se ha reportado que los aminoácidos son beneficiosos pero no esenciales para las propionibacterias (48). Por otra parte se ha sostenido que P. shermanii necesita la presencia de la mayoría de las vitaminas del complejo B (34). También se estableció que las purinas pueden ser incorporadas en la vitamina para dar sus análogos, sin embargo, las pirimidinas no hacen el mismo efecto.

En este trabajo se plantea adicionar ciertos agentes al medio de fermentación con el objetivo de conocer el efecto que pudieran tener sobre el crecimiento de P. shermanii y/o la producción de cianocobalamina. A continuación se describe la importancia bioquímica que tiene cada uno de esos agentes, para las actividades metabólicas y el desarrollo de los microorganismos.

1.3.1 Pantotenato de Calcio. La coenzima A o forma activa del ácido pantoténico interviene en la última etapa de descarboxilación oxidante del piruvato de acetil-CoA, cuya reacción es profundamente estimulada por el calcio. Esta es importante en la formación de acetato para el caso de propionibacterias (Fig. II).

1.3.2 Biotina. Esta vitamina participa en la fijación del CO<sub>2</sub> catalizada por la fosfoenolpirúvico carboxi transferasa, para dar oxalacetato. Posteriormente también interviene en la descarboxilación del metilmalonil-CoA para formar propionil-CoA. Ambas reacciones están incluidas en la ruta de producción de ácidos propiónico y acético de las propionibacterias, como se aprecia en la Figura II.

1.3.3 Fosfato de Piridoxal. Al igual que el fosfato de piridoxamina, el fosfato de piridoxal es una forma enzimática de la piridoxina, y es conocida como coenzima de muchas enzimas que participan en el metabolismo intermediario de los aminoácidos (15 ). Entre las reacciones enzimáticas que precisan de ese compuesto los tres más comunes son: transaminaciones, β-eliminación y adición, y racemización. Por otra parte se ha reportado que el fosfato de piridoxal es agente cofactor esencial en la



reacción de la glicina y el succinil-CoA para la formación del ácido  $\delta$ -aminolevulínico ( 25 ), primera reacción de la ruta biosintética de la vitamina B<sub>12</sub>.

1.3.4 Betaína. Este compuesto tiene en su estructura un nitrógeno cuaternario, en el que tres de los sustituyentes son grupos metilos. Por eso se postula que la betaína actúa como donador de grupos metilos, los cuales forman parte de la vitamina B<sub>12</sub> ( 39 ).

Otros investigadores han sostenido la hipótesis que la acción estimuladora de la betaína se debe a que aumenta la actividad de la  $\delta$ -aminolevulínico sintetasa ( 22 ). También se ha considerado la posibilidad de que ese compuesto actúe directamente mediante efecto sobre la síntesis de fosfolípidos. En un estudio realizado por Kortstee ( 21 ), este investigador estableció que la presencia de fosfolípidos era necesaria para la conversión de ácido  $\delta$ -aminolevulínico a protoporfirinógeno IX, por extractos de células de Arthrobacter globiformis que acumulan coproporfirina.

Sin embargo, el verdadero modo de como actúa la betaína permanece sin esclarecer. En investigación realizada por Demain y sus colaboradores ( 7 ) en la que usa-

ron Pseudomonas denitrificans y adicionaron diferentes dosis de esa al medio de fermentación (1, 2.5 y 5 g/l, respectivamente), encontraron que ese agente ejerció efecto estimulador sobre la producción de vitamina B<sub>12</sub>, aunque no hubo ningún efecto sobre el crecimiento celular.

1.3.5 Metionina. El grupo metilo de la metionina es usado como precursor para la formación de un gran número de biomoléculas entre las que se encuentra la vitamina B<sub>12</sub>. De acuerdo a los estudios realizados por Janicki y sus colaboradores (20), los grupos metilos del anillo corrinoide de la molécula de cianocobalamina son aportados por ese aminoácido. Sin embargo, no es la metionina per se la donadora directa de grupos metilos; dicha molécula es activada mediante reacción con el ATP, por la que se forma S-adenosilmetionina. La transferencia desde la S-adenosilmetionina es catalizada por una metil-transferasa, y se forma S-adenosilhomocisteína como producto desmetilado.

1.3.6 Treonina. Su degradación conduce a la formación de glicina y acetil-CoA. En una segunda ruta la treonina puede ser degradada hasta propionil-CoA, que es un precursor del succinil-CoA. Este último al igual que

la glicina es precursor en la formación de vitamina B<sub>12</sub>.

Lowe y Turner (28) realizaron estudios mediante el uso de L-treonina marcada, adicionada a un medio con Streptomyces olivaceus. Encontraron que dicha sustancia se incorporó específicamente en la molécula D-1-aminopropan-2-ol de la vitamina B<sub>12</sub>, con lo que quedó demostrado que el aminoácido contribuye con el esqueleto de carbono así como el nitrógeno del amino alcohol de esa molécula.

1.3.7 Histidina. Hasta la fecha no se conoce ninguna incidencia particular de este aminoácido en la producción de vitamina B<sub>12</sub>. En términos generales es importante señalar que su esqueleto carbonado se incorpora al ciclo de los ácidos tricarbóxico por la vía del  $\alpha$ -oxoglutarato. Los restos de este aminoácido son fundamentales para la actividad catalítica de muchas enzimas, entre ellos algunos que intervienen en la transferencia de fosfato, por ejemplo la succinil-CoA sintetasa.

1.3.8 Acido Glutámico, Alanina, Valina y Arginina. Estos aminoácidos donan sus grupos metilos mediante reacciones en las que interviene la acción de enzimas conocidos como transaminasas. Los grupos aminos se recogen en forma de un solo aminoácido, generalmente el ácido glutá

mico. Dado que el glutamato es el producto final de la mayor parte de las transaminaciones, actúa entonces como donador de grupo amino en una serie final de reacciones cuyo grupo específico se ve convertido en producto de ex cre ción nitrogenado. Posteriormente el glutamato experi menta una rápida desaminación en la que los grupos ami nos se separan en forma de iones  $\text{NH}_4^+$  (26).

CAPITULO 2

A N T E C E D E N T E S

El aprovechamiento de residuos de la industrialización de la piña, ha sido motivo de diversos trabajos. Hasta la fecha el uso que se ha dado a una parte de esos, ha sido para la obtención de salvado (cáscara de piña prensada y deshidratada) que se destina a la alimentación de ganado (13). En este sentido Martínez Martínez (30) en 1951, estudió la posibilidad de aprovechar los desperdicios provenientes de las fábricas procesadoras de la fruta, para la elaboración de forraje para el ganado, alcohol y vinagre para ser usado por las mismas empacadoras en el enlatado de otros productos. De acuerdo a los resultados de sus investigaciones Martínez Martínez concluyó que el bagazo de piña por sí solo no es suficiente para la alimentación de animales de leche, ni para el engorde de ganado. Más bien, puede ser usado para la elaboración de un alimento concentrado completo, si se mezcla con otros productos de un elevado contenido de proteínas y vitaminas.

Otras pruebas hechas por Martínez tuvieron por objetivo, la producción de alcohol y vinagre por vía fermentativa. Concluyó que el vinagre obtenido, por su contenido en ácido acético y cualidades organolépticas, era de buena calidad y podía tener buena aceptación en el

mercado.

Por otra parte, Tello Maya (46) realizó investigaciones encaminadas a la propagación de levaduras comestibles, en las que se emplearon los jugos residuales de piña como única fuente de carbono. Para su estudio este autor se fundamentó en que las proteínas de levaduras son de significativo valor alimenticio. Además consideró que su contenido en vitamina, particularmente del contenido de vitaminas del complejo B, la hacen apropiada como complemento para la dieta animal. Tello Maya afirma que los rendimientos en levadura seca obtenidos en su investigación fueron comparables con los obtenidos por otros autores que usaron sustratos diferentes, tales como melazas, hidrolizados de madera, etc.

Como se ha señalado, han sido varios los autores que han canalizado sus esfuerzos en encontrar aplicaciones útiles a los desperdicios de la industrialización de la piña. Todos ellos basados en la composición de esos residuos, en la disponibilidad de los mismos, y en los problemas que origina su eliminación al drenaje.

En términos generales, los resultados de las investigaciones realizadas son indicio de que esos residuos -

pueden tener utilidad práctica en la obtención de una diversidad de productos.

Sin embargo, ninguno ha intentado estudiar su posible uso en la producción de metabolitos de interés industrial con alto valor agregado como es la cianocobalamina. En este sentido se hizo una revisión exhaustiva de los trabajos realizados hasta la fecha, en los cuales se ha estudiado la producción de vitamina B<sub>12</sub>. No se encontró ninguna investigación acerca de esa vitamina en la que se haya empleado jugo de desperdicios de piña como fuente de carbono. Cabe señalar que otros autores han realizado trabajos acerca de la obtención de ese producto mediante proceso de fermentación, con el empleo de otros sustratos. Destaca el trabajo de Pérez Mendoza (37), quien empleó como fuente de carbono los subproductos industriales de limón mexicano. En su investigación Pérez Mendoza se fundamenta en los problemas de eliminación y contaminación ambiental que representan los residuos de la industria del limón (jugo cocido de limón). Consideró que los carbohidratos contenidos en éste (azúcares y ácido cítrico), podían ser usados por P. shermanii en fermentaciones destinadas a la producción de la vitamina B<sub>12</sub>, ya que se conoce a ese microorganismo como alta-



mente productor de este metabolito.

Aún y cuando el medio basal con jugo cocido de limón es poco aprovechado por P. shermanii para su crecimiento y producción de cianocobalamina, el trabajo de Pérez Mendoza resulta interesante, en el sentido que fue el punto de partida para investigaciones posteriores con cernientes a estudiar la producción de vitamina B<sub>12</sub> en México.

Santana Castillo (43) continuó con esta misma línea de trabajo. La autora se enfoca a estudiar la cinética de P. shermanii, con el uso de la misma fuente de carbono empleada por Pérez Mendoza. Basado en sus resultados y en otros obtenidos posteriormente, Santana Castillo descarta la posibilidad de usar el jugo cocido de limón en la producción de vitamina B<sub>12</sub> (Comunicación Personal). Los crecimientos celulares y las cantidades de producto obtenidos son muy bajos, aún en las mejores condiciones de fermentación, comparados con otros procesos en los que emplean otras fuentes de carbono.

En virtud de la posibilidad que presentan los jugos residuales de la industrialización de la piña, de ser usados en la producción de levadura, alcohol y vinagre

por fermentación, se considera de interés usarlos en la producción de cianocobalamina por ese mismo proceso. En tre otras razones, se toma en consideración el alto contenido de azúcares fácilmente metabolizables de estos ju gos, y que además existen las bases fundamentales sobre estudios en la producción de vitamina B<sub>12</sub>.

CAPITULO 3

O B J E T I V O

El objetivo de este trabajo es estudiar la producción de vitamina B<sub>12</sub> mediante proceso fermentativo de los jugos de desechos de la industrialización de la piña como fuente de carbono, y con Propionibacterium shermanii ATCC 13673. Es importante señalar que la producción de piña así como su industrialización se realizan por temporada, y al ser iniciada esta investigación no era época de procesamiento de la fruta. Por esa razón y en virtud de que los jugos extraídos directamente de la piña tienen la misma composición que los jugos provenientes de los desechos de la industrialización, se usaron esos (jugo de piña) en la realización de este trabajo.

CAPITULO 4

JUSTIFICACION DE LA INVESTIGACION

En esta investigación se propone estudiar la producción de vitamina B<sub>12</sub> por su importancia terapéutica (antianémica, antirreumática, antineurítica, etc.), y por su amplio uso en la fortificación de alimentos y en medicina veterinaria como factor de crecimiento. Por otra parte, esta vitamina no se produce en México, por lo que es un producto de importación cuyo costo en el mercado internacional es muy elevado (15,000 a 20,000 US Dlls./Kg de vitamina B<sub>12</sub> de 95 a 98% de pureza). En la Tabla IX se presenta una relación de las importaciones de polvo desecado de fermentación con actividad de vitamina B<sub>12</sub> (55%), desde 1978 hasta 1984. En esa se observa un aumento por año de la demanda del producto, así como un aumento en su valor unitario (Dlls/Kg). Estos factores son indicativos de la existencia de un mercado cada vez más amplio de ese producto. La disparidad de los datos presentados en el año 1981, probablemente corresponden a un registro erróneo por parte del Instituto Mexicano de Comercio Exterior.

Se plantea el aprovechamiento de los jugos residuales provenientes del procesamiento de la piña para su uso como sustrato fermentativo, por su alto contenido de carbohidratos y de otros nutrientes tales como minerales,

TABLA IX: IMPORTACIONES DE POLVO DESECADO CON ACTIVIDAD  
DE VITAMINA B<sub>12</sub>.

AÑO	VOLUMEN (KG/AÑO)	V A L O R	
		TOTAL (DLLS)	UNITARIO (DLLS/KG)
1978	714	1'326,623	1,858
1979	800	-	-
1980	819	1'866,051	2,278
1981	4,854	2'013,972	415
1982	774	1'715,736	2,216
1983	1,111	2'584,409	2,240
1984	842	2'066,453	2,454

Fuente: Instituto Mexicano de Comercio Exterior ( 19 ).

vitaminas, etc. Además de su composición, se toma en cuenta los altos volúmenes de producción de esos jugos. En 1983 la cantidad total de piña industrializada alcanzó las 210,210 toneladas (Tabla III), de las cuales 75,676 toneladas correspondieron a jugos residuales. Es importante señalar que el estudio se hace con jugos extraídos directamente de la piña, ya que al ser iniciado el trabajo no éra época de procesamiento de piña, y bajo la consideración que estos tienen una composición equivalente a la de los jugos de desechos de la industrialización de la fruta.

En la obtención de cianocobalamina normalmente se emplea glucosa como fuente de carbono, la cual es una materia prima de alto precio comercial. Los jugos de desperdicios de la industrialización de la piña constituirían un sustrato barato, apropiado para la producción de tan importante metabolito. Además de que se daría un uso relevante como materia prima de un proceso fermentativo, se estarían solucionando los problemas de contaminación ambiental que esos desechos originan al ser eliminados al drenaje.

Se usa Propionibacterium shermanii porque es conocido como uno de los microorganismos más altamente produc-



tores de vitamina B<sub>12</sub>. En este sentido hay que destacar que además de su amplio uso en procesos industriales de producción de cianocobalamina, tiene la capacidad de sin tetizar el 5,6-dimetilbenzimidazol (segunda parte de la molécula de vitamina B<sub>12</sub>). Esta característica representa una ventaja desde el punto de vista económico, ya que no es necesario adicionar este compuesto al medio de fer mentación, contrario a lo que ocurre en los procesos de producción en los que se usan otros microorganismos. De acuerdo a lo reportado en la literatura (17) Propioni- bacterium shermanii no emplea la sacarosa como tal, por lo que en esta investigación se emplea un método de hidrólisis de la sacarosa contenida en el jugo de piña.

**CAPITULO 5**

**MATERIALES Y METODOS**

### 5.1 MICROORGANISMO:

Para la producción de vitamina B<sub>12</sub> es de gran importancia la selección del microorganismo. Existe una gran variedad de microorganismos capaces de sintetizar cianocobalamina, en los que varían los rendimientos y producción de otras cobalaminas y compuestos análogos inactivos ( 11 ).

Se consideran como microorganismos buenos productores de vitamina B<sub>12</sub>, aquellos que la producen con altos rendimientos y tiempos de fermentación cortos, así como los que la producen a partir de sustratos de bajos costos. Entre los que cumplen estas condiciones destacan las propionibacterias, particularmente P. shermanii y P. freudenreichii, y además Pseudomonas denitrificans, por lo que son los más usados a nivel industrial ( 39 ).

En experimentos anteriores a este trabajo se probaron P. freudenreichii y P. shermanii porque además de ser altamente productoras de vitamina B<sub>12</sub>, tiene la capacidad de sintetizar el 5,6-dimetilbenzimidazol como se mencionó antes (ver Cap. 4). Se encontró que las dos propionibacterias fueron igualmente buenas productoras de cianocobalamina, pero P. shermanii resultó más fácil-

mente manejable en cuanto a la extracción de la vitamina. Por esta razón, y por las ventajas expuestas, se escogió P. shermanii como el microorganismo a ser empleado en esta investigación.

## 5.2 OBTENCION DEL JUGO DE PIÑA.

La temporada de producción de piña está comprendida entre noviembre y julio de cada año. A la fecha de iniciación de este trabajo no era época de procesamiento del fruto. Sin embargo, se tomó en consideración que los jugos de desperdicios de su industrialización, tienen la misma composición que la de los jugos extraídos directamente de la piña. Se decidió entonces comprar fruta fresca en el mercado y extraer los jugos, para iniciar la investigación. Se desconoce el origen, condiciones de cultivo y variedad de las piñas compradas.

Los pasos de extracción del jugo (Fig. V) consistieron en pelar las piñas y partirlas en trozos. Se trituraron en una licuadora (Hoffmann Pinther & Bosworth) y se filtró en un embudo buckner, utilizando gasa como medio filtrante. Posteriormente se centrifugaron los jugos (centrífuga Sorvall Dupont RC-5) a 10,000 RPM durante 15 minutos, para eliminar los restos de sólidos pre-

sentes, y luego se conservaron por congelación. Este proceso fue diseñado en el laboratorio.

### 5.3 TRATAMIENTO DE LOS JUGOS DE PINA.

Estos fueron sometidos a hidrólisis de la sacarosa presente, y a posterior estandarización de los azúcares reductores. El método de sacarificación se diseñó en el laboratorio y es el que se describe en el capítulo de Resultados y Discusión.

### 5.4 ORIGEN Y TRATAMIENTO DEL AGUA DE COCIMIENTO DE MAIZ (FUENTE DE NITROGENO).

Esta materia prima es un subproducto de la industria de obtención de almidón a partir de maíz. De acuerdo a las características generales reportadas por la compañía proveedora (Arancia Ingredientes Especiales, S.A.), el agua de cocimiento de maíz contiene menos de 2% de azúcares reductores totales, más de 28% de ácido láctico, y entre 7 y 9% de nitrógeno, todos en base seca. Su pH oscila entre 4.1 y 4.3, y es de naturaleza altamente viscosa, debido a que tiene una gran cantidad de sólidos en suspensión (alrededor del 50%). Por estas razones, el tratamiento que normalmente se aplicó fue diluirla 1:3 y ajustarle el pH entre 8 y 8.5 con hidróxido de sodio pu-

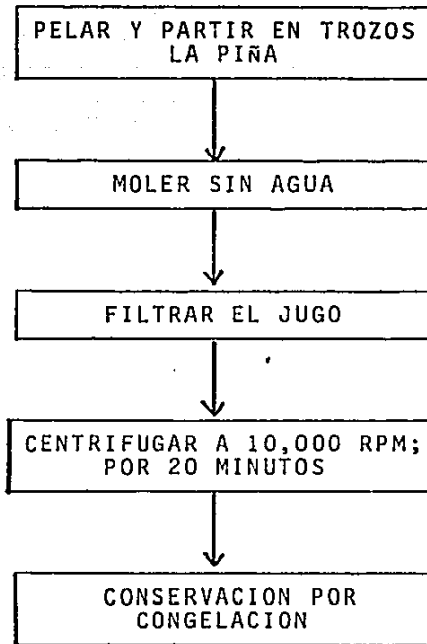


FIG. V: OBTENCION DE JUGO DE PINA

ro. Luego se centrifugó a 10,000 RPM durante 15 minutos (Sorvall Dupont RC-5), y se decantó el material líquido para su uso posterior.

### 5.5 COMPOSICION DE LOS MEDIOS DE FERMENTACION USADOS.

#### Medio Basal:

Azúcares Reductores (jugo de piña)	32.8	g/l
Nitrógeno (agua de cocimiento de maíz)	3.15	g/l
CoCl <sub>2</sub>	5	mg/l
Agua destilada	hasta	1 litro
pH	7.0	

#### Medio Control:

Glucosa	32.8	g/l
Nitrógeno (agua de cocimiento de maíz)	3.15	g/l
CoCl <sub>2</sub>	5	mg/l
Agua destilada	hasta	1 litro
pH	7.0	

Para otros experimentos el jugo de piña se sustituyó por sacarosa con la misma cantidad de carbohidratos.

Todos los medios de fermentación se formularon con 32.8 g/l de carbohidratos, con el fin de congruentar este trabajo con otros realizados en el mismo grupo de in-

vestigación, en los que se estudió la producción de cianocobalamina (43).

Se usó una concentración de nitrógeno de 3.15 g/l, basado en la cantidad que se emplea en la patente de Speedie & Hull (44) para la producción de cianocobalamina.

Por otra parte, la cantidad de cloruro de cobalto adicionada a los medios alcanzó los 5 mg/l. Se escogió esta concentración fundamentado en los estudios realizados de Bullerman y Berry (5), en los que emplearon diferentes concentraciones de esa sal, en fermentaciones con P. shermanii. Estos investigadores encontraron que la producción de cianocobalamina ya no se incrementaba cuando el medio se suplementaba con cantidades de cloruro de cobalto superiores a los 5 ppm.

#### 5.6 PREPARACION DEL MEDIO DE FERMENTACION.

El jugo de piña sin hidrolizar se diluyó con una cantidad de agua, tal que se obtuvieron 32.8 g de azúcares reductores por cada litro de medio. Tanto el jugo como el agua de cocimiento de maíz (cantidad que proporciona 3.15 g/l de nitrógeno) y el cloruro de cobalto (solución patrón de 5 mg/ml) se esterilizaron por separado,



y posteriormente se mezclaron asépticamente.

Durante el proceso de esterilización se formaron algunos sólidos al agua de cocimiento de maíz, pero fueron eliminados por decantación aséptica. El pH final del medio de fermentación fue de 7.0. Cuando los experimentos se llevaron a cabo con el uso de glucosa o sacarosa (hidrolizada), el jugo de piña fue sustituido por 32.8 g/l de esos azúcares, según el caso.

#### 5.7 REACTIVACION DEL MICROORGANISMO.

P. shermanii, previamente conservado en tubos con medio de lactato-levadura de Krebs (24), fue reactivado mediante la transferencia de 1 ml de ese cultivo en otro con 10 ml del mismo medio. Se incubó luego a 29°C, durante 48 horas y sin agitación.

#### 5.8 PREPARACION DEL INOCULO.

El microorganismo fue adaptado a los medios con jugo de piña, glucosa y sacarosa, respectivamente, de acuerdo a como se muestra en la Figura VI, para lo cual se partió del reactivado en medio de Krebs. Las adaptaciones, así como el inóculo, se prepararon en condiciones microaerófilas (200 ml de medio/matraz de 250 ml), para preservar la capacidad de producción de cianocobala

mina de P. shermanii.

Para las adaptaciones se transfirieron 10 ml del microorganismo proveniente de medio de Krebs, en 190 ml del medio correspondiente (inoculación al 5%). Se incubó a 29°C durante 48 horas y con agitación de 125 RPM (agitadora rotatoria de 1.5 cm de radio de giro, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM). En el caso del medio formulado con jugo de piña, fueron necesarias dos adaptaciones antes del inóculo.

Para la preparación del inóculo se emplearon 20 ml de la adaptación anterior y 180 ml de medio fresco (inoculación al 10%). La incubación se hizo en las mismas condiciones que las adaptaciones, durante un período de 36 horas.

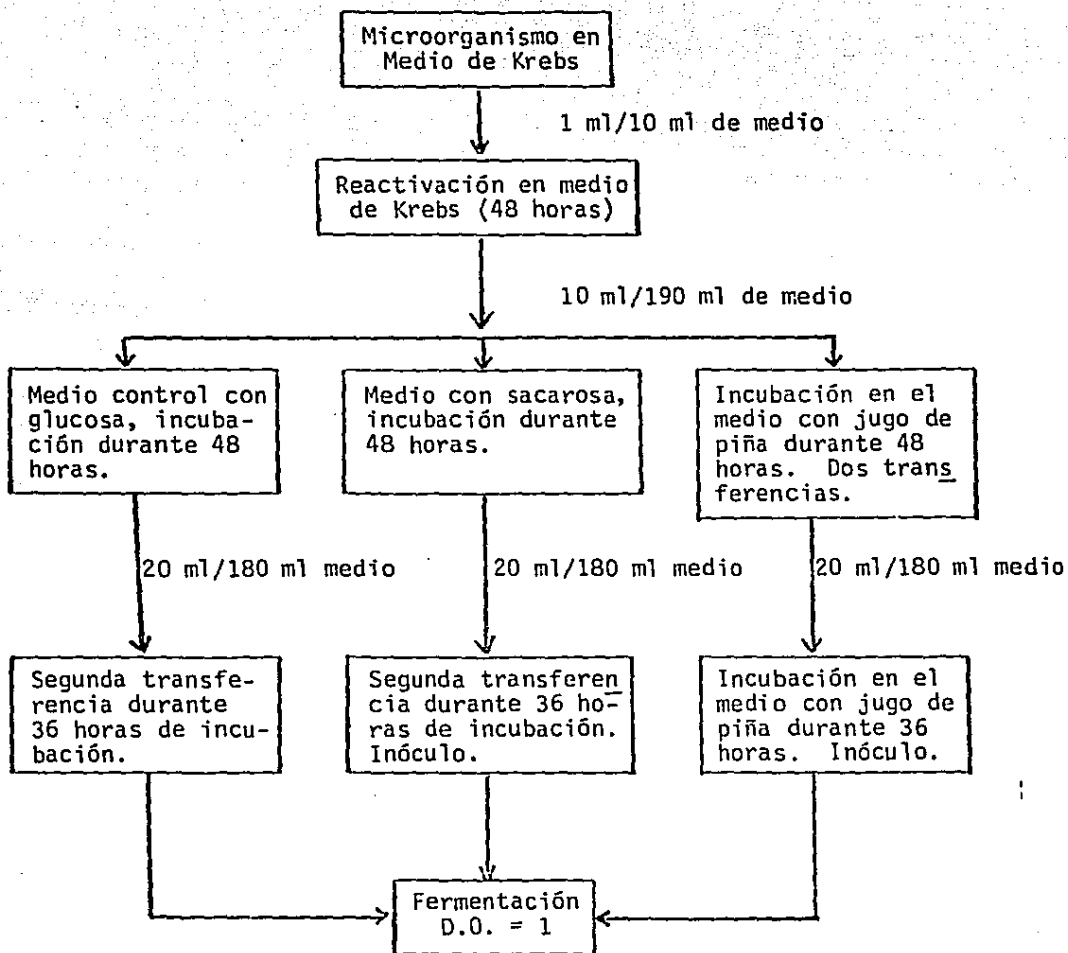


FIG. VI. Reactivación, adaptación e inóculo para P. shermanii ATCC 13673, en medios con glucosa, sacarosa y jugo de piña, respectivamente.

### 5.9 CONDICIONES DE FERMENTACION.

Edad del Inóculo	36 horas
Densidad Optica Inicial del matraz inoculado (medida a 540 nanómetros)	1.00
Temperatura	29°C
pH (ajustado periódicamente con NaOH al 20%)	7.0
Agitación	125 RPM
Tiempo de Fermentación	5-7 días
Relación Volumen de Operación/ Volumen Nominal	100/250

### 5.10 DETERMINACIONES ANALITICAS.

Crecimiento Celular: Se efectuó por turbidimetría a 540 nanómetros. Un mililitro de suspensión bacteriana se centrifuga durante 10 minutos (centrífuga Wifug, 5,700 RPM), se decanta el sobrenadante y el paquete celular se resuspende en 10 ml de agua y se vuelve a centrifugar, se diluye en una cantidad de agua apropiada para leer a la longitud de onda mencionada. Se calcula el peso seco

(g/l) en base a una curva de calibración de densidad óptica (D.O.) en función de peso seco.

Acido Láctico: Se determinó en un cromatógrafo de gases (Varian 3,700 - FID), columna: 3% OV-17 en Chromosorb WHP 80/100 (Pérez Mendoza y García Hernández, en prensa). El método se fundamenta en la metilación del ácido que se quiere determinar, se forma así un compuesto de alta volatilidad que es determinado cromatográficamente. Pre vio a la muestra que se quiere analizar, se determina la composición de una muestra estándar (concentración conocida) a la que se ha aplicado el mismo tratamiento. La cantidad de ácido láctico presente en la muestra, se cal cula por la medición de la altura de los picos y posterior comparación con el estándar correspondiente.

Vitamina B<sub>12</sub> en el paquete celular: El método empleado es el de Fisher (10 ). Este se base en la extracción de la vitamina B<sub>12</sub> de las células por calentamiento con pro panol más cianuro de potasio (solución de 100 mililitros de propanol más 10 mililitros de cianuro de potasio al 0.5%). Luego se induce la formación de monocianocobalamina en una alícuota y la de dicianocobalamina en otra alícuota, y se determinan sus absorbancias mediante lectura espectrofotométrica a 587 nanómetros. La vitamina

se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Vitamina } (\mu\text{g/l}) = \frac{\Delta A \times 1.19 \times 43 \times 10}{0.054}$$

en donde:  $\Delta A$  = diferencia de absorbancias entre el complejo monociano y el complejo diciano.

1.19 = factor de dilución.

43 = volumen de propanol-cianuro adicionado (ml)

10 = factor de conversión a  $\mu\text{g/l}$ .

0.054 = coeficiente de extinción de la vitamina  $B_{12}$  a 587 nanómetros.

Azúcares reductores: La determinación se hace mediante la técnica de Ting (47). El método se basa en la oxidación de los azúcares cuya concentración se desea determinar, con una solución alcalina de ferricianuro de potasio. La cantidad reducida de este último compuesto se determina colorimétricamente a 515 nanómetros. El color se desarrolla debido a la formación de complejos entre los iones metálicos reducidos y compuestos como el arsenomolibdato, con el que se forma un complejo de color verde esmeralda. La intensidad de color depende de la

concentración de azúcares en la muestra. Antes de cada medición se hace la calibración del aparato (Spectroni 20 Bausch & Lomb) con un testigo de reactivo preparado en la misma forma que las muestras de análisis.

Nitrógeno: Esta determinación se hace por el método de Kjeldahl ( 2 ), técnica que se basa en la digestión de la muestra con ácido sulfúrico concentrado, y en la que se forma sulfato de amonio a partir del nitrógeno proveniente de la muestra. Posteriormente, se realiza una destilación en la que el nitrógeno se desprende en forma de amoníaco, el cual es captado en un ácido débil. Después se efectúa una titulación con HCl 0.1 N para la cuantificación del amoníaco desprendido.

CAPITULO 6

RESULTADOS Y DISCUSION



La mayor parte de los azúcares del jugo de piña se encuentra en forma de sacarosa (27), la cual se ha reportado como no metabolizable por Propionibacterium shermanii (17). Se tomó en consideración ese antecedente para el acondicionamiento de la materia prima mediante inversión de la sacarosa presente. El proceso de sacarificación usado fue el mismo empleado para la inversión de una solución de sacarosa a varios valores de pH, y el cual se describe a continuación:

#### 6.1 HIDROLISIS DE UNA SOLUCION DE SACAROSA EN CONDICIONES DE ESTERILIZACION.

La finalidad de esta prueba fue determinar el pH al cual ocurría el máximo porcentaje de sacarificación en una solución de sacarosa de concentración conocida, para usarlo posteriormente en el tratamiento del jugo de piña. Se empleó ácido clorhídrico y condiciones de esterilización.

Se preparó una solución de sacarosa de 40 g/l. En matraces de 250 ml se colocaron 50 ml de la solución y se ajustó a pH en cada uno a 3.2, 3.0, 2.8, 2.0, 1.5 y 1.2, respectivamente, con ácido clorhídrico al 20%. Se esterilizaron a 121°C durante 15 minutos, se neutraliza-

ron con hidróxido de sodio al 20% y se determinó la cantidad de azúcares reductores. En este proceso se encontró que a medida que disminuyó el pH, aumentó la inversión de la sacarosa, hasta llegar a pH de 1.5, en el cual se observó aproximadamente el 100% de sacarificación (Fig. VII). A partir de ese valor, mientras se siguió disminuyendo el pH se observó la formación de compuestos coloridos, lo cual explica que a pH de 1.2 se detectaron 45.70 g/l de azúcares reductores. Por lo tanto, se descartó la posibilidad de usar pH de 1.2 ya que con éste no se tenía una determinación real de los azúcares del medio. En consecuencia, se tomó 1.5 como el pH al cual se realizaría la hidrólisis.

## 6.2 ANALISIS Y ACONDICIONAMIENTO DEL JUGO DE PIÑA.

Con el objetivo de saber si la composición del jugo de piña era apropiada para ser usado como sustrato de fermentación, con el empleo de Propionibacterium shermanii, se procesaron 3.718 kilogramos de piña, de acuerdo a lo descrito en 5.2. Al jugo extraído (3 litros) se le hicieron algunos análisis químicos. Los resultados se muestran en la Tabla X, en los que se puede apreciar que esos jugos contienen una alta cantidad de carbohidratos. De igual manera se detectó la existencia de minerales

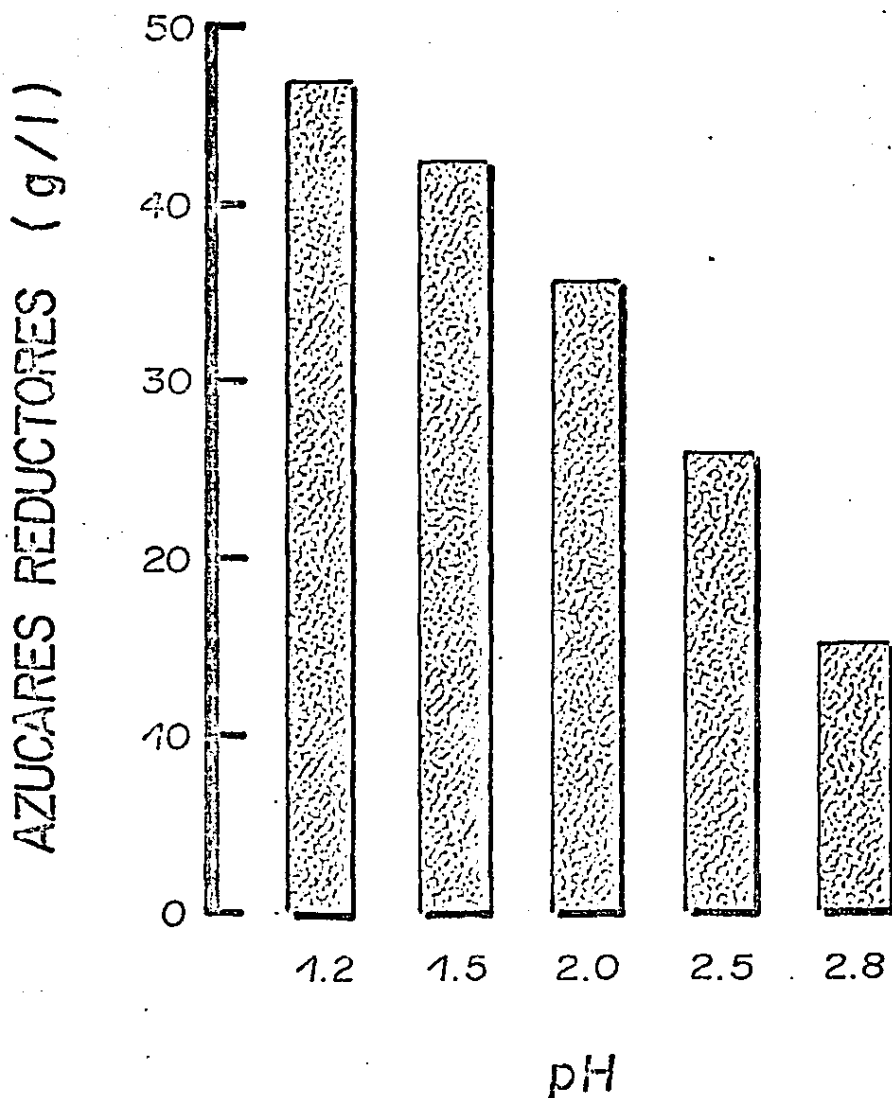


FIG. VII: Hidrólisis de una solución de sacarosa (40 g/l) a varios valores de pH, en condiciones de esterilización. Azúcares reductores totales determinados después del proceso de hidrólisis.

traza útiles para su aprovechamiento en un medio de fermentación. Una vez analizado, el jugo de piña fue acondicionado mediante el proceso de sacarificación empleado antes, según se esquematiza en la Figura VIII. Luego se diluyó hasta obtener una concentración de azúcares de 32.8 g/l.

### 6.3 PRUEBA DE CRECIMIENTO DE *P. shermanii* CON EL EMPLEO DE MEDIO CON JUGO DE PIÑA.

Después de establecer que tanto la composición del jugo de piña como las condiciones del procesamiento para obtener azúcares fácilmente asimilables son adecuadas para su uso en fermentación, se creció *P. shermanii* en ese medio. Se obtuvo un crecimiento muy pobre (Fig. IX), lo que tal vez se debió a la deficiencia de sustancias nitrogenadas en el jugo de piña (27) y/o de cloruro de cobalto en el medio. Ya que el microorganismo, como todos los seres vivos, necesita una fuente de nitrógeno para la formación de biomoléculas constituyentes de membrana, pared celular, etc., se estableció un medio base, para el cual se complementó el jugo de piña con agua de cocimiento de maíz, y con cloruro de cobalto.

Se empleó agua de cocimiento de maíz porque puede

TABLA X: ANALISIS DE LA MATERIA PRIMA (JUGO DE PIÑA)

---

pH	4.2	
°Brix	10.7	%
Acidez Titulable	0.57	%
Nitrógeno	0.10	%
Proteína (calculada)	0.625	%
Azúcares Reductores Totales*	10.4	%
Calcio <sup>+</sup>	0.011	%
Magnesio <sup>+</sup>	0.035	%
Manganeso <sup>+</sup>	0.0008	%
Cobre <sup>+</sup>	0.0002	%
Sodio <sup>+</sup>	0.008	%
Potasio <sup>+</sup>	0.135	%

---

El jugo de piña extraído se centrifugó (Sorvall/Dupont RC5 a 10,000 RPM por 20 minutos a 4°C) para eliminar sólidos en suspensión, y posteriormente se le hicieron las determinaciones reportadas en esta tabla.

\*Determinación realizada después de hidrolizar una alícuota de jugo de piña a pH de 1.5 en condiciones de esterilización.

<sup>+</sup>Determinaciones realizadas en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Química (UNAM).

La cantidad de minerales está expresada como por ciento en peso de materia seca.

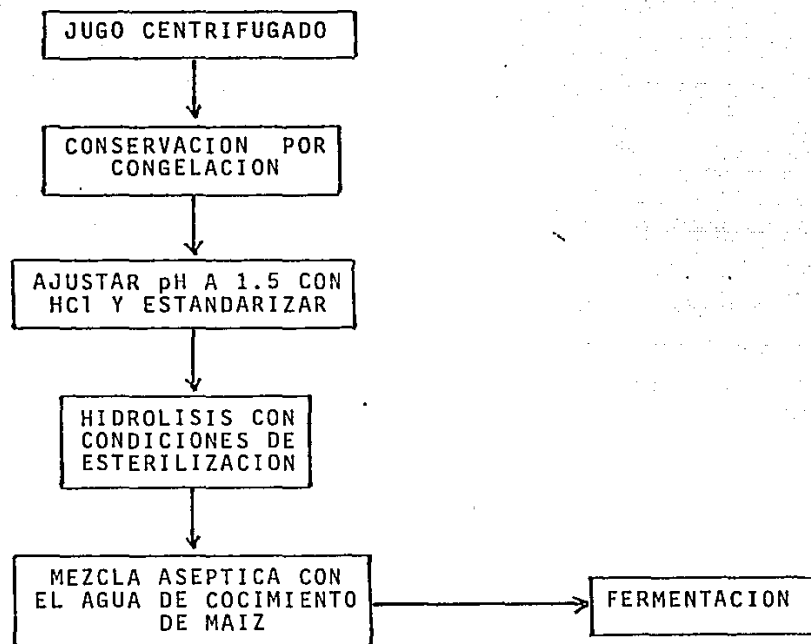


FIG. VIII: PROCESO DE ACONDICIONAMIENTO DEL JUGO DE PIÑA.

servir como fuente de nitrógeno, ya que es una materia prima rica en aminoácidos libres, y en ella abundan además otros nutrientes tales como vitaminas, minerales y ácido láctico, los cuales son usados por P. shermanii para su desarrollo. Particularmente el ácido láctico se usa como fuente de carbono. Otra ventaja de gran importancia es que esa fuente nitrogenada es un subproducto agroindustrial de muy bajo valor comercial, y eso resultaría económicamente atractivo para usarlo en un proceso a escala industrial. Al medio se adicionó también cloruro de cobalto por su importancia como precursor de la molécula de vitamina B<sub>12</sub>. En tal sentido se ha encontrado que la adición de esa sal al medio de cultivo aumentó la producción de ese metabolito (39).

Una vez obtenido el medio basal se realizó un experimento para determinar si el microorganismo no solo era capaz de crecer, sino también de producir vitamina B<sub>12</sub>. La prueba fue de 5 días de duración y se determinó crecimiento celular cada 24 horas. En los resultados presentados (Fig. X) se observa que P. shermanii además de crecer hasta 10.46 g/l a las 96 horas de fermentación, también produjo el metabolito de interés para este trabajo, ya que alcanzó los 3,185 µg/l a las 120 horas.

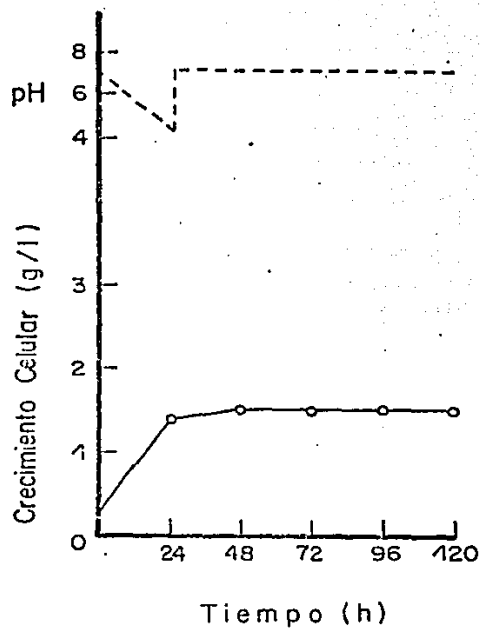


FIG. IX: Crecimiento celular en función de tiempo para *P. shermanii* - crecido en jugo de piña, sin fuente de nitrógeno y sin cloruro de cobalto. Se usan todas las condiciones de fermentación especificadas en Materiales y Métodos.

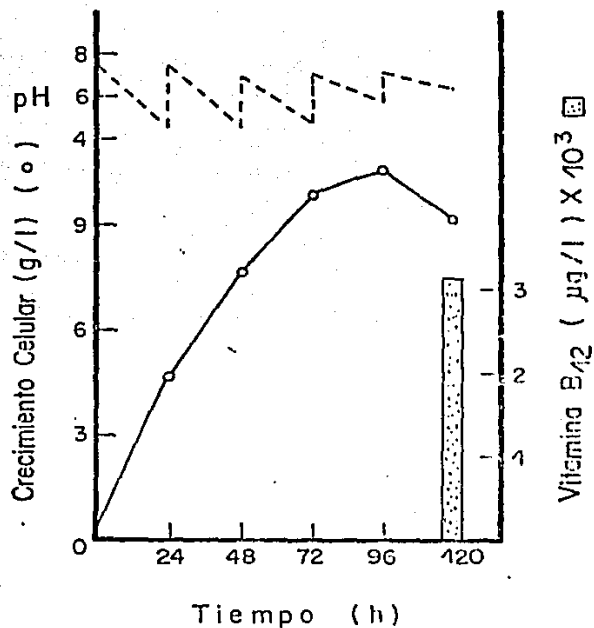


Fig. X: Crecimiento celular y producción de vitamina B<sub>12</sub> en función de tiempo, para *P. shermanii*, crecido en un medio a base de jugo de piña como fuente de carbono. El mismo está suplementado con 3.15 g/l de nitrógeno del agua de cocimiento de maíz y con 5 mg/l de cloruro de cobalto. Se usan las condiciones de fermentación especificadas en Materiales y Métodos.



En la fermentación también se observa que el perfil de pH alcanzó valores de hasta 4.7, por la producción de ácidos del ciclo tricarboxílico, así como de acético y propiónico. En ésta y en las demás fermentaciones siempre se ajustó el pH en el rango de valores óptimo para el buen desarrollo de P. shermanii y para la producción de cianocobalamina, de acuerdo a como se especifica en Materiales y Métodos.

#### 6.4 EDAD DE CRECIMIENTO DE LAS CELULAS DEL INOCULO.

Con la evidencia de que P. shermanii podía crecer y producir vitamina B<sub>12</sub> en el medio basal establecido, se decidió realizar la cinética de crecimiento a las células de un inóculo, para determinar el período de tiempo más apropiado para la realización de las fermentaciones.

El estado fisiológico de las células que van a ser empleadas como inóculo, es una variable importante que influye en la longitud de la fase lag de un procesos fermentativo, ya que en cada fase de su desarrollo las mismas difieren en características fisiológicas y químicas. Las células que se hallan en período de crecimiento logarítmico exhiben una pequeña o ninguna fase lag cuando se hace la transferencia al mismo medio. En cambio, las

que se hallan en fase estacionaria requieren un período relativamente largo de adaptación, y las que se encuentran en fase de muerte requieren un período aún más largo (29). En consecuencia, de la fase de crecimiento en que se encuentre el microorganismo depende que se pueda nulificar la fase lag en una fermentación, lo cual redundará positivamente en la productividad de todo el proceso.

Para conocer el intervalo de tiempo en el que P. shermanii se encuentra en su fase exponencial, se determinó la cinética de crecimiento en un medio cuya composición es la misma que la del usado en las fermentaciones. Las determinaciones se hicieron cada 12 horas durante 60 horas. Se encontró una fase logarítmica de crecimiento comprendida entre las 12 y las 48 horas (Fig. XI). Por consiguiente, esos fueron los límites de tiempo dentro de los que se tomó el inóculo para la realización de las demás pruebas, específicamente a las 36 horas.

#### 6.5 FERMENTACIONES A VARIOS NIVELES DE AERACION.

Se ha considerado a P. shermanii como un microorganismo microaerofílico (40). Sin embargo, algunos resultados presentados por S. Ibragimova y E.M. Shulgovskaya

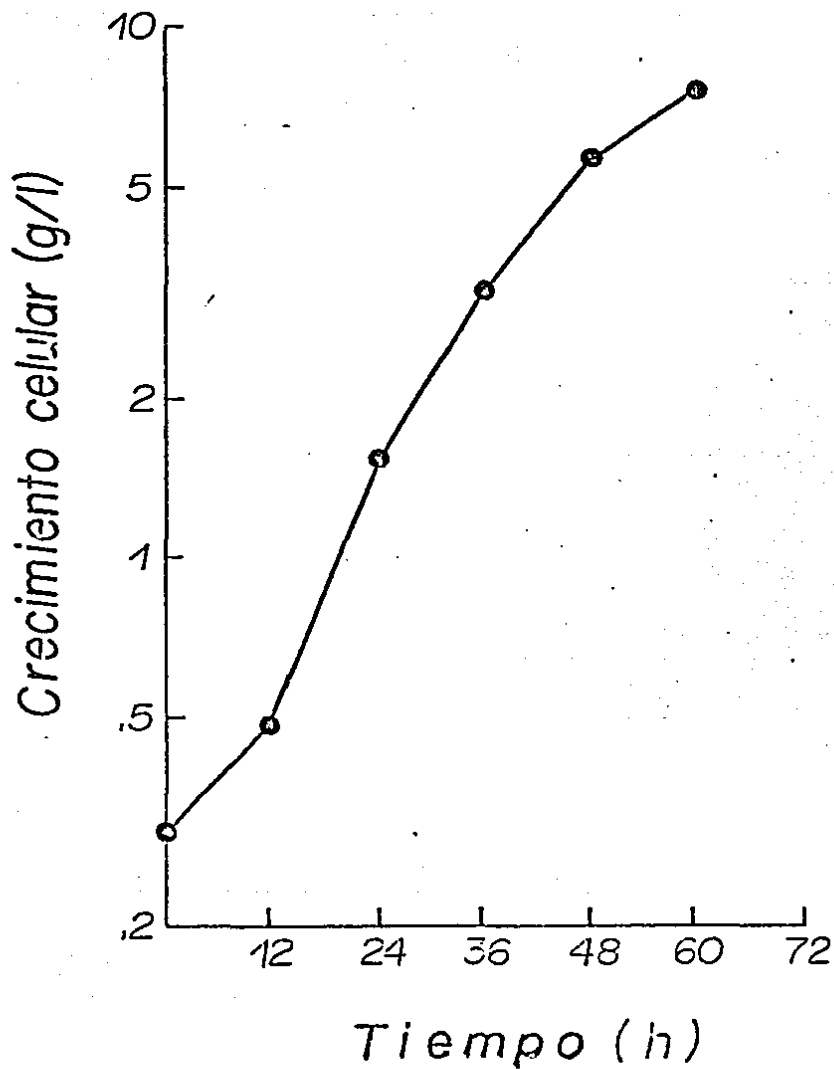


FIG. XI: Crecimiento celular en función de tiempo, para inóculo crecido en medio con jugo de piña, agua de cocimiento de maíz y cloruro de cobalto. Se emplearon 200 ml de medio/matraz de 250 ml y las demás condiciones de fermentación especificadas en Materiales y Métodos.

(18) demostraron que ese puede crecer mejor en un medio a tensiones de oxígeno relativamente altas, ya que las propionibacterias tienen todas las enzimas del ciclo de Krebs, por lo que se adaptan fácilmente al crecimiento aeróbico.

Para determinar el comportamiento de crecimiento bacteriano, producción, productividad y producción específica de vitamina B<sub>12</sub> a varios niveles de aeración, se diseñó un bloque de experimentos en los que se emplearon diferentes volúmenes de medio (25, 50, 75, 100, 125 y 150 ml, respectivamente), en matraces de 250 ml. Se hicieron estas pruebas para conocer la relación de volumen de medio de cultivo más conveniente, en términos de producción de vitamina B<sub>12</sub>. Los volúmenes que se emplearon proporcionaron indirectamente una condición de oxigenación al medio. A ese respecto vale señalar que el hecho que a un nivel de aeración determinado se tengan buenos crecimientos bacterianos, tal vez no implica que necesariamente las células se encuentren en las mejores condiciones fisiológicas para la obtención de cianocobalamina, lo cual habrá que corroborar.

Se hicieron mediciones de crecimiento bacteriano ca da 23 horas y de vitamina B<sub>12</sub> solo al final. Esta última

determinación se hizo en ese tiempo ya que de acuerdo a experimentos realizados por Santana Castillo (43), es al quinto día cuando se presenta la máxima producción de vitamina B<sub>12</sub>.

Cuando se emplearon 50 ml de medio se obtuvieron los más altos crecimientos celulares (Fig. XII). Con el uso de 25 ml de medio se estableció más pronto una fase estacionaria de crecimiento de P. shermanii a partir de las 69 horas, y se detectó más baja producción de vitamina B<sub>12</sub>, comparada con la obtenida con el empleo de las otras cantidades de medio. En este sentido existen antecedentes de investigaciones realizadas por Clark y colaboradores (6) en las que, estudiaron la síntesis de citocromos y su regulación en Spirillum itersonii, y encontraron que la actividad de la enzima  $\delta$ -ALA sintetasa era disminuída por una alta aeración y aumentaba en baja aeración. Dado que en propionibacterias la síntesis de citocromos tiene una ruta biosintética común con la de producción de vitamina B<sub>12</sub> (Fig. IV), y que la  $\delta$ -ALA sintetasa es la primera y la más importante enzima de esa ruta, se sugiere que la cantidad de oxígeno proporcionada cuando se emplearon 25 ml de medio afectó la mencionada enzima, a través de la formación de algún producto tóxi-

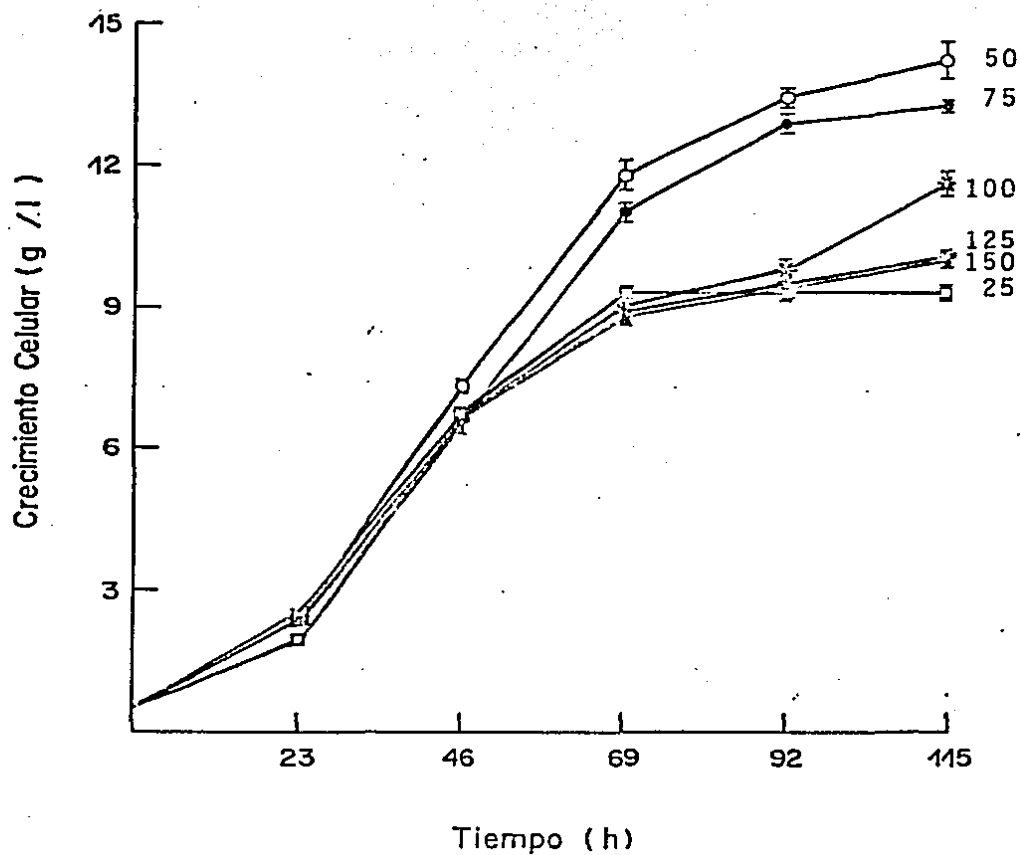


FIG. XII: Crecimiento celular en función de tiempo para *P. shermanii*, en medio con jugo de piña, en el que se usan diferentes volúmenes de medio (ml) en matraces de 250 ml: 25 (□), 50 (○), 75 (●), 100 (\*), 125 (■) y 150 (▲), respectivamente.

co como el superóxido o el peróxido de hidrógeno. La posible presencia de uno de esos productos pudo haber afectado la formación de citocromos y/o de vitamina B<sub>12</sub>, y consecuentemente, el crecimiento del microorganismo. Otra alternativa es que el succinato disponible entrara a formar parte del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, en vez de pasar a succinil-CoA y entrar a la ruta biosintética de la vitamina B<sub>12</sub> (Fig. XIII).

Cuando se emplearon 125 y 150 ml de medio, se hallaron crecimientos bacterianos muy similares. Se piensa que con estos volúmenes de medio de cultivo el efecto por parte del oxígeno fue el mismo.

Cuando se usaron 100 ml de medio la producción, productividad y producción específica de vitamina B<sub>12</sub>, de determinaciones realizadas al quinto día de fermentación para todos los casos (Fig. XIV) muestran que esos parámetros tienen valores de 5,033 µg/l, 43.76 µg/l<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> y 433.88 µg/g cél, respectivamente. De acuerdo a estos resultados, no existe una correlación entre el máximo crecimiento y la producción máxima de vitamina en relación a los volúmenes empleados. Se puede afirmar entonces que una muy alta oxigenación del medio favorece el crecimiento bacteriano, pero afecta negativamente la pro

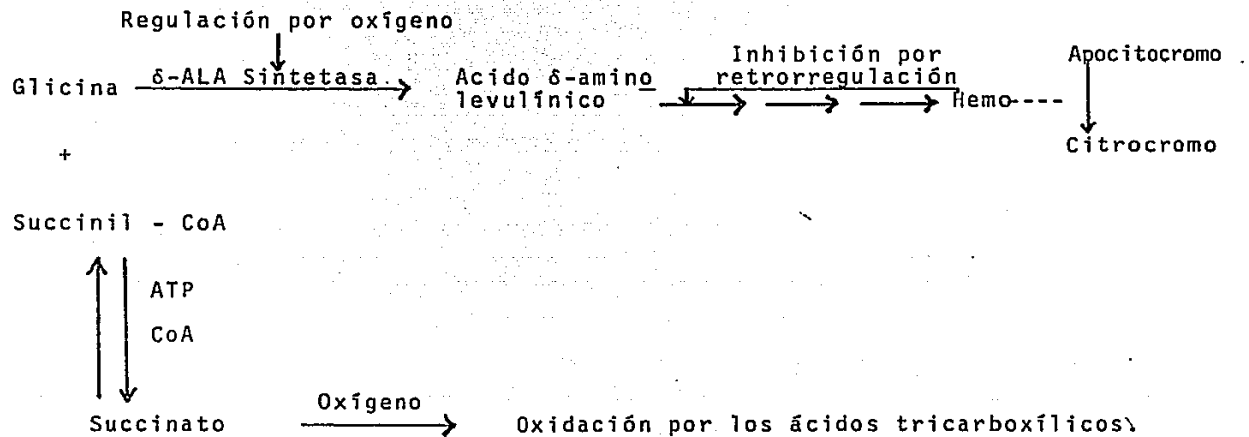


FIG. XIII: Efecto de la oxigenación sobre la  $\delta$ -ALA Sintetasa.

Fuente: Clark-Walker, G.D., Rittenberg, B. & Lascelles, J. ( 6 ).



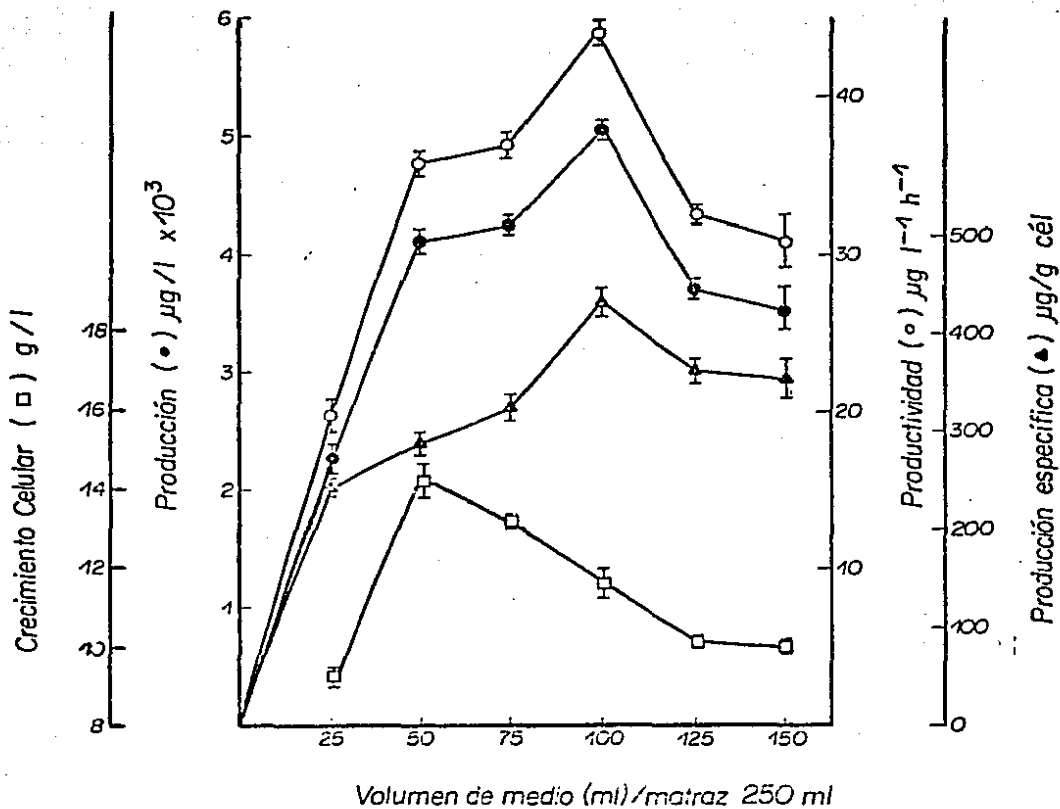


FIG. XIV: Crecimiento celular, producción, productividad y producción específica de vitamina B<sub>12</sub> Vs. volumen de medio/matraz de 250 ml, en determinación realizada al quinto día de fermentación.

ducción de vitamina B<sub>12</sub>, ya que las condiciones óptimas varían para cada caso.

En base a los resultados obtenidos, se escogió el volumen de medio con el que se obtuvieron mejores valores de producción, productividad y producción específica de vitamina B<sub>12</sub> para la realización de una cinética de fermentación, es decir 100 ml de medio.

#### 6.6 CINETICA DE LA FERMENTACION CON JUGO DE PIÑA USANDO 100 ml DE MEDIO/MATRAZ DE 250 ml.

Los estudios cinéticos son necesarios para entender el comportamiento de cualquier fermentación, y en general, consisten en la estimación de las velocidades de síntesis celular, de formación de producto y de utilización de sustrato (41).

En la Figura XV puede verse que P. shermanii creció en forma exponencial durante las primeras 46 horas de fermentación, y alcanzó una velocidad específica de crecimiento máxima de 0.063 h<sup>-1</sup> entre el tiempo 0 y las 23 horas. Se observó un consumo total del ácido láctico existente (11.96 g/l) en las primeras 23 horas. Esta fuente de carbono se consumió primero que cualquier otra en el medio, lo cual probablemente se debió a que con

este sustrato el microorganismo se ahorró los pasos que siguen la glucosa y/o fructosa para llegar hasta la formación de ácido láctico. Aunque en ese período de tiempo se detectó el consumo de una pequeña cantidad de los azúcares provenientes del jugo de piña, fue a partir de las 23 horas cuando hubo una más alta velocidad de consumo de los mismos. Pero, a las 115 horas aún no hubo un consumo total ya que sobró una cantidad de 20.82 g/l de azúcares residuales. De esos, 8.95 g/l son provenientes del agua de cocimiento de maíz, y no son metabolizables por P. shermanii, como se demostró anteriormente.

En la fermentación hubo un consumo de nitrógeno de 0.73 g, equivalente al 22.5%, lo cual es congruente con reportes anteriores (43) en los que se empleó la misma fuente nitrogenada, en la misma concentración usada en estos experimentos, y en los que P. shermanii solo alcanzó a consumir aproximadamente 1 g del nitrógeno asimilable (dializable).

La vitamina B<sub>12</sub> empezó a sintetizarse a partir de las 23 horas y se encontró que dicha producción en términos generales está asociada al crecimiento (Fig. XVI), es decir, la velocidad específica de producción de vitamina está directamente relacionada con la velocidad espe

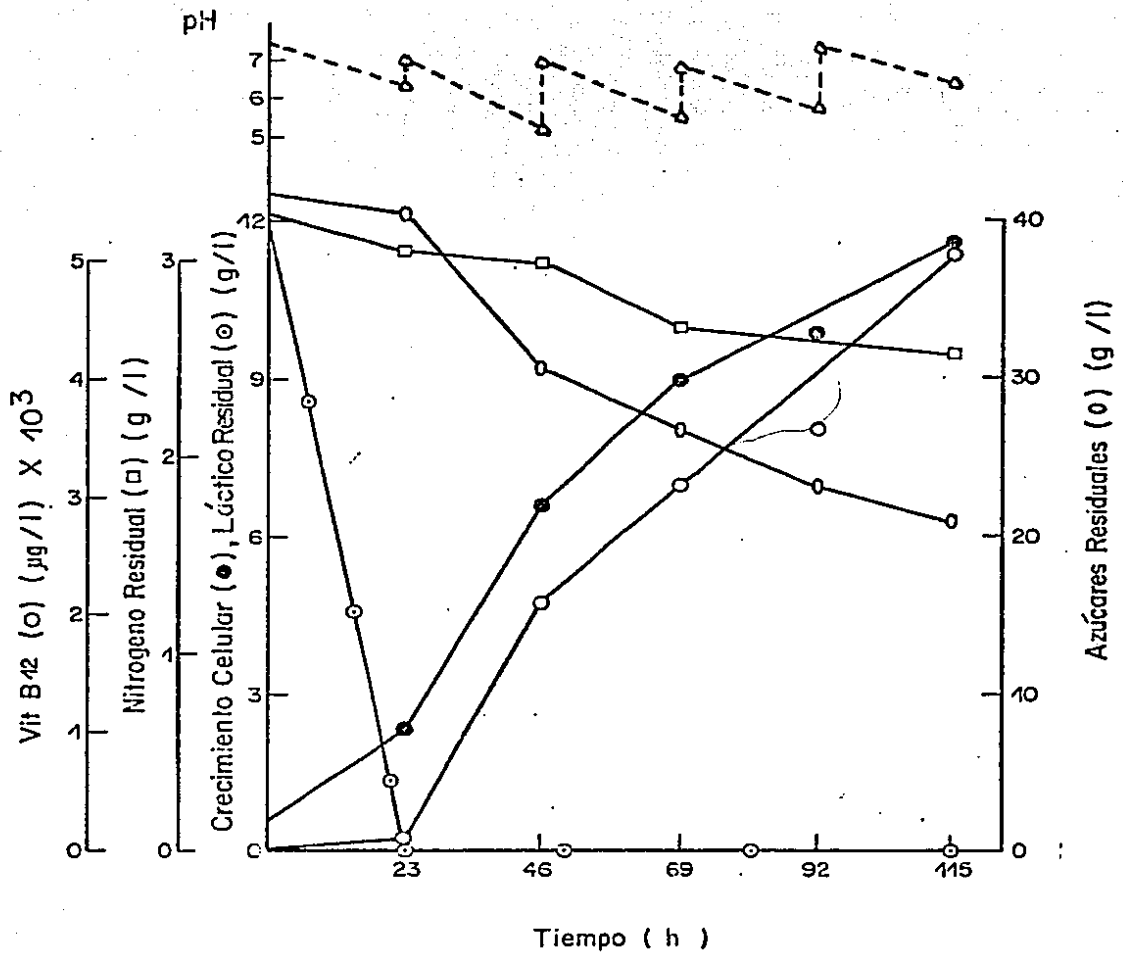


FIG. XV: Crecimiento celular, producción de vitamina B<sub>12</sub> y evolución de los diferentes sustratos (ácido láctico, azúcares y nitrógeno) en función de tiempo, para una fermentación en medio con jugo de piña. Se usan todas las condiciones de fermentación especificadas en Materiales y Métodos.

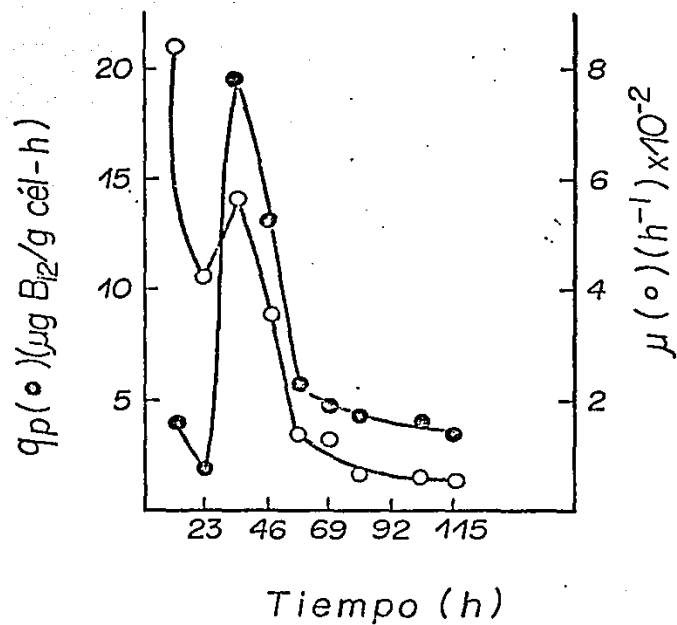


FIG. XVI: Tasa específica de producción de vitamina B<sub>12</sub> (q<sub>p</sub>) y velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de *P. shermanii*, para la cinética de una fermentación en medio con jugo de piña.

cífica de crecimiento. Por esta razón se considera una fermentación de tipo 1, de acuerdo a la clasificación de Gaden (29).

La cantidad de cianocobalamina detectada en las primeras 23 horas fue muy baja o prácticamente nula. Probablemente no se detectó mayor cantidad por la poca cantidad de masa celular existente en ese tiempo, o tal vez por la baja sensibilidad del método que se empleó para la determinación de esa vitamina.

Se calcularon las velocidades volumétricas y específicas de consumo de las fuentes de carbono y de nitrógeno, respectivamente. Estos parámetros nos dan idea de qué tanto el microorganismo aprovechó esas fuentes. De acuerdo a los datos obtenidos, las velocidades de consumo de la fuente de carbono disminuyeron progresivamente con la fermentación (Tabla XI), aunque todavía se observó una velocidad considerable al quinto día. Este comportamiento es razonable, pues todavía existía disponible en el medio cierta cantidad de azúcares.

En cuanto al aprovechamiento de la fuente de nitrógeno no se halló una tendencia uniforme en las velocidades de consumo de este nutriente, y al igual que en caso

TABLA XI: VELOCIDADES VOLUMETRICAS Y ESPECIFICAS DE CONSUMO DE LA FUENTE DE CARBONO PARA P. shermanii (ATCC 13673) EN UN MEDIO CON JUGO DE PIÑA.

TIEMPO (H)	VELOCIDADES VOLUMETRICAS (g l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	VELOCIDADES ESPECIFICAS (g g cél <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
0- 23	0.57	0.25
23- 46	0.43	0.065
46- 69	0.16	0.018
69- 92	0.15	0.015
92-115	0.11	0.0095

de la fuente de carbono todavía al quinto día se registraron ciertos valores, y además un alto porcentaje de nitrógeno en el medio (77.5%) (Tabla XII).

En un análisis cromatográfico del caldo de fermentación (Fig. XVII), se identificaron algunos compuestos entre los que se encontró el ácido malónico, el cual se encontró en una concentración máxima de 18.3 mg/ml. Fundamentado en evidencias experimentales anteriores en las que Gibson y sus colaboradores (14) demostraron que el ácido  $\delta$ -aminolevulínico (intermediario en la ruta biosintética de la vitamina B<sub>12</sub>) podía ser inhibido por derivados del ácido malónico como el aminomalonato y el etilaminomalonato, se piensa que posiblemente el ácido malónico detectado en el medio afectó el desarrollo de P. shermanii y/o la producción de cianocobalamina. Sin embargo, ésta es una suposición que tiene que ser comprobada.

#### 6.7 FERMENTACIONES DE SIETE DIAS DE DURACION.

6.7.1 En medio con jugo de piña.

6.7.2 En medio con sacarosa.

De acuerdo a los datos cinéticos obtenidos en el experimento anterior, después de las 115 horas aún queda-



TABLA XII: VELOCIDADES VOLUMETRICAS Y ESPECIFICAS DE CONSUMO DE LA FUENTE DE NITROGENO DE P. shermanii (ATCC 13673) EN UN MEDIO CON JUGO DE PIRA.

TIEMPO (H)	VELOCIDADES VOLUMETRICAS ( $g \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$ )	VELOCIDADES ESPECIFICAS ( $g \cdot g \cdot cé1^{-1} \cdot h^{-1}$ )
0- 23	0.0090	0.0039
23- 46	0.0025	0.00038
46- 69	0.014	0.0016
69- 92	0.0038	0.00039
92-115	0.0099	0.00085

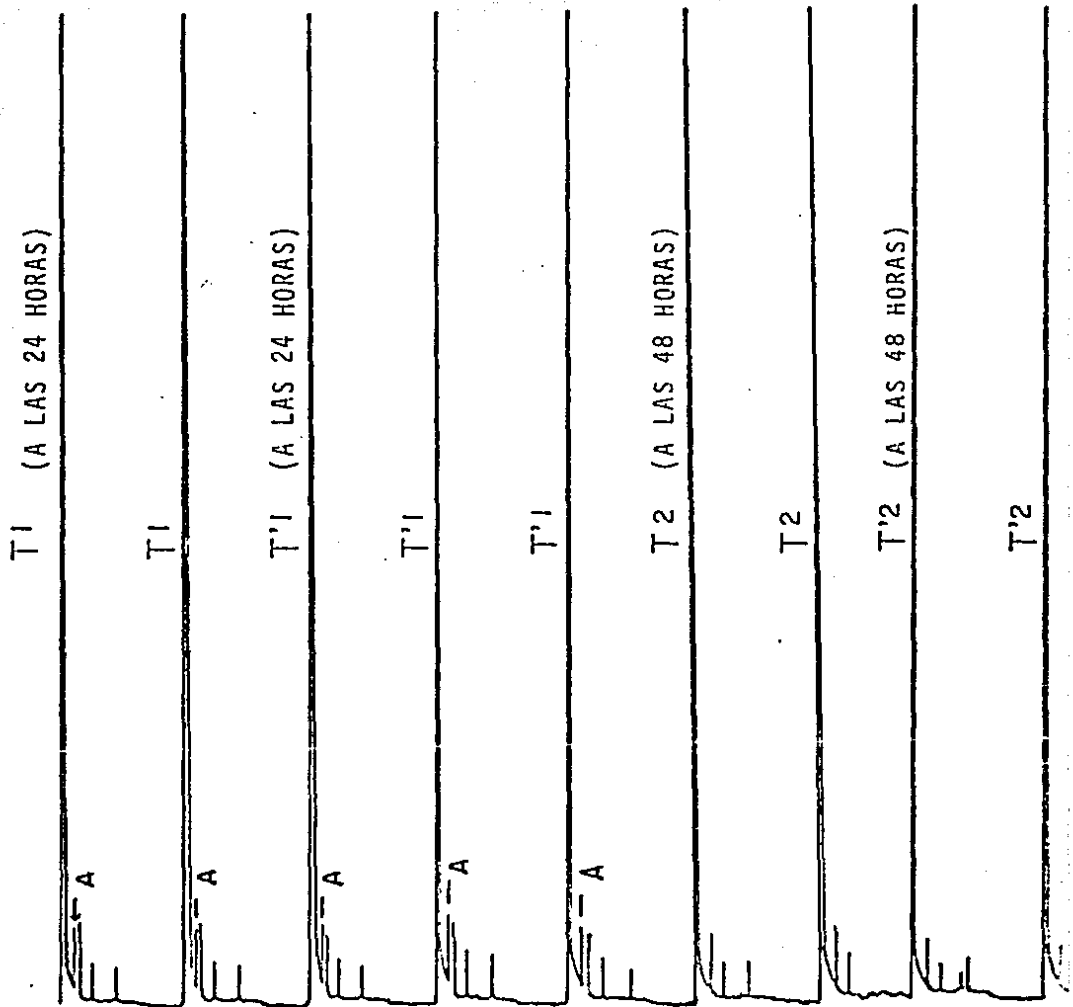


FIG. XVII: Cromatograma del caldo de fermentación en medio con jugo de piña, a las 24 y a las 48 horas, en el que A es el ácido malónico que aparece en este medio.

ron azúcares asimilables en el medio basal establecido, independientemente de los aportados por el agua de cocimiento de maíz (no asimilables). A consecuencia de esto, todavía al quinto día de fermentación P. shermanii seguía en plena fase de crecimiento, y los valores calculados de velocidades de consumo de las fuentes de nitrógeno y de carbono fueron considerables (Tablas XI y XII). Se tomaron en consideración esos antecedentes y se decidió llevar a cabo una fermentación en las mismas condiciones, pero de siete días de duración, para determinar el tiempo en el que éran consumidos los carbohidratos, y si ésto repercutía en el aumento en la producción de vitamina B<sub>12</sub>.

Dado que con el uso de sacarosa como fuente de carbono se podían minimizar las posibles interacciones causadas por los componentes del jugo de piña, se realizó una fermentación en la que se usó ese carbohidrato, en condiciones idénticas a las usadas con jugo de piña. También se consideró que la mayoría de los carbohidratos del jugo de piña se encuentra en forma de sacarosa, por lo que un medio formulado con este azúcar guarda estrecha relación con el medio basal con jugo de piña. El objetivo del experimento fue conocer el comportamiento de

P. shermanii en este medio, y además poder comparar con los resultados que se encontraran en el experimento planteado anteriormente. A la solución de sacarosa (32.8 g/l) se le aplicó el proceso de sacarificación en las mismas condiciones que se especifican en 6.1.

En los resultados de las dos fermentaciones (Figuras XVIII y XIX) se puede ver que el crecimiento celular cuando se usó jugo de piña alcanzó un máximo de 16.53 g/l a las 138 horas. La producción de vitamina B<sub>12</sub> fue de 6,629 µg/l a las 161 horas. Para el caso del medio formulado con sacarosa el crecimiento máximo fue de 13.24 g/l a las 161 horas, mientras que la producción de vitamina alcanzó a 6,326 µg/l a las 115 horas. La diferencia entre los crecimientos máximos de las dos fermentaciones fue de 19.9%, en cambio cuando se analizaron los valores máximos de producción de vitamina B<sub>12</sub> se encontró que diferían en 4.6%. Se piensa que tales diferencias pudieron deberse a que en el experimento en el que se usó jugo de piña había mayor contenido de ácido láctico (15.4 g/l) que aquél en el que la fuente de carbono fue sacarosa (8.3 g/l), y además pudo ser que el microorganismo empleara el ácido láctico procedente del medio principalmente para crecer, y en términos secunda-

rios para la producción de cianocobalamina o de cualquier otro producto de su metabolismo, pues la diferencia es más notoria para crecimiento.

El contenido de ácido láctico fue diferente en los dos medios, debido a que el agua de cocimiento de maíz (fuente de donde proviene ese carbohidrato), normalmente se almacena a 4°C durante un tiempo relativamente largo, en el que se ve sujeta a contaminación. Los microorganismos contaminantes no sólo consumen el ácido láctico, sino también el nitrógeno disponible. Por tanto, las diferencias se explican desde el punto de vista que los experimentos fueron realizados en tiempos diferentes, y el agua de cocimiento de maíz varió en su concentración de ácido láctico.

También se observa que el ácido láctico para las dos fermentaciones se consumió en las primeras 23 horas, y simultáneamente hubo un consumo de los azúcares, pero la curva de consumo de estos últimos es más pronunciada para el experimento realizado en medio con jugo de piña. Estos resultados coinciden con el hecho que las velocidades volumétricas y específicas de consumo de la fuente de carbono (Tabla XIII), en las primeras 46 horas fueron más altos cuando se empleó medio con jugo de piña. Pu-

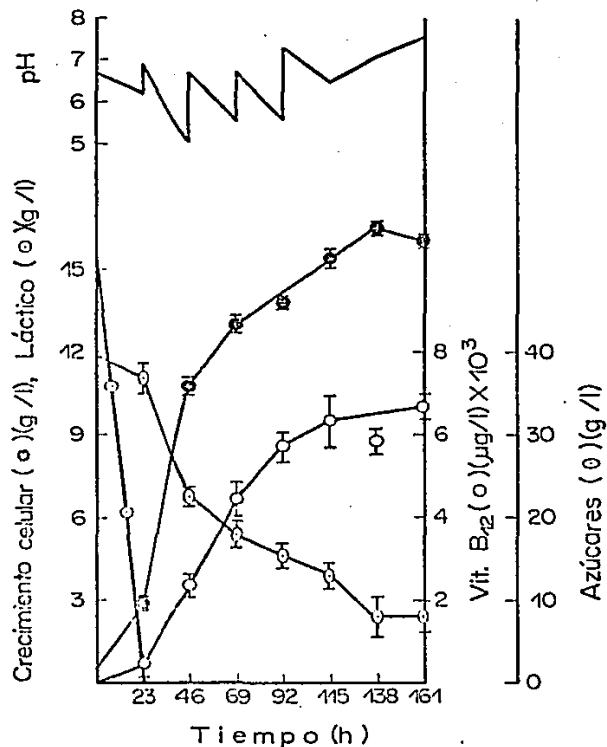


FIG. XVIII: Crecimiento celular, producción de vitamina B<sub>12</sub> y curvas de consumo de azúcares y de ácido láctico, así como evolución del pH, para *P. shermanii* en medio con jugo de piña (fermentación de siete días de duración).

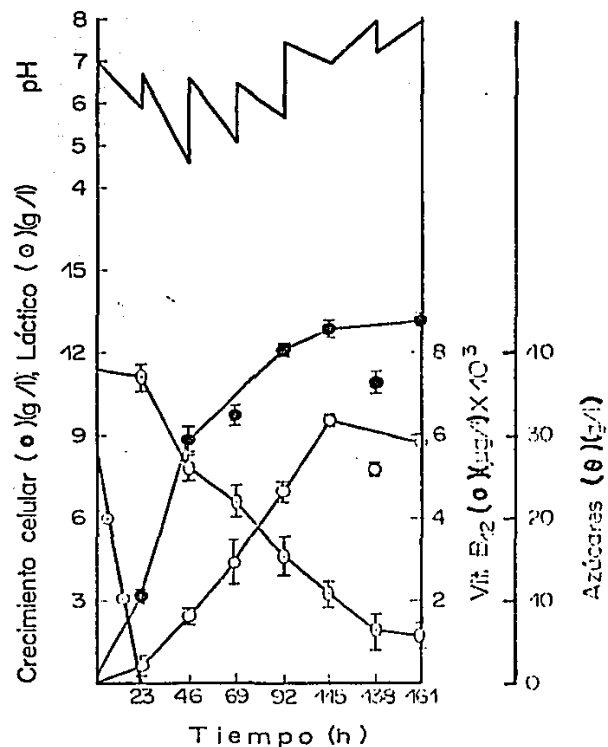


FIG. XIX: Crecimiento celular, producción de vitamina B<sub>12</sub> y curvas de consumo de azúcares y de ácido láctico, así como evolución del pH, para *P. shermanii* en medio con sacarosa hidrolizada (fermentación de siete días de duración).

TABLA XIII: VELOCIDADES VOLUMETRICAS Y ESPECIFICAS DE CONSUMO DE LA FUENTE DE CARBONO DE UNA FERMENTACION EN LA QUE SE USA JUGO DE PIÑA, Y DE OTRA EN LA QUE SE EMPLEA SACAROSA COMO FUENTE DE CARBONO.

TIEMPO (H)	VELOCIDADES VOLUMETRICAS (g l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )		VELOCIDADES ESPECIFICAS (g g c�el <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	
	JUGO DE PIÑA	SACAROSA	JUGO DE PIÑA	SACAROSA
0- 23	0.78	0.42	0.27	0.13
23- 46	0.63	0.48	0.059	0.054
46- 69	0.18	0.18	0.014	0.018
69- 92	0.11	0.28	0.0080	0.023
92-115	0.12	0.20	0.0078	0.015
115-138	0.22	0.19	0.013	0.017
138-161	0	0	0	0

diera ser que existiera en este último medio alguna sustancia que contribuyera a un aprovechamiento más rápido de los nutrientes por P. shermanii, y que no se encontrara presente en medio con sacarosa.

Para los experimentos tanto con jugo de piña como con sacarosa se observó una caída en la producción de vitamina B<sub>12</sub> a las 138 horas de fermentación, lo que tal vez se debió a inestabilidad de la misma con ese tiempo.

Los resultados también se compararon en función de las producciones, productividades y producciones específicas de las fermentaciones (Figuras XX, XXI y XXII), y se observa la misma tendencia para los tres parámetros, con resultados semejantes para las producciones específicas y otro tanto para las producciones. Sin embargo, las cantidades óptimas de ellos se obtienen en tiempos diferentes en los dos medios. Se piensa que el desfase en los valores óptimos se debió al efecto ejercido por alguna sustancia presente en el medio con jugo de piña, pues el medio basal con ese sustrato resultó doblemente complejo, ya que el agua de cocimiento de maíz también es una fuente rica en muchos nutrientes, como se mencionó antes.



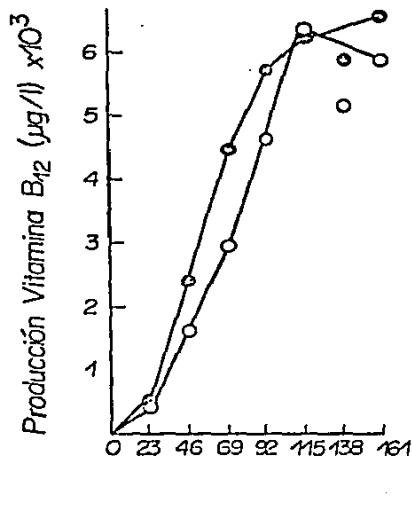


FIG. XX: Producción de vitamina B<sub>12</sub> (µg/l) Vs tiempo (h): ● medio con jugo de piña, ○ medio con sacarosa.

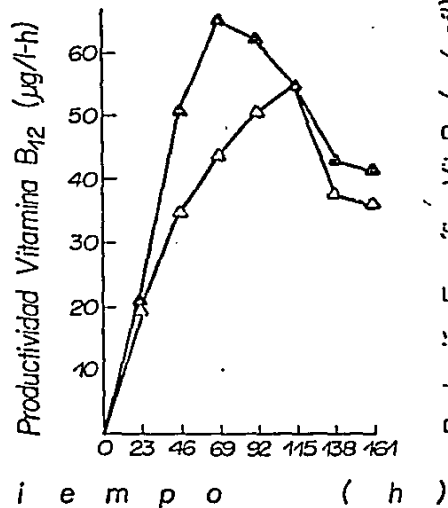


FIG. XXI: Productividad de vitamina B<sub>12</sub> (µg/l-h): ▲ medio con jugo de piña, △ medio con sacarosa.

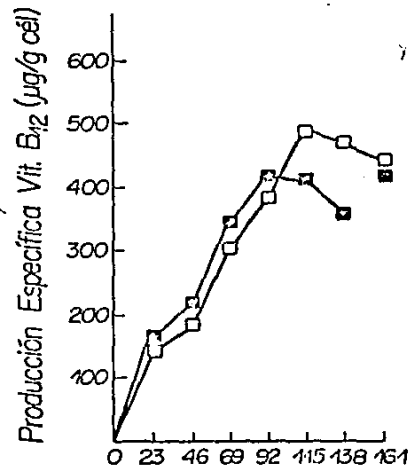


FIG. XXII: Producción específica de vitamina B<sub>12</sub> (µg/g cél): ■ medio con jugo de piña, □ medio con sacarosa.

En la fermentación con sacarosa también se detectó la existencia de cierta cantidad de ácido malónico (15.4 mg/ml) en las primeras 24 horas, y el cual desapareció a las 48 horas. Pero a excepción de lo especulado cuando se detectó su aparición en medio con jugo de piña (ver 6.6), no se puede hacer ninguna aseveración en relación a la aparición de este ácido, ya que sería necesario realizar experimentos en los que se prueba su posible efecto en la fermentación.

El consumo de la fuente de carbono continuó hasta las 138 horas, tiempo en el que se registró un consumo total para las dos fermentaciones. Los azúcares cuantificados a las 161 horas son los provenientes del agua de cocimiento de maíz, y que no son metabolizables por P. shermanii.

A excepción de las diferencias encontradas debidas a la presencia de mayor o menor cantidad de ácidos láctico, o de alguna(s) sustancia(s) del jugo de piña, en términos generales se puede decir que P. shermanii se comportó similarmente en los dos sustratos. Esto en cierto modo se explica desde el punto de vista que un medio formulado con sacarosa es el que guarda más parecido con el medio con jugo de piña. Además, los carbohidratos de

los dos medios no sólo se encontraron en la misma cantidad (32.8 g/l), sino que también fueron cualitativamente los mismos después de la sacarificación (glucosa y fructosa).

#### 6.8 FERMENTACION EN LA QUE SE EMPLEA GLUCOSA COMO FUENTE DE CARBONO.

Se propone realizar este experimento con glucosa como la fuente de carbono porque es la materia prima de mayor uso a nivel industrial, por lo que se considera de importancia obtener los datos cinéticos de una fermentación con este carbohidrato para establecer aspectos comparativos con los resultados obtenidos con el uso de jugo de piña. Por otra parte con glucosa se obtiene un medio más simplificado y hasta cierto punto es más fácil poder explicar el comportamiento de P. shermanii y relacionarlo con el comportamiento que este microorganismo tiene en el medio originalmente usado (jugo de piña).

El experimento se llevó a cabo en las mismas condiciones de aquél descrito en 6.6, e igualmente se determinaron los parámetros cinéticos correspondientes.

Los resultados muestran que el crecimiento bacteriano máximo alcanzó los 15.98 g/l a las 92 horas de fermentación.

tación (Fig. XXIII). A partir de ese tiempo se presentó una caída en el mismo, lo que tal vez se debió a que el microorganismo ya no disponía de fuente de carbono asimilable para su desarrollo. En la fermentación con jugo de piña, aún a las 115 horas P. shermanii se encontraba en fase de crecimiento (Fig. XV), y se obtuvo 11.60 g/l de crecimiento celular (27.40% menos que en glucosa), y 20.82 g/l de azúcares residuales.

También se encontró que hasta las 92 horas el microorganismo tuvo velocidades específicas de crecimiento más altas que con el uso de jugo de piña (Fig. XXIV), con una  $\mu_{\text{máx}}$  de  $0.083 \text{ h}^{-1}$  (24.10% veces mayor que la encontrada en jugo de piña). El crecimiento exponencial se presentó en las primeras 46 horas, e igualmente hubo un consumo total de ácido láctico (12.2 g/l) en las primeras 23 horas.

Las producciones de vitamina B<sub>12</sub> en ambos medios fueron muy parecidas en todos los tiempos, máxima de 4,780  $\mu\text{g/l}$  en glucosa y de 5,033  $\mu\text{g/l}$  en jugo de piña al quinto día de fermentación (Fig. XXV). Al calcular las productividades se encontró la misma tendencia (Fig. XXVI), con valores ligeramente superiores en glucosa. Para el caso de las producciones específicas (Fig. XXVII)

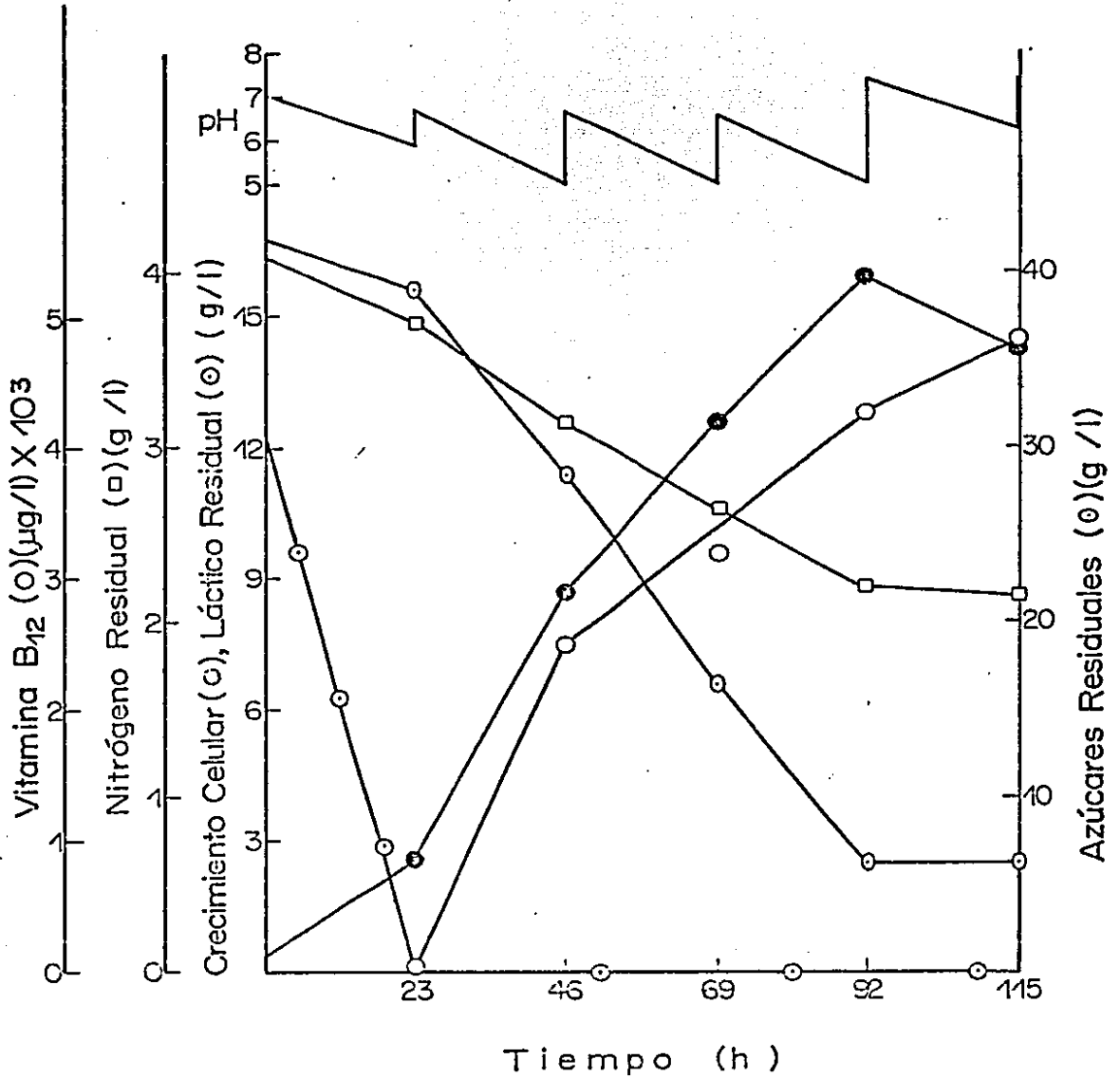


FIG. XXIII: Crecimiento celular, producción de vitamina B<sub>12</sub>, consumo de las fuentes de carbono y nitrógeno, así como evolución del pH, para una fermentación con P. shermanii en un medio control con glucosa.

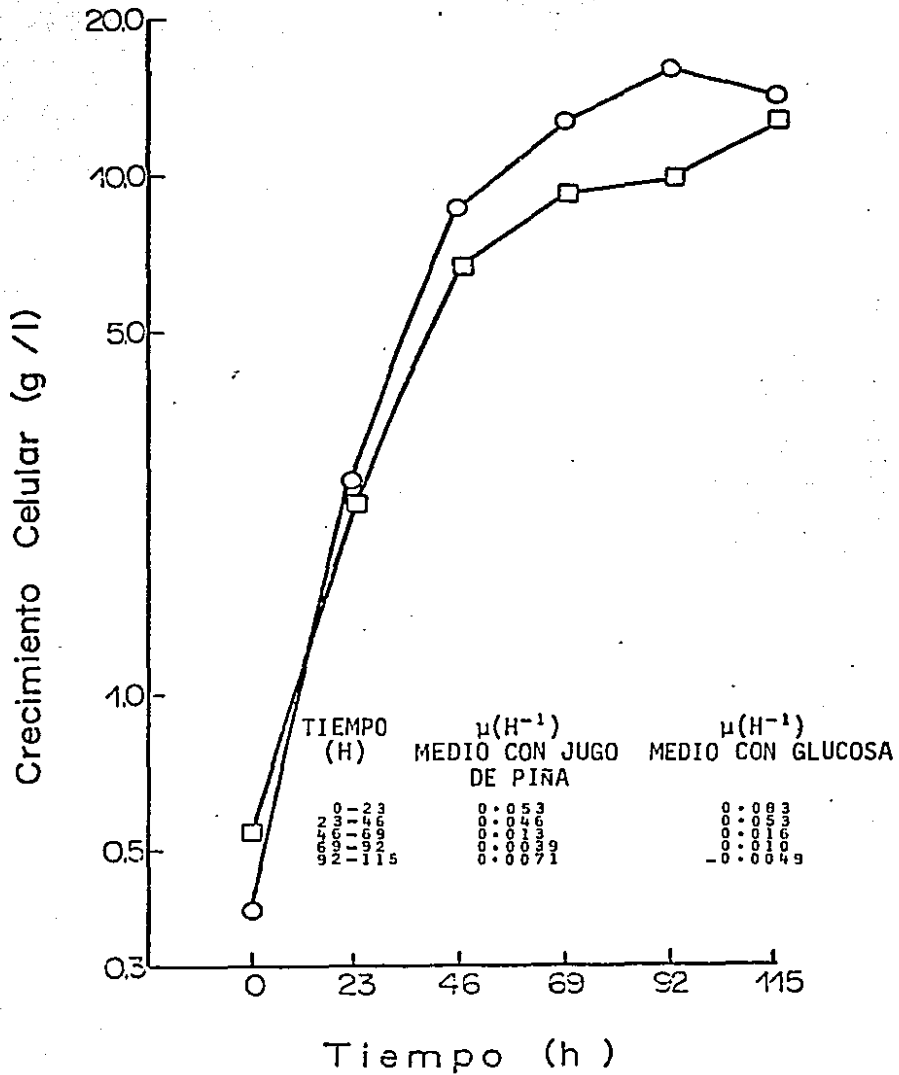
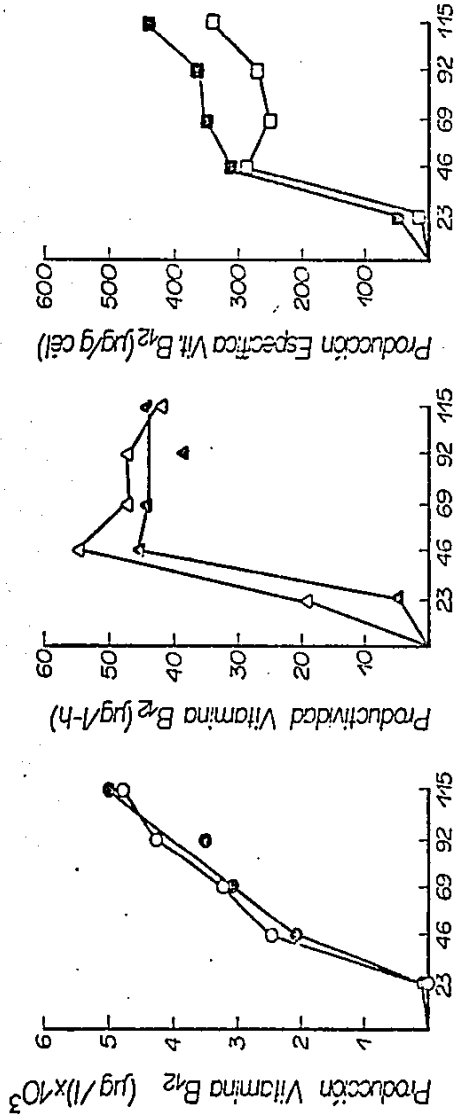


FIG. XXIV: Curvas de crecimiento y valores de velocidades específicas de crecimiento para *P. shermanii* en medio con jugo de piña ( $\square$ ) y en medio con glucosa ( $\circ$ ), expresadas en  $h^{-1}$ .

se nota que siempre fueron mayores en favor del jugo de piña, y las diferencias se destacaron más a partir de las 46 horas.

Se calcularon las velocidades volumétricas y específicas de consumo tanto de la fuente de carbono como de la de nitrógeno (Tabla XIV y XV). En todos los tiempos se obtuvieron valores más elevados que los calculados en medio con jugo de piña. Estos resultados son congruentes con el hecho que P. shermanii crece más lentamente a partir de los componentes de este último medio.

También se hicieron los cálculos de rendimientos celulares y de producción de cianocobalamina en relación a la fuente de carbono, a las 92 y a las 115 horas (Tabla XVI), es decir, a los tiempos de mayores crecimientos y producciones de vitamina B<sub>12</sub>. En los sustratos entre los que se establece comparación, estuvieron presentes dos fuentes de carbono, ácido láctico y glucosa. Entonces los cálculos anteriores se hicieron en relación a los dos carbohidratos. Cuando la fuente de carbono fue jugo de piña, se recuerda que además contenía fructosa. Pero como ese azúcar se consume igual que la glucosa, se supone que los rendimientos a partir de ella son los mismos que para glucosa, por lo que no se hace ninguna conside-



T i e m p o ( h )

FIG. XXV: Producción de vitamina B<sub>12</sub> (µg/l) Vs tiempo (h): ● medio con jugo de piña, ○ medio con glucosa.

FIG. XXVI: Productividad de vitamina B<sub>12</sub> (µg/l-h) Vs tiempo (h): ▲ medio con jugo de piña, Δ medio con glucosa.

FIG. XXVII: Producción específica de vitamina B<sub>12</sub> (µg/cél) Vs tiempo (h): ■ medio con jugo de piña, □ medio con glucosa.



TABLA XIV: VELOCIDADES VOLUMETRICAS Y ESPECIFICAS DE CONSUMO DE LA FUENTE DE CARBONO PARA P. shermanii (ATCC 13673) EN MEDIO DE GLUCOSA Y EN MEDIO CON JUGO DE PIÑA, RESPECTIVAMENTE.

TIEMPO (H)	VELOCIDADES VOLUMETRICAS (g l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )		VELOCIDADES ESPECIFICAS (g g cét <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	
	GLUCOSA	JUGO DE PIÑA	GLUCOSA	JUGO DE PIÑA
0- 23	0.65	0.57	0.29	0.25
23- 46	0.46	0.43	0.075	0.065
46- 69	0.52	0.16	0.13	0.018
69- 92	0.44	0.15	0.14	0.015
92-115	0	0.11	0	0.0095

TABLA XV: VELOCIDADES VOLUMETRICAS Y ESPECIFICAS DE CONSUMO DE NITROGENO PARA P. shermanii (ATCC 13673) EN MEDIO DE GLUCOSA Y EN MEDIO CON JUGO DE PIÑA, RESPECTIVAMENTE.

TIEMPO (H)	VELOCIDADES VOLUMETRICAS (g l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )		VELOCIDADES ESPECIFICAS (g g cél <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	
	GLUCOSA	JUGO DE PIÑA	GLUCOSA	JUGO DE PIÑA
0- 23	0.017	0.0090	0.0066	0.0039
23- 46	0.024	0.0025	0.0039	0.00038
46- 69	0.023	0.014	0.0057	0.0016
69- 92	0.019	0.0038	0.0060	0.00039
92-115	0.0013	0.0099	-0.00076	0.00085

ración particular al respecto.

Aunque con el uso de un medio con glucosa se obtuvieron mejores crecimientos bacterianos y más altas velocidades específicas de crecimiento y velocidades de consumo de sustratos, que cuando se empleo medio con jugo de piña, los valores de producción y productividad de vitamina B<sub>12</sub> fueron similares en ambos medios. Además las producciones específicas y los rendimientos celulares y de producción de vitamina B<sub>12</sub> en relación a la fuente de carbono, fueron superiores en medio con jugo de piña, lo cual indica que el microorganismo aprovecha más eficientemente los sustratos de este último.

La mayor simplicidad del medio formulado con glucosa permiten explicar con más facilidad el comportamiento de P. shermanii; por lo que se considera que un medio con este carbohidrato resulta más apropiado para observar el efecto que individualmente pudieran tener ciertos agentes precursores y/o factores de crecimiento. También con este medio se prueba el efecto del pH sobre el crecimiento bacteriano y/o la producción de cianocobalamina. Los resultados de estas investigaciones se detallan y discuten a continuación. Posteriormente se hace una comparación con los resultados en medio con jugo de

TABLA XVI: RENDIMIENTOS CELULARES Y DE PRODUCCION DE VITAMINA B<sub>12</sub> EN RELACION A LA FUENTE DE CARBONO, PARA UNA FERMENTACION EN MEDIO CON GLUCOSA Y PARA OTRA EN MEDIO CON JUGO DE PIÑA, CALCULADOS A LAS 92 HORAS - Y A LAS 115 HORAS, RESPECTIVAMENTE.

<u>TIEMPO</u> <u>92 HORAS</u>	Rendimientos celulares			Rendimientos de producto	
	<u>Glucosa</u>	<u>Jugo de Piña</u>		<u>Glucosa</u>	<u>Jugo de Piña</u>
<u>Y<sub>x/s</sub>:</u>			<u>Y<sub>p/s</sub>:</u>		
g cél/g glucosa	0.41	0.47	µg B <sub>12</sub> /g de glucosa	115.24	169.13
g cél/g láctico	0.05	0.059			
<u>TIEMPO</u> <u>115 HORAS</u>					
<u>Y<sub>x/s</sub>:</u>			<u>Y<sub>p/s</sub>:</u>		
g cél/g glucosa	0.37	0.49	µg B <sub>12</sub> /g de glucosa	128	238.98
g cél/g láctico	0.092	0.12			

piña.

#### 6.9 EFFECTO DE CONTROL DEL pH.

Una de las características más importantes de la propionibacterias es la de producir ácidos acético y propiónico (16). Se ha reportado que principalmente la acumulación de este último afecta negativamente la velocidad específica de crecimiento de P. shermanii, y el fenómeno es más destacado a pH inferiores a 6.8 (33) (Tabla XVII). En los experimentos realizados con este microorganismo, en los que se ajustó el pH cada 24 horas se registraron valores hasta de 5.3 (Fig. XV), debido a su crecimiento y a los productos generados por el catabolismo simultáneo de los sustratos.

Según las investigaciones de Nanba y colaboradores (33), el ácido propiónico ejerce un efecto más destacado que el ácido acético, pues inhibe en forma no competitiva el crecimiento de P. shermanii. Fundamentado en esa evidencia y con el interés de conocer los niveles de producción de propiónico en el medio de fermentación, se hicieron determinaciones cromatográficas en las cuales se detectó una cantidad máxima de 16 g/l de este ácido.

Se decidió entonces controlar más eficientemente el

TABLA XVII: EFECTOS DE LA CONCENTRACION DE ACIDO PROPIONICO Y DEL pH SOBRE LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DE P. shermanii A 30°C.

pH	Acido Propiónico		Velocidad específica de crecimiento ( $h^{-1}$ )
	Acido Total (m.mol/l)	No Disociado (m.mol/l)	
6.80	0.7	0.008	0.167
	20	0.23	0.136
	51	0.60	0.113
	92	1.10	0.099
	208	2.43	0.075
	316	3.69	0.061
	427	4.99	0.048
6.15	0.7	0.035	0.163
	20	0.98	0.101
	50	2.50	0.088
	105	5.18	0.064
	205	10.3	0.042
	340	17.1	0.023
5.20	0.7	0.22	0.152
	19	6.1	0.057
	28	9.0	0.023
	97	31.1	0.008
	275	88.0	0.0010

Fuente: Nanba, A., Nukada, R. & Nagari, S. (33).

pH en el rango de valores óptimos para el desarrollo del microorganismo, es decir, entre 6.5 y 7.5. Se empleó medio con glucosa y las mismas condiciones de fermentación especificadas en Materiales y Métodos. En un experimento se adicionó una sustancia amortiguadora, y en otro se hicieron ajustes de pH cada 12 horas.

6.9.1 Fermentación en la que se empleó una sustancia amortiguadora. En este experimento se añadió al medio de cultivo un regulador 0.1M de carbonato-bicarbonato de sodio. Se hicieron determinaciones de crecimiento bacteriano, de vitamina B<sub>12</sub>, de azúcares reductores y de ácido láctico, cada 23 horas.

En los resultados (Fig. XXVIII) se aprecia que el regulador controló el pH en las primeras 23 horas, durante las cuales el crecimiento bacteriano fue muy pobre, debido a la baja actividad metabólica, por lo que no hubo producción activa de ácidos. A partir de ese tiempo la presencia de carbonato-bicarbonato no alteró el crecimiento microbiano, la producción de vitamina B<sub>12</sub>, ni el consumo de la fuente de carbono, pues la fermentación presentó el comportamiento normal que se observó cuando se hizo el ajuste de pH cada 24 horas. Incluso se presentaron los cambios normales de este último parámetro.

El efecto nulo del regulador pudo deberse a que probablemente la cantidad añadida al medio de fermentación no fue suficiente como para contrarrestar la acción del ácido acético y del propiónico producidos a partir de las 23 horas.

Otra posibilidad es que el amortiguador no hiciera su efecto por tratarse de sistema biológico, en el que constantemente se producen muchas sustancias propias del metabolismo. La complejidad de esas sustancias y de las del medio de fermentación, así como las numerosas y variadas reacciones químicas que ocurren entre ellas (muchas irreversibles), contribuyen al establecimiento de un desequilibrio entre las formas oxidadas y las reducidas del sistema. En consecuencia, se origina una inestabilización del potencial de oxidorreducción. En este mismo sentido, una solución se considera que tiene buena capacidad amortiguadora en relación al potencial redox, cuando ella contiene solamente un sistema reversible, y a concentraciones suficientes de las formas oxidadas y reducidas, adquiere un valor estable de la actividad electrónica, y consecuentemente una estabilidad del potencial de oxidación (4).



6.9.2 Ajuste de pH cada 12 horas. Se llevó a cabo este experimento en las mismas condiciones usadas en la fermentación en la que se empleó carbonato-bicarbonato de sodio. La única variante fue que en vez de usar el amortiguador, se ajustó el pH cada 12 horas con hidróxido de sodio al 20%.

Los resultados de la Figura XXIX muestran que con este método se obtuvo un acortamiento del tiempo de fermentación, ya que la fuente de carbono se agotó a las 69 horas. Aunado a ésto se obtuvo el crecimiento bacteriano máximo igualmente a las 69 horas. Sin embargo, la producción de vitamina B<sub>12</sub> siguió en aumento hasta el quinto día, en donde se obtuvieron 7,600 µg/l. El hecho que continuara en aumento y que se obtuvieran valores más altos que en otras fermentaciones, conduce a pensar que la producción de ese metabolito guarda estrecha relación con el estado fisiológico en el que se encuentran las células. Si los ácidos del medio se han neutralizado en tiempos más cortos, significa que las enzimas responsables del crecimiento y la producción de vitamina, y que son dependientes del pH, se encuentran en mejores condiciones para llevar a cabo sus actividades.

Al establecer comparación entre los resultados en-

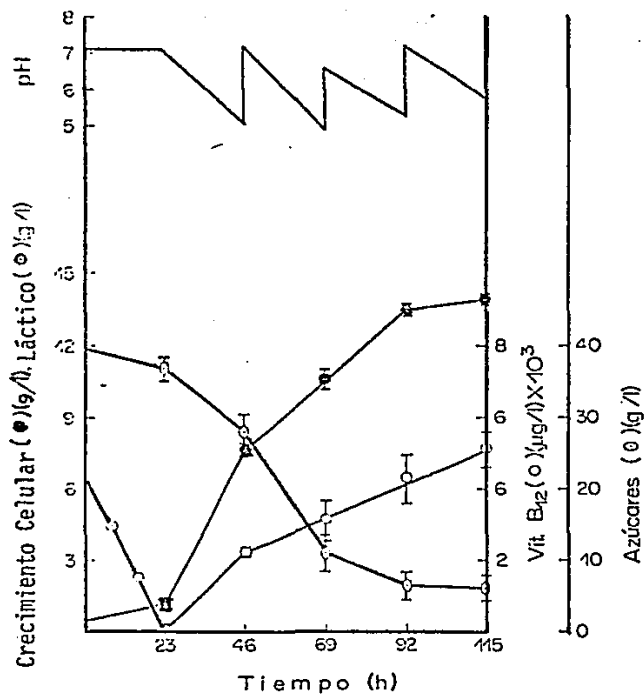


FIG. XXVIII: Curva concentración Vs. tiempo para *P. shermanii* en un medio con glucosa, empleando un amortiguador de carbonato-bicarbonato de sodio 0.1M.

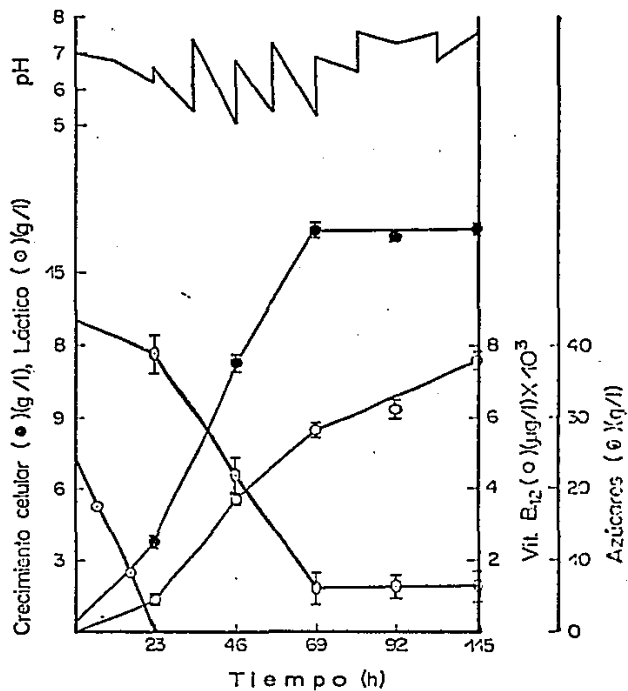


FIG. XXIX: Curva concentración Vs tiempo para *P. shermanii*, fermentación con glucosa en la que se ajusta el pH cada 12 horas.

contrados en esta fermentación y aquellos de una en la que se ajustó el pH cada 24 horas, y otra en la que se empleó amortiguador, se ve que las velocidades específicas de crecimiento (Fig. XXX) fueron más altas cuando se ajustó el pH cada 12 horas. Tal que a partir de las 69 horas los valores calculados fueron muy cercanos a cero, ya que se había alcanzado la fase estacionaria de crecimiento. Estos resultados están de acuerdo con lo que se esperaba, pues en estas condiciones el microorganismo permaneció por menos tiempo en medio acidificado.

También resulta interesante comparar los valores de las productividades para los tres experimentos, ya que proporcionan información acerca de la duración del proceso fermentativo. En el experimento al que se ajustó el pH cada 12 horas, se encontraron más altas productividades (Fig. XXXI), con un óptimo de  $82.11 \mu\text{g l}^{-1} \text{h}^{-1}$  al tercer día de fermentación, en relación a  $54.04 \mu\text{g l}^{-1} \text{h}^{-1}$  obtenidos cuando se ajustó el pH cada 24 horas, y  $49.59 \mu\text{g l}^{-1} \text{h}^{-1}$  cuando se empleó el amortiguador de carbonato-bicarbonato de sodio.

Igual que los casos antes comparados, cuando se calcularon las producciones específicas se encontró que para todos los tiempos los valores fueron más altos cuando

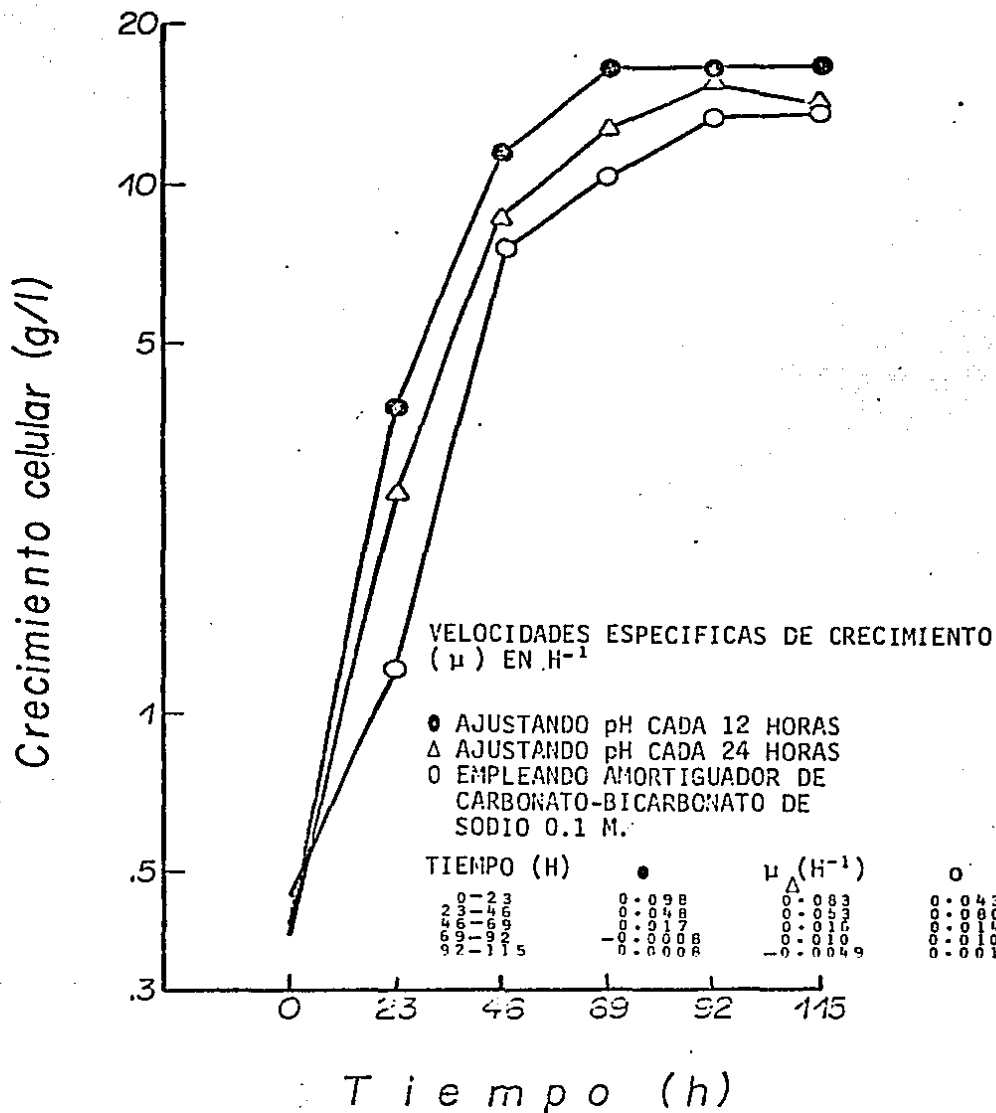


FIG. XXX: Crecimientos celulares y valores de velocidades específicas de crecimiento para P. shermanii, a tres condiciones de pH.

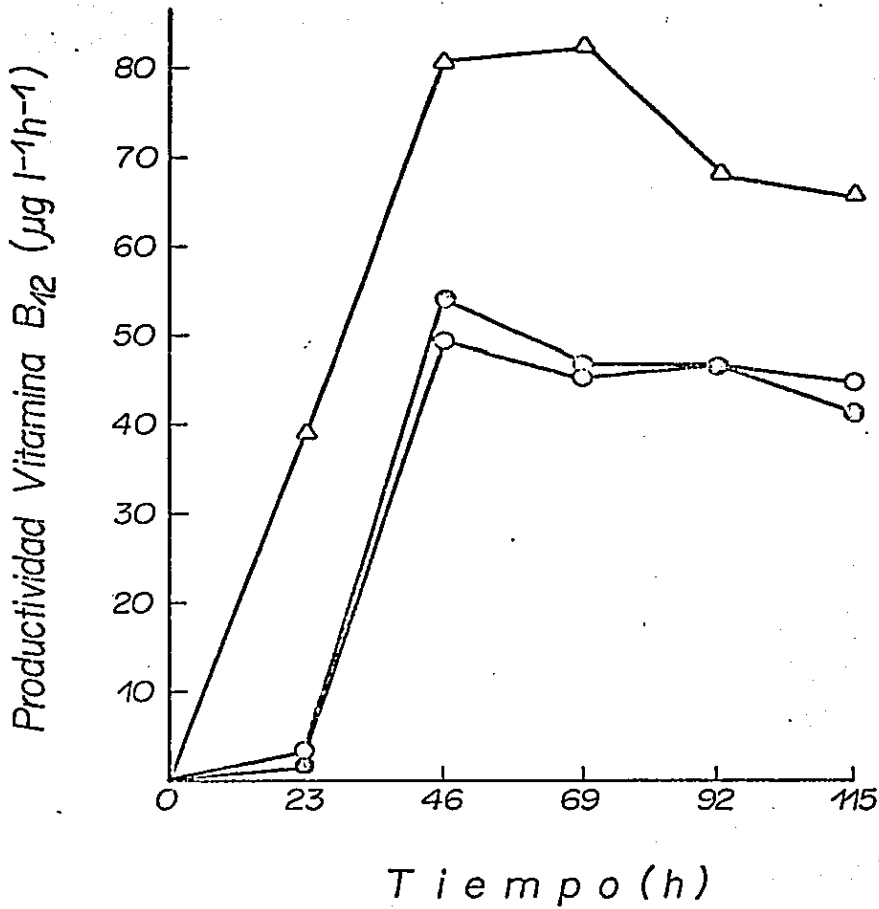


FIG. XXXI: Productividad de vitamina B<sub>12</sub> para P. shermanii a varias condiciones de pH:  
 $\Delta$  ajustado pH cada 12 horas  
 $\bullet$  con ajuste de pH cada 24 horas  
 $\circ$  empleo de amortiguador de carbonato-bicarbonato de sodio 0.1M

se ajustó el pH cada 12 horas, con un máximo de 450  $\mu\text{g/g}$  de cél, en relación a 367  $\mu\text{g/g}$  cél cuando se empleó el amortiguador de pH y 335  $\mu\text{g/g}$  de cél cuando se ajustó el pH cada 24 horas.

La metodología empleada tuvo la ventaja que con ella se mantuvo al microorganismo en condiciones más apropiadas para su desarrollo. Esto trajo como consecuencia que se registrara un acortamiento del tiempo de fermentación, y se obtuvieron más altas velocidades específicas de crecimiento, y más altas producciones, productividades y producciones específicas de vitamina B<sub>12</sub>. Debido a estos resultados, y a la utilidad que tiene para el buen funcionamiento de las actividades metabólicas de P. shermanii, se decidió ajustar el pH de todos los demás experimentos cada 12 horas.

#### 6.10 PRUEBA DE PRECURSORES Y/O FACTORES DE CRECIMIENTO

Para obtener mayor información sobre las necesidades nutricionales de P. shermanii y por el efecto que pudieran ejercer ciertos agentes sobre el crecimiento y/o la producción de vitamina B<sub>12</sub>, se realizaron experimentos en los que se probaron algunos compuestos. Como se mencionó en 1.3, los agentes considerados son: pantoteno de calcio, biotina, fosfato de piridoxal y betaína. También se incluyeron algunos aminoácidos, entre ellos metionina, treonina, alanina, valina, ácido glutámico, histidina y arginina.

Se decidió usar glucosa como la fuente de carbono para probar la acción de los agentes mencionados. Se consideró que con ese carbohidrato se podía formular un medio más sencillo que con jugo de piña, y por tanto, se evitaba hasta cierto punto el enmascaramiento de su efecto por la presencia de algún componente presente en el medio con jugo de piña. Además se consideró que sería más práctico usar este medio para relacionar los resultados obtenidos con los reportes encontrados en la literatura en los que se ha usado glucosa como fuente de carbono.

Los compuestos probados que tuvieran algún efecto positivo sobre el crecimiento de P. shermanii y/o la producción de cianocobalamina, con el uso de glucosa, serían probados simultáneamente en esa fuente de carbono, así como en medio con jugo de piña.

6.10.1 Pantotenato de calcio. Fundamentado en la importancia de este compuesto, como se destacó en 1.3.1, y en evidencias experimentales anteriores, en el sentido que el mismo estimuló el crecimiento y la producción de corrinoide, con el empleo de propionibacterias (50), se probaron varias concentraciones de pantotenato de calcio.

En investigaciones realizadas por Zodrow y sus colaboradores (50) en las que se emplearon 0.4, 4 y 10 mg/l de este compuesto, encontraron que todas las cantidades probadas ejercieron efecto estimuladorio. Por tanto, en estos experimentos se seleccionaron las concentraciones, en las que se tomó 10 mg/l como valor mínimo y 30 mg/l y 50 mg/l como valores opcionales por encima de esa concentración. Se probó además una concentración inferior a la tomada como referencia, que fue de 7 mg/l.

Por ser estimuladorio del crecimiento se adicionó al tiempo cero, y en cada fermentación se hicieron deter



minaciones de crecimiento bacteriano y de vitamina B<sub>12</sub> a las 115 horas.

Se encontró que el pantotenato de calcio ejerció efecto estimulador a todas las concentraciones empleadas (Fig. XXXII). El aumento máximo en el crecimiento fue de 17%, y en la producción de cianocobalamina del 22%, cuando se emplearon 10 mg/l de pantotenato de calcio, en relación con un experimento control al cual no se le hizo adición del compuesto. En concentración por encima de 10 mg/l se encontró una meseta en el incremento de los dos parámetros, lo cual indica que existe una concentración máxima de pantotenato de calcio por encima de la cual, si bien no hubo mayor efecto positivo, tampoco afectó negativamente las actividades normales del microorganismo.

También se analizaron los valores obtenidos de producciones específicas para todas las concentraciones empleadas de pantotenato de calcio. En todos los casos se obtuvieron valores mayores que el obtenido en el experimento control, con un incremento máximo de 5.3% cuando se usaron 10 mg/l del agente. Estos resultados indican que el efecto sobre la producción de vitamina B<sub>12</sub> en parte estuvo dado indirectamente por un estímulo en la masa

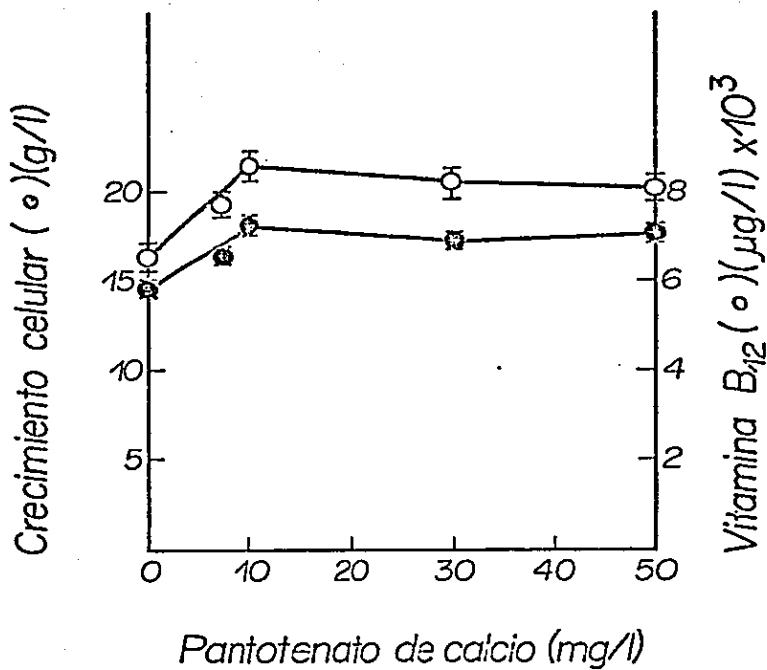


FIG. XXXII: Efecto del pantotenato de calcio sobre el crecimiento celular y - sobre la producción de vitamina B<sub>12</sub>, en un medio con glucosa.

celular.

6.10.2 Biotina. Como se mencionó antes (ver 1.3.2) esta vitamina interviene en varias reacciones propias del metabolismo en general. Con esa consideración y con el objetivo de saber el efecto sobre la producción de vitamina B<sub>12</sub> y sobre el crecimiento de P. shermanii, se realizaron varios experimentos en los que se emplearon tres concentraciones de biotina, 0.5, 1.0 y 1.5 mg/l. Se tomaron esas cantidades basado en las usadas por Zodrow (0.03, 0.3 y 1.0 mg/l) (50), en experimentos en los que investigó el efecto de esa vitamina con tres propionibacterias. Las adiciones se hicieron al tiempo cero, con la suposición de que el microorganismo la emplearía para su crecimiento.

En los resultados de crecimiento celular y producción de vitamina B<sub>12</sub>, para determinaciones realizadas al quinto día de fermentación (Fig. XXXIII) se aprecia un aumento de 8% en la producción de vitamina B<sub>12</sub> y de 8.8% en la masa celular. Probablemente el aumento no fue más significativo porque en el medio basal existía una cantidad de esa vitamina (proveniente del agua de cocimiento de maíz) que en alguna manera pudo satisfacer en parte la necesidad del microorganismo.

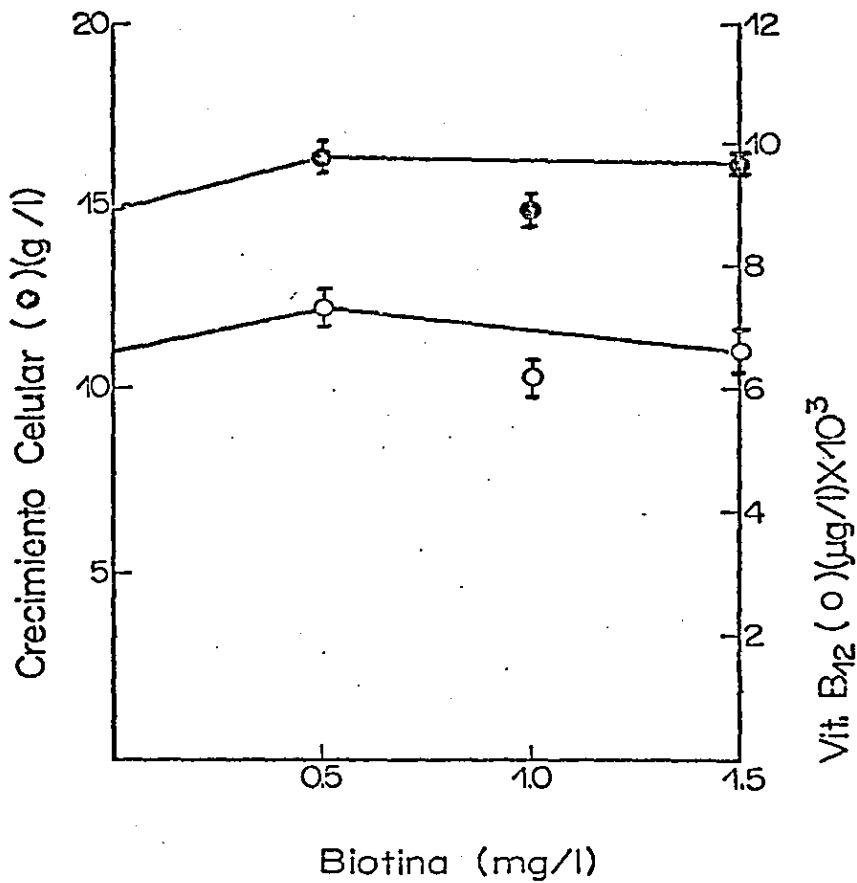


FIG. XXXIII: Efecto de la biotina sobre el crecimiento celular y sobre la producción de vitamina B<sub>12</sub>, en un medio con glucosa.

Los valores de producciones específicas de vitamina B<sub>12</sub> cuando al medio se adicionó 1 mg/l y 1.5 mg/l de biotina, respectivamente, fueron menores que el obtenido en el experimento control. Sin embargo, con 0,5 mg/l del agente se obtuvo una producción específica muy semejante a la del control, lo cual indica que el estímulo en la producción de vitamina B<sub>12</sub> fue más bien por un aumento en la masa celular.

6.10.3 Empleo de fosfato de piridoxal. Se planificaron varios experimentos en los que se probó la acción de este compuesto, por su importancia como factor de crecimiento para las bacterias. Además, se tomó en consideración que podía afectar positivamente la  $\delta$ -amino levulínico sintetasa, primera y más importante enzima de la ruta biosintética de la vitamina B<sub>12</sub>. Esta actividad enzimática cataliza la condensación de la glicina y el succinil-CoA para la formación de ácido  $\delta$ -aminolevulínico. Como se dijo antes (ver 1.3.3), el fosfato de piridoxal es agente cofactor en esa reacción.

Se probaron dos concentraciones del compuesto, 15 y 25 mg/l, respectivamente, en dos tiempos diferentes, 24 y 48 horas. Para la selección de esas cantidades, se tomó como referencia la composición de un medio (16) en

el que se adicionaron 20 mg/l de fosfato de piridoxal. Para los tiempos se consideraron los resultados en las mismas condiciones y en medio con glucosa (sin fosfato de piridoxal), en las que la producción de vitamina B<sub>12</sub> comenzó a ser sintetizada a partir de las 24 horas. Se realizaron determinaciones de crecimiento bacteriano y de cianocobalamina a las 115 horas de fermentación.

Las adiciones del compuesto realizadas a las 24 horas (Fig. XXXIV) muestran un incremento en la producción de vitamina del 32.78% cuando se añadieron 15 mg/l, y de 12.16% cuando la cantidad del agente fue de 25 mg/l. No se observó ningún efecto sobre el crecimiento bacteriano en relación al control. Los valores calculados de producciones específicas para las cantidades de fosfato de piridoxal adicionadas fueron de 26% para 15 mg/l y 14% para 25 mg/l, respectivamente, relacionado con el experimento sin adición del agente.

En la Fig. XXXV se observa un incremento del 32.13% en producción de cianocobalamina para 15 mg/l de fosfato de piridoxal, y de 10.56% para 25 mg/l, en adición hecha a las 48 horas. Igual que para el tratamiento a las 24 horas, no hubo efecto sobre el crecimiento de P. shermanii. Las producciones específicas fueron

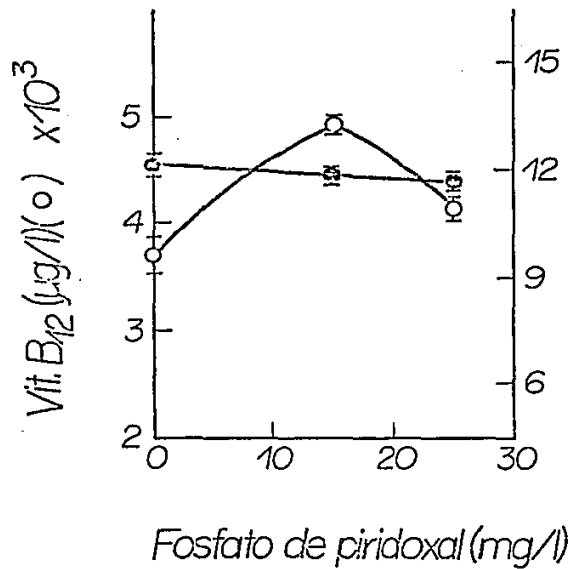


FIG. XXXIV. Curva de crecimiento celular (g/l) y de vitamina B<sub>12</sub> (μg/l) Vs concentración de fosfato de piridoxal (mg/l) adicionado a las 24 horas de fermentación.

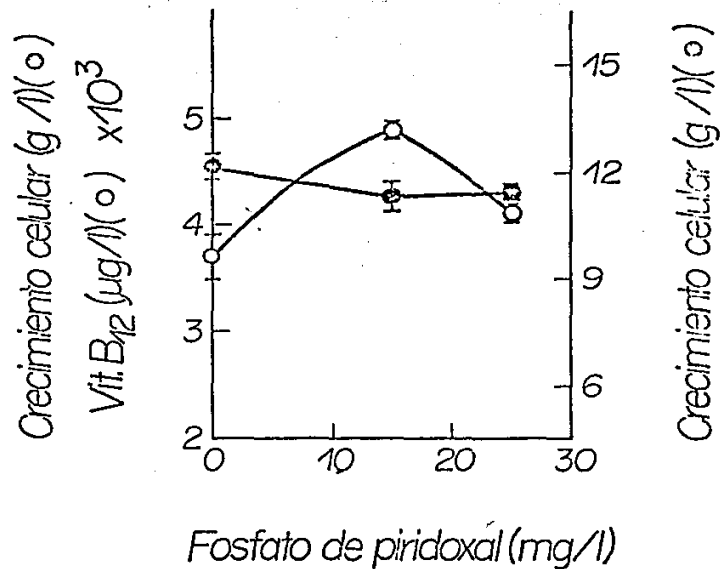


FIG. XXXV: Curva de crecimiento celular (g/l) y de vitamina B<sub>12</sub> (μg/l) Vs concentración de fosfato de piridoxal (mg/l) adicionado a las 48 horas de fermentación.

29% y 15% superiores a las encontradas en el experimento control, cuando se añadieron 15 mg/l y 25 mg/l, respectivamente, de fosfato de piridoxal.

Los incrementos en la cantidad de vitamina B<sub>12</sub> fueron muy diferentes si se habla en términos de las concentraciones de fosfato de piridoxal empleadas a un mismo tiempo. Este fenómeno indica que la acción estimuladora es altamente dependiente de la concentración que se use. También nos habla de que 15 mg/l es el punto intermedio por encima o por debajo del cual se encuentra la concentración que causa el máximo estímulo en la producción del metabolito, en las condiciones en que se llevaron a cabo estas fermentaciones.

Sin embargo, al analizar los resultados por tiempos de adición, se encontraron incrementos muy similares para las mismas concentraciones. Esto es una evidencia de que para los dos tiempos usados en estos experimentos, el compuesto es efectivo sin importar cual sea el tiempo en que se añada a la fermentación.

Dado que el fosfato de piridoxal solamente actuó en relación a la síntesis de vitamina B<sub>12</sub>, más no sobre el crecimiento de P. shermanii, se puede pensar que pro-



bablemente hubo un estímulo de la  $\delta$ -ALA sintetasa, como predijeron Perault y sus colaboradores ( 36 ).

#### 6.10.4 Fermentación en la que se adicionó betaína.

Aunque de hecho no se sabe cual es el verdadero efecto de la betaína sobre la producción de cianocobalamina, en fermentaciones en las que se empleó Pseudomonas denitrificans ( 8 ) y se adicionaron diferentes concentraciones de ésta, se encontraron aumentos importantes en las cantidades de vitamina B<sub>12</sub>. Se pensó entonces que en experimentos en los que se empleara Propionibacterium shermanii ocurriría el mismo fenómeno.

Para tener informaciones preliminares acerca de la acción de este agente con el uso de P. shermanii, y basado en los posibles modos en que puede afectar la producción de cianocobalamina, se realizaron experimentos en los que se adicionaron 10 y 20 g/l del compuesto, respectivamente. En investigaciones anteriores ( 8 ) se habían hecho adiciones de hasta 5 g/l, en las que se obtenía un aumento creciente en la producción de cianocobalamina, sin efecto sobre el crecimiento celular. Por lo tanto, en estos experimentos se seleccionaron dos cantidades arbitrarias por encima de 5 g/l. Las adiciones al medio de cultivo se hicieron al tiempo cero, y se hizo

además un experimento control sin adición del compuesto.

Se encontró (Fig. XXXVI) una disminución tanto en el crecimiento como en la producción de vitamina B<sub>12</sub>. Tal vez las concentraciones de betaína fueron muy altas, y en vez de estimular, ejercieron algún efecto regulatorio en el microorganismo, o posiblemente el tiempo cero no fue el más apropiado para las adiciones.

Se aprovechó esa información y se diseñaron nuevos experimentos, en los cuales se emplearon 5 y 10 g/l, a las 48 y a las 72 horas. Todos los experimentos se hicieron simultáneamente, y se empleó esta metodología porque mediante ella se puede realizar mayor cantidad de experimentos en menos tiempo, y porque facilita el manejo de los resultados desde el punto de vista de su interpretación. En este sentido cabe mencionar que cuando se trabaja con sistemas biológicos, y además con medios de cultivo complejos (como en este caso), resulta difícil interpretar los datos de experimentos realizados en tiempos diferentes, y en los cuales intervienen muchos factores. Estos afectan de alguna manera el comportamiento de todo el sistema, y en ciertos momentos se hace imposible dilucidar la verdadera causa por lo que ocurren algunos fenómenos en una fermentación.

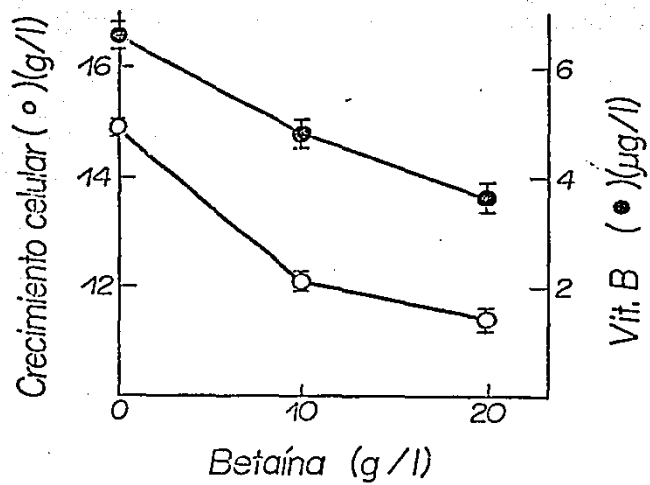


FIG. XXXVI: Determinaciones de crecimiento bacteriano y de vitamina B<sub>12</sub> al quinto día de fermentación. En los experimentos se adicionan 10 y 20 g/l de betaína, respectivamente, a la cero hora de fermentación.

En los resultados de las Figuras XXXVII y XXXVIII se puede ver que cuando se establece relación con el experimento control, prácticamente la producción de cianocobalamina se mantuvo constante para los dos experimentos. En cuanto a los crecimientos celulares hubo un incremento del 5.6% cuando se adicionaron 5 g/l a las 48 horas y de 6.8% cuando la misma concentración se adicionó a las 72 horas; pero se observó una caída del mismo cuando se adicionaron 10 g/l de betaína en los dos tiempos de adición. Al calcular los valores de producciones específicas, para la mayoría de las concentraciones y tiempo de adición del compuesto se encontraron valores más bajos que el calculado para el experimento control. En cambio para 10 g/l adicionado a las 48 horas y para la misma concentración adicionada a las 72 horas se encontraron incrementos del 15% y del 7%, respectivamente. Dichos incrementos se presentaron como consecuencia de una bajada en el crecimiento celular y valores casi constantes de la producción de vitamina B<sub>12</sub>, más no por un incremento directo en la biosíntesis de este metabolito. En consecuencia, no se tomó en cuenta la betaína para su adición al medio en el que se adicionan todos los efectores positivos.

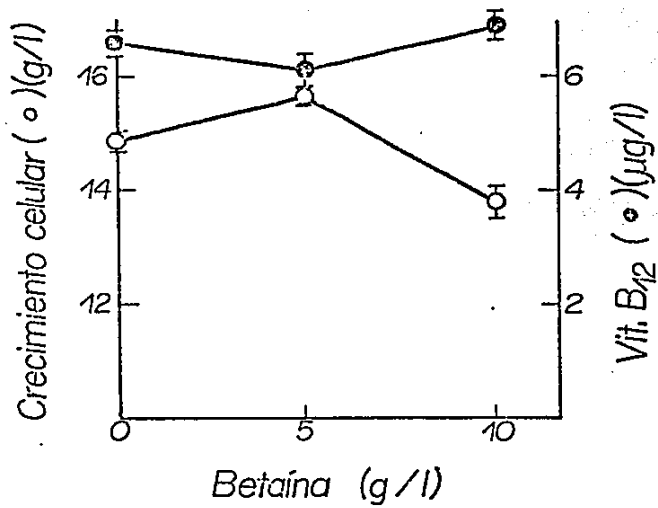


FIG. XXXVII: Efecto de la adición de dos concentraciones de betaína, 5 g/l y 10 g/l, cuando se añade el compuesto a las 48 horas de fermentación.

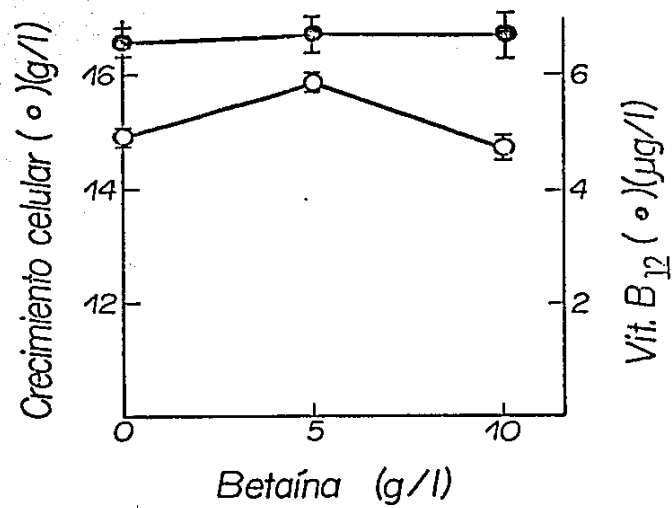
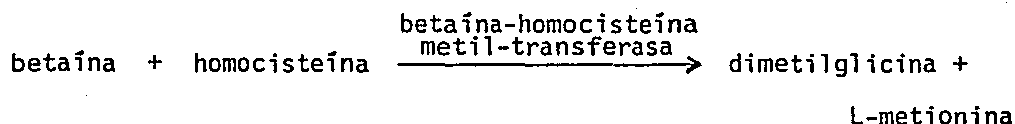


FIG. XXXVIII: Determinaciones de crecimiento bacteriano y de vitamina B<sub>12</sub> - al quinto día de fermentación. En los experimentos se adicionan 5 y 10 g/l de betaína, respectivamente, a las 72 horas.

Estos resultados pueden guardar cierta relación con el hecho de que P. shermanii no excreta vitamina B<sub>12</sub> a su medio exterior (11). Conociendo ese antecedente se puede suponer que el microorganismo tan sólo sintetiza la vitamina necesaria para su funcionamiento normal, y probablemente a partir de la cantidad de la que precisa, la vitamina ejerza algún mecanismo regulatorio sobre su propia síntesis. En el caso de Pseudomonas denitrificans, microorganismo con el que se han hecho la mayoría de las pruebas con betaína, es importante decir que es capaz de producir cianocobalamina extracelularmente (B.D. Lago, Comunicación Personal). Por tanto si la betaína estimula la producción de vitamina B<sub>12</sub>, se supone que es más probable que se pueda ver el efecto en un microorganismo que tiene facilidad de excretarla al medio de fermentación.

Ahora bien, bajo el supuesto que la betaína done grupos metilos a la molécula de vitamina, otro fenómeno que pudo haber pasado es que como en el medio de fermentación hubo una cantidad basal de metionina (proveniente del agua de cocimiento de maíz), la betaína no fuera necesaria para que se llevara a cabo ese proceso. La metionina es considerada como la donadora normal de grupos meti

los de la molécula de vitamina B<sub>12</sub>, como se dijo antes (ver 1.3.5). Esto es, el microorganismo disponía de una fuente de donde obtener más fácilmente los grupos metilo que necesitaba. En el caso que fuera a obtenerlos de la betaína, primero tenía que haber ocurrido la siguiente reacción (32).



Esto significa que el microorganismo pudo haberse ahorrado el paso de conversión de betaína a metionina, si ésta última estaba presente en el medio.

6.10.5 Efecto de aminoácidos adicionados al tiempo cero: Acido glutámico, metionina y treonina. Se sabe que el agua de cocimiento de maíz es una fuente muy compleja, que además de nitrógeno orgánico como aminoácidos libres y péptidos contiene ácido láctico, vitaminas, minerales y otros agentes. Se sabe además que P. shermanii solamente aprovecha los aminoácidos libres para integrar

a su metabolismo (43.), tal vez no posee las proteasas necesarias para consumir nitrógeno proteico.

Con los antecedentes mencionados, y con el conocimiento que el contenido de aminoácidos en las diferentes agua de cocimiento de maíz presenta muchas variaciones (éstas dependen de la procedencia, calidad de la tierra, proceso del maíz, etc.), se planteó probar el efecto de algunos aminoácidos. Antes de seleccionar los que serían adicionados al medio de fermentación, se analizaron dos lotes de agua de cocimiento de maíz (ACM-010 y ACM-012), para establecer comparación en el contenido de aminoácidos, y para poder seleccionar apropiadamente los mismos.

En la Tabla XVIII se puede ver que la concentración de aminoácidos en el lote ACM-012 es más bajo que la del lote ACM-010 en todos los casos. Además, se obtuvieron diferencias muy notorias en los valores de crecimiento celular y producción de vitamina B<sub>12</sub> para dos fermentaciones realizadas con estos dos lotes de agua de cocimiento de maíz. Basado en estos resultados se escogieron el ácido glutámico, histidina y alanina, porque la diferencia de sus cantidades en los dos lotes analizados era muy notoria. Se supuso que su adición al medio de



TABLA XVIII: COMPOSICION EN AMINOACIDOS DEL AGUA DE COCINO DE MAIZ EN mg/g DE MUESTRA SECA.

	ACM - 010	ACM - 012
Acido aspártido	16.2	8.86
Serina	8.25	4.31
Prolina	29.63	15.81
Cisteína	6.45	2.34
Isoleucina	9.03	8.76
Leucina	27.12	13.90
Tirosina	7.46	4.45
Lisina	11.9	4.54
Arginina	7.25	4.94
Fenilalanina	11.14	7.41
Glicina	16.31	10.79
Acido glutámico	56.54	15.40
Histidina	10.45	3.30
Metionina	8.24	7.72
Treonina	9.5	9.10
Alanina	30.73	11.28
Valina	17.40	14.39

cultivo, compensaría la deficiencia natural del agua de cocimiento de maíz empleada (ACM-012). Otro factor importante tomado en cuenta fue la disponibilidad de esos aminoácidos en el laboratorio a la fecha de hacer la investigación. Para los casos de prolina y leucina en que también se encontraron diferencias muy altas no fue posible probar su efecto porque no estuvieron disponibles.

También se eligieron valina y arginina porque los niveles encontrados en los dos lotes fueron muy parecidos, en contraposición con los casos anteriores. Se asumió que si estos aminoácidos se encontraban en los niveles requeridos por el microorganismo en el agua de cocimiento de maíz, la suplementación del medio basal con una determinada concentración de ellos, no tendría ningún efecto sobre el crecimiento bacteriano.

Además se seleccionaron metionina y treonina por su particular importancia como precursoras de la molécula de vitamina B<sub>12</sub>, como se destacó antes (ver 1.3.5 y 1.3.6).

Apoyado en experimentos precedentes realizados por Marwaha y sus colaboradores ( 31 ), en los que adicionaron varios aminoácidos en concentración de 0.5 g/l, en estas fermentaciones también se usaron 0.5 g/l de cada

uno de los planteados para probar su efecto.

En experimentos preliminares se adicionaron ácido glutámico, metionina y treonina individualmente, con sus respectivos controles. Se hizo la adición al tiempo cero, con la suposición de que serían usados por el microorganismo a partir del momento en que se encontrara en su fase exponencial de crecimiento, es decir, en las primeras 48 horas.

El objetivo específico de adicionar estos aminoácidos al medio era ver como se afectaba el crecimiento de P. shermanii por la presencia de esos durante las primeras 72 horas de fermentación. Por tanto, se siguió la determinación de crecimiento bacteriano cada 12 horas durante ese período de tiempo. Se hizo el mismo seguimiento a los experimentos de control (sin adición de aminoácidos).

De acuerdo a los resultados (Figuras XXXIX: A, B y C) hubo una disminución en el crecimiento celular, comparado con los valores encontrados en el experimento control. Estos datos sugieren la posibilidad de que los aminoácidos de estas pruebas ejercieran algún mecanismo regulatorio, debido a que su adición al tiempo cero im-

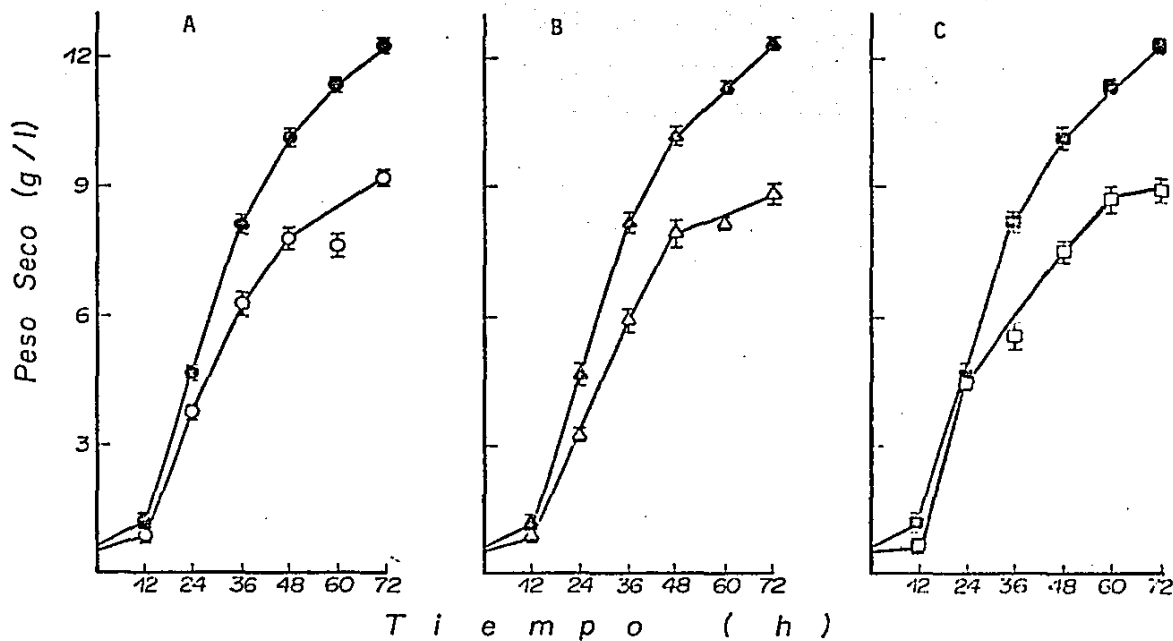


FIG. XXXIX: Curvas de crecimiento celular (g/l) en función de tiempo, para experimento en los que se adicionan 0.5 g/l de ácido glutámico (A) (o); 0.5 g/l de metionina (B) ( $\Delta$ ) y 0.5 g/l de treonina (C) ( $\square$ ), respectivamente a la cero hora de fermentación. Para cada prueba se presentan los resultados del control correspondiente (●, ▲ y ■).

plicaba que se encontraban en exceso para el microorganismo. Su efecto pudo ser por un impedimento en la formación de la proteína de translocación necesaria para que el aminoácido entrara al microorganismo.

La disminución en el crecimiento también pudo deberse a la posible existencia en P. shermanii de un sistema de permeasa común para varios aminoácidos, como suele suceder en otros microorganismos, por ejemplo E. coli K12 (35). En este caso, la presencia en cantidades que resultasen regulatorias para la permeasa de entrada de un aminoácido, traería como consecuencia el impedimento de la entrada de otros aminoácidos, necesarios para que se llevaran a cabo ciertas funciones metabólicas relacionadas con el crecimiento de P. shermanii.

6.10.6 Adición de Aminoácidos (0.5 g/l) a las 36 horas de fermentación. Fundamentado en los resultados obtenidos mediante la adición de ácido glutámico, metionina y treonina al tiempo cero, se decidió realizar otros experimentos en las mismas condiciones. Se varió solamente el tiempo de adición de los aminoácidos, esta vez a las 36 horas. Se parte de la base que, si mediante la adición al tiempo cero existía algún efecto regulatorio como consecuencia de un exceso en la cantidad de

ellos, a las 36 horas probablemente el microorganismo ya no estaba sujeto a tal efecto.

También se consideró que si el aminoácido de prueba contribuía a mantener un buen crecimiento de P. shermanii, su adición a las 36 horas resultaba ideal para observar el efecto, ya que en las primeras 48 horas es cuando el microorganismo tiene sus más altas velocidades específicas de crecimiento; en las condiciones en las que se realizaron estos experimentos.

Además de los aminoácidos mencionados, se hicieron fermentaciones individuales con adición de histidina, alanina, arginina y valina (con su respectivo control) adicionados igualmente a las 36 horas.

En los resultados (Fig. XL) se aprecia un efecto estimulatorio en el crecimiento del microorganismo, cuando se empleó ácido glutámico, metionina e histidina. Tales aumentos no sólo se justifican por la importancia bioquímica que esos tienen en relación a las actividades metabólicas en general. Además, resultan estimulatorios por que cubre la deficiencia de esos aminoácidos en el agua de cocimiento de maíz empleada en la realización de estas pruebas.

Por los resultados obtenidos con ácido glutámico, metionina e histidina, podría suponerse que estos tres aminoácidos sean esenciales para el desarrollo de P. shermanii.

Al comparar los resultados encontrados con los otros aminoácidos (alanina, arginina, valina y treonina), en relación a los experimentos sin adición, no se encontró ningún efecto por ellos. Tampoco fueron perjudiciales, pues como se observa en la Figura XL los crecimientos registrados fueron muy similares a los respectivos controles. La ausencia de efecto pudo deberse a que tal vez en P. shermanii es más difícil el transporte de estos aminoácidos hacia su interior, no así para aquellos que lo afectaron positivamente. De hecho no se tiene ningún conocimiento acerca del transporte de aminoácidos en ese microorganismo. Ahora bien, el fenómeno no es extraño, pues como se dijo antes esos compuestos son benéficos, más no esenciales para las propionibacterias ya que éstas tienen la capacidad de sintetizar algunos de ellos (48). Probablemente la alanina, arginina, valina y treonina formen parte de los que puede sintetizar, por lo que no es preciso adicionarlos al medio de fermentación. Otra alternativa es que posiblemente, las cantidades de esos aminoácidos en el agua de cocimiento de maíz

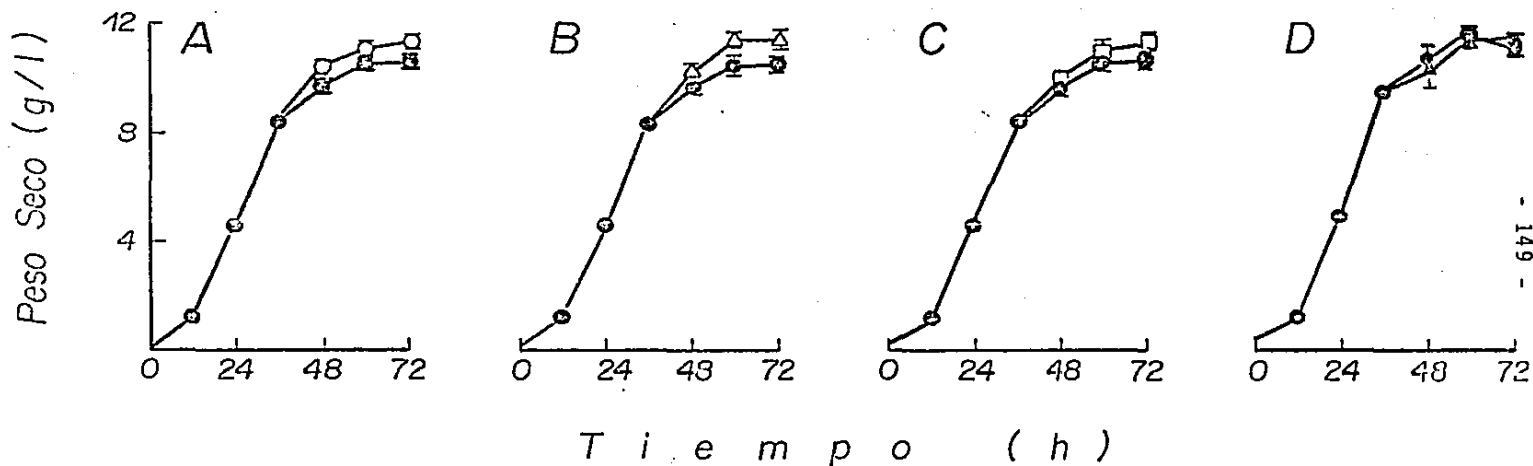


FIG. XL: Crecimientos celulares Vs tiempo, para experimentos individuales en los que se adicionan 0.5 g/l de: ácido glutámico (A) (○), metionina (B) (Δ), treonina (C) (□) y alanina (D) (Δ), respectivamente. La adición se hace a las 36 horas y en cada experimento se presentan los resultados del control correspondiente (●).



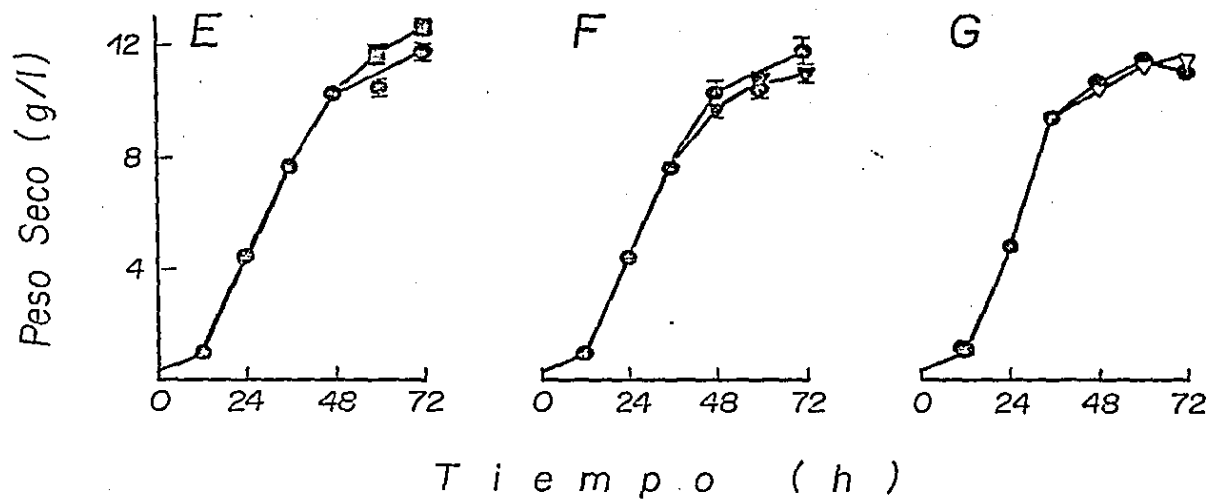


FIG. XL: Crecimientos celulares en función de tiempo, para experimentos individuales en los que se adicionan 0.5 g/l - de: histidina (E) (◻), arginina (F) (▼), y valina (G) (▽), respectivamente. La adición se hace a las 36 horas y en cada experimento se presentan los resultados - del control correspondiente (●).

fueron suficientes para satisfacer las necesidades del microorganismo.

Aunque en estos experimentos no se cuantificó la cantidad de vitamina B<sub>12</sub> sintetizada, se supone que un aumento en la cantidad de masa celular posiblemente se reflejó positivamente en la producción de cianocobalamina. También pudo suceder que su síntesis se viera afectada directa y positivamente por los aminoácidos que incrementaron el crecimiento.

#### 6.11 PRUEBA INTEGRAL DE PRECURSORES Y/O FACTORES DE CRECIMIENTO.

##### 6.11.1 En medio con glucosa.

##### 6.11.2 En medio con jugo de piña.

Como se mencionó antes (ver 6.10), otro de los propósitos de este trabajo, es probar en forma integral todos los precursores y/o factores de crecimiento que tuvieran efecto positivo sobre el crecimiento de P. shermanii y/o la producción de vitamina B<sub>12</sub>. Al igual que en los experimentos anteriores, primero se realizó la prueba en medio con glucosa y posteriormente en medio con jugo de piña.

En la Tabla XIX se pueden observar los agentes que fueron probados individualmente y que tuvieron un efecto positivo sobre los parámetros antes citados. También se reporta la concentración y tiempo de adición en que ejercieron su efecto.

#### 6.11.1 Empleo de glucosa como fuente de carbono.

Se hizo una fermentación en un medio formulado con este carbohidrato, en la que se adicionaron los precursores en las concentraciones y tiempos mencionados. Simultáneamente se realizó un experimento control sin adicionar ninguno de los agentes, con el propósito de tener parámetros de comparación con el experimento de adición.

Se determinó crecimiento bacteriano cada 24 horas, y vitamina B<sub>12</sub> a partir de las 72 horas. Los resultados (Fig. XLI) muestran que para todos los casos los crecimientos fueron más altos en el experimento en el que se adicionaron los agentes de prueba. La cantidad máxima en la que se aumentó ese parámetro fue de 22.5% al quinto día de fermentación. El mismo efecto se vió reflejado en la producción de cianocobalamina, y ésta se aumentó en un 19.8%, máxima al cuarto día.

En base a los porcentajes en los que se incrementó

TABLA XIX: PRECURSORES Y/O FACTORES DE CRECIMIENTO QUE AFECTARON POSITIVAMENTE EL CRECIMIENTO DE P. shermanii Y/O LA PRODUCCION DE CIANOCOBALAMINA.

Precursor	Tiempo de adición (h)	Concentración	CreCIMIENTO <u>P. shermanii</u>	Producción Vitamina B <sub>12</sub>
Pantotenato de Calcio	0	10 mg/l	+	+
Biotina	0	0.5 mg/l	+	+
Fosfato de Piridoxal	24 ó 48	15 mg/l	S.E.	+
Acido glutámico	36	0.5 g/l	+	N.D.
Metionina	36	0.5 g/l	+	N.D.
Histidina	36	0.5 g/l	+	N.D.

S.E.: Sin efecto.

N.D.: No determinado.

el crecimiento bacteriano, y aquellos en los que se vió aumentada la producción de vitamina B<sub>12</sub> (Tabla XX), se puede decir que los agentes adicionados afectaron más bien el crecimiento microbiano. Se piensa que hubo un aumento en la cantidad de cianocobalamina porque hubo mayor cantidad de masa celular, más no porque los precursores per se hayan afectado directamente su producción. Esta suposición se refuerza más con el hecho que las producciones específicas (Fig. XLI) son muy parecidas para los dos experimentos, incluso ligeramente mayores para aquel en el que no se hizo ninguna adición. Si realmente hubiera habido un efecto sobre la producción de vitamina B<sub>12</sub>, entonces se habrían encontrado producciones específicas significativamente mayores que las halladas en el experimento control.

Dado que las producciones de cianocobalamina se vieron aumentadas en todos los tiempos en que se hicieron cuantificaciones de ésa, las productividades se vieron igualmente afectadas en favor del experimento con adición de precursores (Fig. XLI).

Las determinaciones de velocidades específicas de crecimiento para los dos experimentos (Fig. XLII), muestran muy poca diferencia en ese parámetro en las prime-

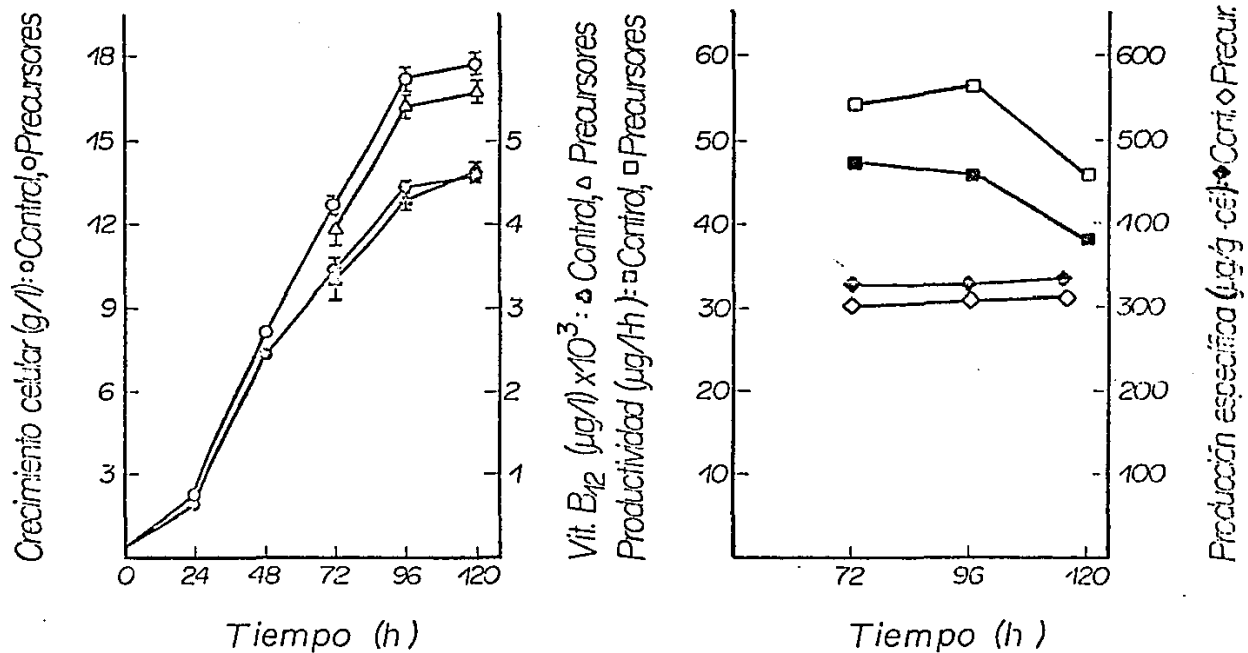


FIG. XLI: Curvas de crecimiento celular (g/l), producción (µg/l), productividad (µg/l-h) y producción específica de vitamina B<sub>12</sub> (µg/g cél) Vs tiempo. En la fermentación se adicionan todos los compuestos reportados en la Tabla XIX, a los tiempos y concentraciones especificados. También se presentan los resultados correspondientes a un experimento control realizado en las mismas condiciones, pero sin adición de los agentes. Se usó glucosa como fuente de carbono.

TABLA XX: INCREMENTOS EN EL CRECIMIENTO CELULAR Y EN LA PRODUCCION DE CIANOCOBALAMINA, CON LA ADICION DE PRECURSORES Y/O FACTORES DE CRECIMIENTO EN UN MEDIO CON GLUCOSA.

Tiempo de Cuantificación (h)	% de incremento en el crecimiento celular	% de incremento en la producción de Vitamina B <sub>12</sub>
72	17.20	12.5
96	22	19.8
120	22.5	17

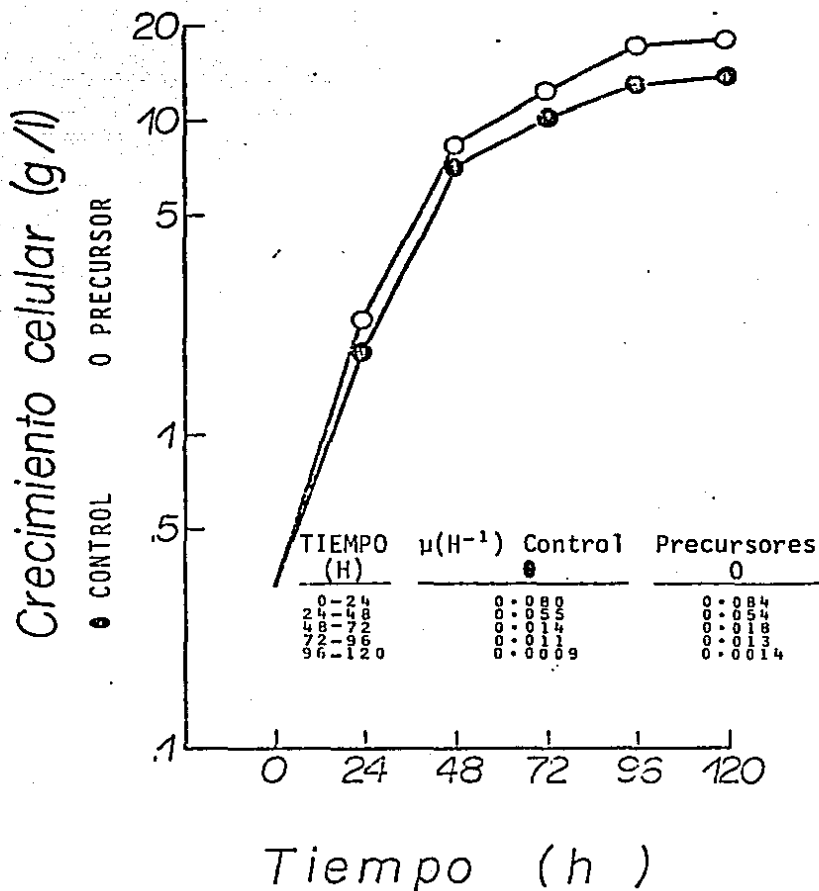


FIG. XLII: Curva de crecimiento y valores de velocidades específicas de crecimiento expresadas en  $h^{-1}$ , de una fermentación en la que se adicionaron todos los agentes precursoros y/o factores de crecimiento descritos en la Tabla XIX, comparados con los de un experimento control - en el que no se hizo ninguna adición. Se empleó glucosa como fuente de carbono.



ras 48 horas. Los cambios son ligeramente más notorios a partir de ese período, por lo cual se sugiere que después de ese tiempo fue cuando los agentes probados afectaron mayormente el metabolismo de P. shermanii. Aunque algunos compuestos como el pantotenato de calcio y la biotina se supone que actuaron desde las primeras horas de la fermentación, durante esas el efecto no fue tan marcado en parte por la poca cantidad de masa celular existente.

De los agentes adicionados individualmente, el pantotenato de calcio fue el mejor efector sobre el crecimiento bacteriano. Con éste se obtuvo un aumento del 17% (Fig. XXXII). Si se compara este porcentaje con el obtenido en este experimento, en que se adicionaron todos los efectores positivos (22.5%), se puede decir que la acción entre ellos se vió ligeramente potenciada en relación a esa determinación. Sin embargo, no se puede decir lo mismo en relación a la producción de cianocobalamina. Para este caso, el compuesto con el que se obtuvo un aumento máximo en vitamina B<sub>12</sub> fue con fosfato de piridoxal (32.78%, Fig. XXXVII). En cambio, el porcentaje en que se vió aumentada su producción en este experimento fue en 19.8%. Estas diferencias hacen suponer que

para estas pruebas la acción del fosfato de piridoxal se vió enmascarada por la presencia de algún otro componente del medio. Este hecho confirma la suposición anterior en el sentido que el aumento en la producción del metabolito de interés se debió más a un aumento en la ma sa celular, que a un efecto en la producción de vitamina per se.

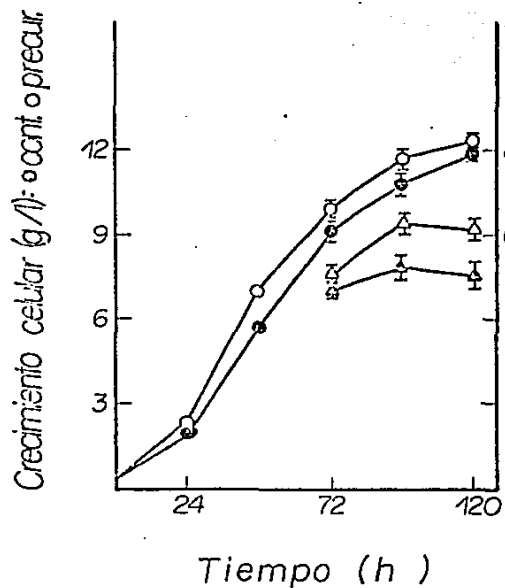
6.11.2 Empleo de jugo de piña como fuente de carbono. Se recuerda que uno de los fines de adicionar ciertos agentes precursores y/o factores de crecimiento al medio de fermentación es, en parte, conocer algunas de las necesidades nutricionales de P. shermanii. También se persigue estudiar como se afecta el crecimiento celular y la producción de cianocobalamina, con el uso de una fuente de carbono no convencional, que para este caso se trata de jugo de piña.

Al igual que los experimentos descritos antes, se hicieron dos fermentaciones con esta fuente de carbono. En una de ellas se adicionaron todos los agentes que dieron efecto positivo con el uso de glucosa (Tabla XIX). En la otra no se hizo ninguna adición, por lo que fue tomada como control de comparación.

Las determinaciones de crecimiento bacteriano cada 24 horas, cuyos resultados se reportan en la Fig. XLIII reflejan aumentos muy pequeños en todos los tiempos en que se hizo la cuantificación. El valor máximo encontrado en relación al control fue de 7.44% al tercer día de fermentación (Tabla XXI). En cambio, hubo un incremento máximo en la producción de vitamina B<sub>12</sub> de 17.60% al quinto día de fermentación.

De acuerdo a los resultados de la Tabla XXI, los compuestos adicionados al medio afectaron principalmente la producción de vitamina B<sub>12</sub>. El efecto encontrado se diferenciò en parte del que se observó cuando se usó glu cosa como fuente de carbono. La explicación del fenómeno podría estar dada en que, posiblemente la producción de cianocobalamina estuvo afectada por algún componente presente en el medio con jugo de piña. Tal vez la acción de ese compuesto se vió reforzada por la presencia de los agentes adicionados al medio de fermentación.

Los valores calculados de productividades y producciones específicas del experimento con adición (Fig. XLIII), son superiores a los hallados en el experimento control. Este hecho no es más que el resultado de los incrementos en la producción de vitamina B<sub>12</sub>.



Vit. B<sub>12</sub> (μg/l) x 10 : ▲ cont. △ precur.  
 Productividad (μg/l-h) : ◻ cont. ◻ precur.

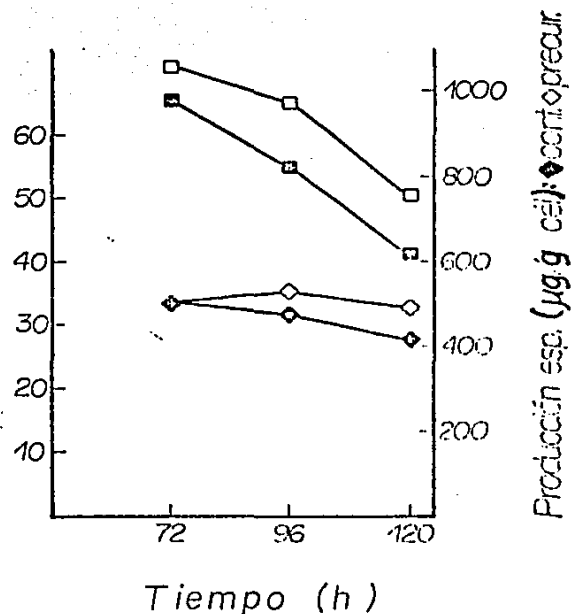


FIG. XLIII: Curvas de crecimiento celular (g/l), producción (μg/l), productividad (μg/l-h) y producción específica de vitamina B<sub>12</sub> (μg/g cél) Vs tiempo, para una fermentación en la que se adicionan todos los agentes precursores y/o factores de crecimiento que se reportan en la Tabla XIX. Los resultados se comparan con los de un control al que no se hizo ninguna adición, y ambos experimentos fueron realizados en medio con jugo de piña.

TABLA XXI: INCREMENTOS EN EL CRECIMIENTO BACTERIANO Y EN LA PRODUCCION DE CIANOCOBALAMINA, CON LA ADICION DE PRECURSORES Y/O FACTORES DE CRECIMIENTO EN UN MEDIO CON JUGO DE PIÑA.

Tiempo de cuantificación (h)	% de incremento en el crecimiento bacteriano	% de incremento en la producción de Vitamina B <sub>12</sub>
72	7.44	6.46
96	7.25	16.20
120	3.7	17.60

También se hicieron los cálculos correspondientes a velocidades específicas de crecimiento (Fig. XLIV), y al igual que en el caso antes descrito, no se encontraron diferencias notorias con las del control.

En estos experimentos las velocidades específicas de crecimiento y las masas celulares cuantificadas fueron menores que las encontradas cuando se usó glucosa como la fuente de carbono, ya se haga comparación entre los controles de ambas pruebas, o ya se haga entre las fermentaciones con adición de agentes precursores. Sin embargo, los valores máximos de producciones, productividades y producciones específicas cuando se empleó medio con jugo de piña, fueron superiores a los encontrados en medio con glucosa. Esto es, 28, 28 y 36%, respectivamente, al hacer la comparación entre los controles; y 23, 23 y 41% cuando se compararon los experimentos con adición. Estos resultados son evidencias claras de que el jugo de piña compite ventajosamente con una fuente de carbono convencional, que para el caso se trata de glucosa, y por tanto puede ser usado como carbohidrato en procesos fermentativos.

En términos generales, los agentes que afectaron positivamente el crecimiento de P. shermanii y/o la pro-

También se hicieron los cálculos correspondientes a velocidades específicas de crecimiento (Fig. XLIV), y al igual que en el caso antes descrito, no se encontraron diferencias notorias con las del control.

En estos experimentos las velocidades específicas de crecimiento y las masas celulares cuantificadas fueron menores que las encontradas cuando se usó glucosa como la fuente de carbono, ya se haga comparación entre los controles de ambas pruebas, o ya se haga entre las fermentaciones con adición de agentes precursores. Sin embargo, los valores máximos de producciones, productividades y producciones específicas cuando se empleó medio con jugo de piña, fueron superiores a los encontrados en medio con glucosa. Esto es, 28, 28 y 36%, respectivamente, al hacer la comparación entre los controles; y 23, 23 y 41% cuando se compararon los experimentos con adición. Estos resultados son evidencias claras de que el jugo de piña compite ventajosamente con una fuente de carbono convencional, que para el caso se trata de glucosa, y por tanto puede ser usado como carbohidrato en procesos fermentativos.

En términos generales, los agentes que afectaron positivamente el crecimiento de P. shermanii y/o la pro-

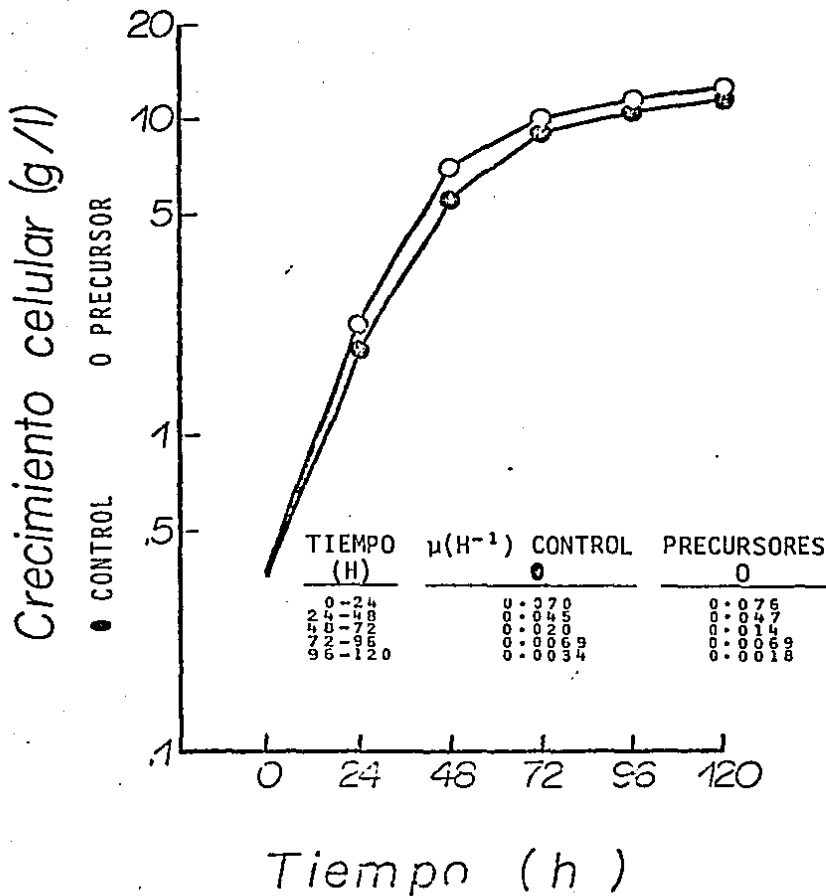


FIG. XLIV: Curva de crecimiento y valores de velocidades específicas de crecimiento expresadas en h<sup>-1</sup>, de una fermentación en la que se adicionaron todos los agentes precursores y/o factores de crecimiento descritos en la Tabla XIX, comparados con los de un experimento control en el que no se hizo ninguna adición. Se empleó jugo de piña como fuente de carbono.



ducción de cianocobalamina, se pueden considerar como factores nutricionales para este microorganismo. Pero la mayoría de esos compuestos (biotina, ácido pantoténico, ácido glutámico, metionina e histidina) forman parte del medio basal, específicamente del agua de cocimiento de maíz. Por tanto, es difícil precisar las cantidades de ellos necesarias para estimular a P. shermani, a menos que en experimentos posteriores se tomen en consideración las cantidades originalmente presentes, o se trabaje con un medio de fermentación aún más simplificado.

**CAPITULO 7**

**CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

De acuerdo a los análisis químicos hechos al jugo de piña, éste puede ser aprovechado en procesos fermentativos, en función de su composición y en virtud de que no presentan características tóxicas. Pero los jugos residuales de la fruta se generan temporalmente, por lo que, en un proceso en el que se llegaran a emplear los mismos sería conveniente que existieran otros procesos de producción alternativos. Con éstos se nulificarían los tiempos muertos originados por la ausencia de materia prima proveniente de la piña.

Ya que no se conoce ninguna investigación acerca de la producción de vitamina B<sub>12</sub>, con el empleo de jugo de piña como fuente de carbono, y Propionibacterium shermanii como microorganismo de trabajo, y con el antecedente que éste es incapaz de metabolizar la sacarosa (17), en esta investigación se diseñó un método mediante el que se pudiera hidrolizar la sacarosa presente en el jugo. La técnica resultó doblemente ventajosa porque no sólo sirvió para la sacarificación, sino también para la esterilización de la fuente de carbono.

El jugo de piña resulta ser una excelente materia prima para el crecimiento de Propionibacterium shermanii y/o la producción de cianocobalamina. Aunque se trata

de una fuente de carbono no convencional, los resultados obtenidos comparan favorablemente con los obtenidos cuando se usa glucosa o sacarosa. Estos resultados dejan abierta la posibilidad de aprovechar los jugos residuales de la industrialización de la piña en proceso fermentativo de producción de vitamina B<sub>12</sub>.

En trabajos publicados anteriormente (9, 40), se había demostrado que los niveles de aeración proporcionados a las fermentaciones con Propionibacterium shermanii, son de importancia crítica tanto para su desarrollo como para la producción de vitamina B<sub>12</sub>. Este hecho se comprobó mediante los resultados obtenidos en esta investigación, en el que indirectamente se proporcionaron varias condiciones de oxigenación al microorganismo, mediante el uso de diferentes volúmenes de medio de cultivo en matraces de 250 ml. Con el empleo de 50 ml de medio se obtuvieron mejores resultados en cuanto a crecimiento celular, mientras que 100 ml de medio resultaron mejores para la producción de cianocobalamina. En base a estas comprobaciones, en trabajos posteriores a nivel matraz se sugiere la optimización de volumen de medio a ser empleado, para encontrar el que mejor incidencia tiene sobre los parámetros mencionados.

Se ha reportado que lotes diferentes de agua de cocimiento de maíz, varían en su capacidad de mejorar los rendimientos de cianocobalamina (51). La eficiencia de producción de este metabolito está afectada por las fuertes variaciones de los componentes de esa fuente nitrogenada. Dado que en esta investigación se usaron diversos lotes de agua de cocimiento de maíz, se encontraron muchas diferencias de un experimento a otro, lo cual confirma los reportes anteriores. Por esta razón, en trabajos posteriores se recomienda usar siempre el mismo lote de esa materia prima, o por el contrario estandarizar las cantidades de sus componentes.

Hasta la fecha no existe ningún trabajo en el que se reporte las cantidades más adecuadas en las que deben encontrarse las fuentes de carbono y la de nitrógeno para el crecimiento de Propionibacterium shermanii y/o la producción de vitamina B<sub>12</sub>. En las condiciones en que se llevaron a cabo estos experimentos, el microorganismo no alcanzó a consumir todo el nitrógeno proporcionado al medio de fermentación, en cambio sí se consumió toda la fuente de carbono suministrada. Esto es una evidencia de que al medio se adiciona un exceso de fuente de nitrógeno en relación a la de carbono. En este sentido se re

comienda la reformulación del medio basal en pruebas sub-  
siguientes con el empleo de Propionibacterium shermanii.

De acuerdo a las evidencias experimentales encontra-  
das por Gibson y sus colaboradores (14), la formación  
de ácido  $\delta$ -aminolevulínico (intermediario en la ruta bio-  
sintética de la vitamina B<sub>12</sub>) puede ser inhibida por de-  
rivados del ácido malónico, tales como aminomalonato y  
metilaminomalonato. Ya que en las fermentaciones con ju-  
go de piña se detectó una cantidad de ácido malónico que  
alcanzó los 18.3 mg/ml, se piensa que tal vez este ácido  
tuvo algún efecto sobre el desarrollo de Propionibacte-  
rium shermanii y/o sobre la producción de cianocobalami-  
na. Por tanto, se recomienda hacer una investigación  
más exhaustiva acerca de los posibles efectos del malóni-  
co en el proceso fermentativo de producción de vitamina  
B<sub>12</sub> en el que se emplee jugo de piña como fuente de car-  
bono.

Con anterioridad a este trabajo se había publicado  
que la sacarosa como tal no es metabolizable por Propio-  
nibacterium shermanii (17). En esta investigación se  
realizó una fermentación en la que se formuló el medio  
con sacarosa hidrolizada, ya que guarda estrecha rela-  
ción con el medio con jugo de piña. Se encontró que los

resultados de crecimiento y producción de vitamina B<sub>12</sub> compiten con los obtenidos cuando se usan otras fuentes de carbono (glucosa por ejemplo). Se concluye entonces que la sacarosa hidrolizada también puede ser usada como fuente de carbono alternativa en este tipo de experimentos.

Es de conocimiento general que cuanto más tiempo se mantenga a los microorganismos en el rango de pH óptimo para su crecimiento, más eficientemente aprovecharán los sustratos del medio de fermentación en que sean crecidos. En el caso de los procesos de fermentación para producción de vitamina B<sub>12</sub> con Propionibacterium shermanii realizados a nivel matraz, nunca se ha especificado el período de tiempo en el que se ajusta el pH para mantenerlo entre los límites que permitan su mejor desarrollo y producción de cianocobalamina. En este trabajo se encontró que al controlar ese parámetro (pH) cada 12 horas, en vez de hacerlo cada 24 horas como solía hacerse, el microorganismo crecía a más altas velocidades específicas de crecimiento, de acuerdo a lo esperado. En consecuencia hubo un acortamiento del tiempo de fermentación y más altas productividades de vitamina B<sub>12</sub>. De ser posible, se recomienda controlar el pH de las fermentacio-

nes a nivel matraz, en períodos de tiempo aún más cortos.

Ya se sabía que la adición de pantotenato de calcio y biotina (50), ácido glutámico (31), metionina (20), así como de fosfato de piridoxal (16), a diferentes medios de fermentación para producción de cianocobalamina con Propionibacterium shermanii, estimulaban el crecimiento del microorganismo y/o la producción de esa vitamina. Los resultados de esta investigación con el medio de fermentación y bajo las condiciones de trabajo usadas, confirman esas evidencias. Pero no se conocen las mejores concentraciones y tiempos de adición de esos agentes, por lo que en trabajos posteriores relacionados a la producción de cianocobalamina con Propionibacterium shermanii se recomienda la optimización de estos dos parámetros.



**BIBLIOGRAFIA**

1. Ahuja, C., J.A. 1959. Tesis de Licenciatura. Investigaciones acerca de la enzima bromelina, estudio preliminar sobre su posible industrialización. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. México.
2. Association of Official Agricultural Chemists (A.O.A.C.). 1975. Official Methods of Analysis, 12a. Ed., Washington, Method 47.021.
3. Baduñ, S. 1981. Vitaminas y Minerales. Química de los Alimentos. Editorial Alhambra Mexicana, S.A. Primera Edición. México. págs. 234, 244 y 262.
4. Balakireva, L.M., Kantere, V.M. & Rabotnova, I.L. 1974. The redox potencial in microbiological media. Biotechnol. Bioeng. Symp., 4, 769-780.
5. Berry, E.C. & Bullerman, L.B. 1966. Use of cheese whey for vitamin B<sub>12</sub> production. II cobalt, precursors, & aeration levels. Appl. Microbiol. 14, (3): 356-357.
6. Clark-Waker, G.D., Rittenberg, B. & Lascelles, J. 1967. Cytochrome synthesis and its regulation in Spirillum itersonii. J. Bacteriol. 94, (5): 1648-1655.
7. Demain, A.L., Daniels, H.J., Schnabel, L. & White, R.F. 1968. Specificity of the stimulatory effect of betaine on the vitamin B<sub>12</sub> fermentation. Nature. 220: 1324-1325.
8. Demain, A.L. & White, R.F. 1971. Porphyrin overproduction by Pseudomonas denitrificans: Essentiality of betaine and stimulation by ethionine. J. Bacteriol. 107, (2): 456-460.

9. Devries, W., Wilhelmina, M.C., Van Wijck-Kapteijn & Stouthmer, A.H. 1972. Influence of oxygen on growth, cytochrome synthesis and fermentation pattern in propionic acid bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 71: 515-524.
10. Fisher, R.A. 1954. Rapid spectrophotometric determination of vitamin B<sub>12</sub> in microbial material. *J. Agr. Food Chem.* 1: 951-953.
11. Florent, J., and L. Ninet. 1979. Vitamin B<sub>12</sub>. Pages 457-419 in H.J. Peppler and D. Perlman, eds., *Microbial Technology*. Vol. 1, 2nd ed., Academic Press, Inc., New York.
12. Frutas tropicales. 1972. Productos de frutas tropicales; tendencias y perspectivas de la producción y el comercio de piña enlatada y productos de frutas tropicales exóticas. Dirección General de Economía Agrícola. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Pág. 3.
13. García H., F. y Pérez M., J.L. 1983. Fermentación de desechos agroindustriales para la obtención de metabolitos de interés industrial. *Boletín de Estudios Médico-Biológicos.* 32, 177-195.
14. Gibson, K.D., Matthew, M., Neuberger, A. & Tait, G.H. 1961. Biosynthesis of porphyrins and chlorophylls. *Nature.* 192: 204-208.
15. Harris, S.A., Harris, E.E. & Burg, R.W. 1963. Pyridoxine. Pages 806-824 in Kirk-Othmer, ed. *Encyclopedia of Chemical Technology*. Second Edition. Vol. 16, Interscience Publisher, New York.
16. Hettinga, D.A. and Reibold, G.W. 1972. The propionic-acid bacteria a review, I. Growth. *J. Milk Food Technol.* 35, (5): 295-301.

17. Hettinga, D.H. & Reinbold, G.W. 1972. The propionic-acid bacteria a review, III. Miscellaneous metabolic activities. *J. Milk Food Technol.* 35, (7): 436-447.
18. Ibragimova, S.I. & Shulgovskaya, E.M. 1979. Growth of Propionibacterium shermanii culture under various aeration condition. *Mikrobiologiya.* 48, (4): 668-671.
19. Instituto Mexicano de Comercio Exterior. 1985. Departamento de Promoción Industrial, México.
20. Janicki, J., Skupin, J. & Nowakowska, K. 1963. Effect of S-adenosyl L-methionine ("Active Methionine") on the biosynthesis of corrinoids by Propionibacterium shermanii. *Polonaise Des Science.* 11, (1): sin páginas.
21. Kortstee, G.J.J. 1970. The effect of phospholipids on the synthesis of porphyrins by Arthrobacter globiformis. *J. Microbiol. Serol.* 36: 187.
22. Kusel, J.P., Fa, Y.H. & Demain, A.L. 1984. Betaine stimulation of vitamin B<sub>12</sub> biosynthesis in Pseudomonas denitrificans may be mediated by an increase in activity of  $\delta$ -aminolevulinic acid synthetase. *J. Gen. Microbiol.* 130: 835-841.
23. Lago, B.D. & Kaplan, L. 1981. Vitamin Fermentations: B<sub>2</sub> and B<sub>12</sub>. Pages 241-246 in M. Moo-young, ed., *Advances in Biotechnology.* Vol. 3, Pergamon Press, Toronto.
24. Lapage, S.P., Shelton, J.E., and Mitchell, T.G. 1970. Media for the maintenance and preservation of bacteria. Pages 109-126 in J.R. Norris and D.W. Ribbons, eds., *Methods in Microbiology.* Academic Press, Inc. London.

25. Lascelles, J. 1959. Adaptation to form bacteriochlorophyll in Rhodospirillum rubrum: changes in activity of enzymes concerned in pyrrole synthesis. Biochem. J. 72: 508-518.
26. Lehninger, A.L. 1982. Vitaminas y Coenzimas. Bioquímica. Segunda Edición. Ediciones Omega, S.A., Barcelona. págs. 341-370, 568.
27. Lemoine, J., Solis, R., Madrid, R.R. y Pelayo, C. 1980. Tomo 2, págs. 529-543 en Memorias del Simposium "La Investigación, El Desarrollo Experimental y La Docencia en CONAFRUT durante 1979". Comisión Nacional de Fruticultura, SARH, México.
28. Lowe, D.A. & Turner, J.M. 1970. Origin of the D-1-aminopropan-2-ol fragment of vitamin B<sub>12</sub>. J. Gen. Microbiol. 64: 119-122.
29. Luedeking, R. 1967. Fermentation process kinetics, Pages 184-241 in N. Blakebrough, ed., Biochemical and Biological Engineering Science. Vol. 1, Academic Press, Inc., New York.
30. Martínez M., P.F. 1951. Tesis de Licenciatura. Aprovechamiento de los desperdicios de las empaques de piña. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. México.
31. Marwaha, S.S., Sethi, R.P. & Kennedy, J.F. 1983. Role of aminoacids, betaine and choline in vitamin B<sub>12</sub> biosynthesis by strains of Propionibacterium. Enzyme Microb. Technol. 5: 454-456.
32. Metzler, D.E. 1977. The metabolism of nitrogen-containing compounds. Biochemistry the chemical reactions of living cell. Academic Press, Inc., London. pages 806-890.

33. Nanba, A., Nukada, R. & Nagari, S. 1983. Inhibition by acetic and propionic acids of the growth of Propionibacterium shermanii. J. Ferment. Technol. 61, (6): 551-556.
34. Osman, H.G. & Chenouda, M.S. 1968. Biosynthesis of vitamin B<sub>12</sub> by Propionibacterium shermanii. J. Chem. U.A.R. 11, (3): 353-361.
35. Oxender, D.L. 1972. Membrane Transport. Ann. Rev. Biochem. 41: 784-795.
36. Perault, A.M., Pullman, B. & Valdemoro, G. 1961. Electronic aspect of the reactions of piridoxal phosphate enzymes. Biochem. Biophys. Acta. 46: 555-575.
37. Pérez M., J.L. 1981. Tesis de Maestría. Utilización de subproductos industriales del limón mexicano por vía fermentativa para la producción de vitamina B<sub>12</sub>. Comisión Nacional de Fruticultura, SARH, México.
38. Perlman, D. 1977. Microbial production of therapeutic compounds. Page 287 in H.J. Peppler, ed., Microbial Technology. Robert E. Krieger Publishing Company, New York.
39. Perlman, D. 1978. Vitamins. Pages 303-325 in A.H. Rose, ed., Economic Microbiology. Vol. 2. Academic Press, Inc., London.
40. Pritchard, G.G., Wimpenny, J.W.T., Morris, H.A., Mary, W.A., Lewis & Hughes, D.E. 1977. Effects of oxygen on Propionibacterium shermanii grown in continuous culture. J. Gen. Microbiol. 102: 223-233.
41. Quintero, R. 1981. Cinética de fermentaciones. Ingeniería Bioquímica, Teoría y Aplicaciones. Primera Edición. Editorial Alhambra Mexicana, S.A., México. pag. 39.

42. Riches, E.L. et al. 1948. "Cristalline vitamin B<sub>12</sub>". Science. 107: 396-401.
43. Santana C., L.A. 1983. Tesis de Licenciatura. Cinética de crecimiento de Propionibacterium shermanii en un subproducto de la industria del limón mexicano. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
44. Speedie, J.D. & Hull, G.W. 1960. U.S. Patent 2, 951, 017.
45. Teeri, A.E. and Bieber, R.E. 1958. B-complex vitamins in certain brown and red algae. Science. 127: 1500.
46. Tello M., F. 1959. Tesis de Licenciatura. Propagación de levadura comestible de los residuos de una planta empacadora de piña. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. México.
47. Thing, S.V. 1956. Rapid colorimetric methods for simultaneous determination of total reducing sugar and fructose in citrus juices. Agric. Food Chem. 4: 363-366.
48. Wood, H.G., Andersen, A.A. & Werkman, C.H. 1983. Nutrition of the propionic acid bacteria. J. Bacteriol. 36: 201-214.
49. Villanueva Y., M. 1953. Tesis de Licenciatura. Concentración de jugo de piña. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. México.

50. Zodrow, K., Stefaniak, O., Chelkowski, J. & Szczepska, K. 1963. Influence of Ca-pantothenate and biotin on the growth and biosynthesis of corrinoids by propionibacteria. Acta Microbiol. Pol. 12: 263-266.
  
51. Zabriskie, D.W., Arminger, W.B., Phillips, D.H. & Albano, P.A. 1980. Average composition of corn steep liquor. Traders' Guide to Fermentation Media Formulation. Traders Protein Division. Traders Oil Mill Co., Texas, page 15.