



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

U. A. C. P. Y P. DEL C. C. H.

ESTUDIOS PARA INCREMENTAR LA PRODUCCION DE VITAMINA B-12 POR
FERMENTACION DE UN DESECHO DE LA INDUSTRIA DEL LIMON MEXICANO
(Citrus aurantifolia Swingle)

T E S I S D E P O S G R A D O

Que para Obtener el grado de

M A E S T R I A E N B I O T E C N O L O G I A

P r e s e n t a

Q. F. B. Lourdes Araceli Santana Castillo.

Dpto. de Biotecnología, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMEDICAS (U N A M).

Cd. Universitaria, Abril de 1987.

TESIS CON
FALSA FE ORIGINARIA



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.

C O N T E N I D O

CAPITULO	PAGINA
R E S U M E N	1
I. INTRODUCCION	3
II. ANTECEDENTES	5
III. Industria del Limón Mexicano.	5
IIIi. Generalidades sobre vitamina B-12.	9
IIIia. Introducción.	9
IIIib. Antecedentes históricos.	9
IIIic. Estructura Química.	12
IIIid. Fuentes de Obtención.	12
IIIie. Usos Terapéuticos.	15
IIIif. Funciones Metabólicas.	15
IIIig. Microorganismos Productores de Vitamina B-12.	14
IIIih. Procesos fermentativos para la producción de vitamina B-12.	18
IIIil. Medios de Fermentación para la Producción de vitamina B-12.	20
IIIij. <u>Propionibacterium shermanii</u> Crecimiento y Producción.	23
IIIik. Biosíntesis de la Vitamina B-12.	.
IIIil. Regulación de la Síntesis de Tetrapirroles.	25
IIIim. Importancia Comercial de la Vitamina B-12.	30
III. OBJETIVO.	32
IIIi. Metas Específicas.	32
IV. MATERIALES Y METODOS.	33
IVi. Microorganismo.	33
IVii. Preparación de los Medios de Fermentación.	33
IViii. Preparación de Inóculo.	35
IViv. Condiciones de Fermentación.	35
IVv. Determinaciones Analíticas.	37
IVva. Crecimiento Microbiano.	37
IVvb. Vitamina B-12.	40

IVvc.	Azúcares Reductores Totales.	40
IVvd.	Nitrógeno Total.	41
IVve.	Acido Cítrico, Láctico y Succínico.	42
V. RESULTADOS Y DISCUSION.		43
Vi.	Estudios de Correlación entre los Métodos de Densidad Óptica (D.O.) y contenido de Acido Deoxirribonucleico (DNA) para la Determinación del crecimiento Microbiano.	43
Via.	Crecimiento Microbiano Determinado por Ambos Métodos.	43
Vib.	Selección del Mejor Método de Extracción del DNA.	43
Vic.	Selección del Volumen de Mezcla Lítica Adecuada para aumentar la eficiencia extractiva de DNA.	52
Vid.	Selección del Volumen adecuado de Suspensión Bacteriana para la Cuantificación de DNA en Células de <i>E. shermanii</i> .	52
Vie.	Correlación entre los Métodos de D.O. y DNA.	60
Vii.	Estudios para Incrementar la Producción Fermentativa de vitamina B-12 en un medio a Base de Jugo Cocido de Limón (JCL) como Fuente de Carbono.	60
Vii.a.	Efecto del Nivel de Aeración Sobre la Producción de Vitamina B-12.	60
	- Experimentos a un solo Nivel de Aeración.	60
	- Experimentos a dos Niveles de Aeración.	72
Vii.b.	Efecto de la Concentración y Tiempo de Adición de los Precursores Glicina y Cobalto Sobre la Producción de Vitamina B-12.	74
	- Experimento Control.	79
	- Experimentos con Glicina.	79
	- Experimentos con Cobalto.	84
Viii.	Fermentaciones a Base de Citrato de Sodio como Fuente de Carbono.	106
Viv.	Producción de Vitamina B-12 en un Medio a Base de Glucosa como Fuente de Carbono.	110
Viva.	Fermentación Control.	110

Vivb.	Diseño Experimental Plackett-Burman.	111
Vivc.	Comparación de los Resultados del Diseño Plackett-Burman con Respecto al Experimento Control.	126
Vivd.	Comparación del Factor Glicina con los demás Factores Frente a las Variables de Respuesta.	127
Vive.	Diseño Factorial 2^3 .	132
Vivf.	Comparación de los Resultados del Diseño Factorial 2^3 con el Mejor Experimento del Diseño Plackett-Burman.	155
Vivg.	Experimentos Propuestos por los Resultados Obtenidos en el Diseño Factorial 2^3 .	155
VI.	CONCLUSIONES.	168
VII.	ANEXOS.	172
VIII.	BIBLIOGRAFIA.	223

L I S T A D E F I G U R A S

FIGURA		PAGINA
1.	Diagrama de bloques para la Industrialización del Limón Mexicano.	6
2.	Nomenclatura Sistemática de la Vitamina B-12 y Compuestos Relacionados.	13
3.	Fórmula Estructural de la Vitamina B-12 (Cianocobalamina).	13
4.	Camino Biosintético de los Tetrapirroles.	26
5.	Ruta Biosintética para la Formación de Vitamina B-12.	28
6.	Regulación de la Síntesis de Tetrapirroles en <i>Rhodospseudomonas spheroides</i>	29
7.	Diagrama de Bloques del Desarrollo Experimental.	34
8.	Preparación del Inóculo.	36
9.	Curva Estandar de DNA.	39
10.	Curva que Relaciona la Absorbancia a 600 nm (para cuantificar DNA) vs Mililitros de Suspensión Bacteriana.	44
11.	Curva, D.O. a 540 nm y Absorbancia a 600 nm (para cuantificar DNA) vs Tiempo en la Fermentación de 200-75 ml de volumen de trabajo/matraz de 250 ml en un Medio a base de Jugo Cocido de Limón (JCL).	45
12.	Curva, D.O. a 540 nm y Absorbancia a 600 nm (para cuantificar DNA) vs Tiempo en la Fermentación de 130 ml de volumen de trabajo (3 días) - 75 ml de volumen de trabajo (3 días) / matraz de 250 ml en un Medio a base de JCL.	46
13.	Curva, D.O. a 540 nm y Absorbancia a 600 nm vs Tiempo en la Fermentación de 130 ml de volumen de trabajo / matraz de 250 ml en un Medio a base de JCL.	47
14.	Curva que correlaciona el Crecimiento medido a 600 nm (para cuantificar DNA) vs el determinado por D.O. a 540 nm en la Fermentación de 200 ml de volumen de trabajo (2 días) - 75 ml de voluen de trabajo (4 días) / Matraz de 250 ml en un medio a base de JCL.	48

15.	Curva que Correlaciona el Crecimiento Medido a 600 nm (para cuantificar D N A) vs el Determinado por D.O. a 540 nm en la Fermentación de 130 ml de volumen de trabajo (3 días) - 75 ml de volumen de trabajo (3 días) / Matraz de 250 ml en Medio a base de JCL.	49
16.	Curva que Correlaciona el Crecimiento Medido a 600 nm (para cuantificar D N A) vs el Determinado por D.O. a 540 nm en la Fermentación de 130 ml de trabajo (6 días) / Matraz de 250 ml en un Medio a base de JCL.	50
17.	Curva, Absorbancia a 600 nm (para cuantificar D N A vs Tiempo (96 y 120 h) de crecimiento en la Fermentación de 130 ml de volumen de trabajo de trabajo / Matraz de 250 ml en un Medio a base de JCL.	53
18.	Curva, Absorbancia a 600 nm (para cuantificar D N A vs Volumen de suspensión bacteriana (0.5 y 1.5 ml) en la Fermentación de 130 ml de volumen de trabajo / Matraz de 250 ml en un Medio a Base de JCL.	56
19.	Curva, Absorbancia de DNA a 600 nm (para cuantificar vs A = Tiempo de crecimiento (t ₀ , t ₁ y t ₂) a dos Volúmenes de Suspensión Bacteriana (0.5 y 1.5 ml); B = Volumen de Suspensión Bacteriana (0.5 y 1.5 ml) a 3 tiempos de Fermentación (t ₀ , t ₁ y t ₂) en la Fermentación de 130 ml de volumen de trabajo / Matraz de 250 ml en un Medio a Base de JCL.	58
20.	Curva, Absorbancia a 600 nm (para cuantificar D N A) vs Volumen de Suspensión Bacteriana (ml).	59
21.	Gráfica que Relaciona la Absorbancia a 600 nm (para cuantificar D N A) y D. O. a 540 nm vs Tiempo (h) en la Fermentación (triplicado) de 130 ml de volumen de trabajo / Matraz de 250 ml en un Medio a Base de JCL.	63
22.	Curva de Absorbancia de DNA a 600 nm (A) y Densidad Optica a 540 nm (B) vs Tiempo (h) en la Fermentación de 130 ml de Medio/Matraz de 250 ml en un Medio a base de JCL	64
23.	Curva que Correlaciona el Crecimiento de <i>E. shermanii</i> ATCC 13673 Cuantificado por D.O. a 540 nm vs Absorbancia a 600 nm en la Fermentación de de 130 ml de volumen de trabajo / Matraz de 250 ml en un Medio a Base de JCL.	66

24.	Crecimiento Celular y Producción de Vitamina B-12 en la Fermentación con <i>E. shermanii</i> ATCC 13673 en un Medio a Base de JCL bajo Diferentes Niveles de Aeración.	68
25.	Velocidades Especificas de Crecimiento (u) de <i>E. shermanii</i> ATCC 13673 en un Medio a Base de JCL bajo Diferentes Niveles de Aeración.	69
26.	Gráfica que Relaciona la Producción, Productividad y Producción Especifica de Vitamina B-12 en Fermentaciones a Base de JCL bajo Diferentes Niveles de Aeración	70
27.	Gráfica que Relaciona la Productividad y la Producción Especifica de Vitamina B-12 en Función de los 3 últimos días de Fermentación en un Medio a base de JCL	71
28.	Crecimiento Celular y Producción de Vitamina B-12 en la Fermentación con <i>E. shermanii</i> ATCC 13673 en un Medio a Base de JCL.	73
29.	Velocidades Especificas de Crecimiento (u) de <i>E. shermanii</i> ATCC 13673 en un Medio a base de JCL.	75
30.	Gráfica que Relaciona la Productividad y la Producción Especifica de Vitamina B-12 a las 72 y 144 horas de Fermentación en un Medio a Base de JCL a Diferentes Niveles de Aeración.	76
31.	Curva, Concentración vs Tiempo en la Fermentación de 130 ml de volumen de trabajo / Matraz de 250 ml en un Medio a base de JCL.	78
32.	Curva, Concentración vs Tiempo en la Fermentación de 130 ml de Medio/Matraz de 250 ml en un Medio a base de JCL con <i>E. shermanii</i> ATCC 13673. Nuevo Lote de JCL y Adición Aproximada de 7.6 ml/l de ácido Láctico.	80
33.	Velocidades Especificas de Crecimiento (u) de <i>E. shermanii</i> ATCC 13673 en la Fermentación de 130 ml de Medio/Matraz de 250 ml en un Medio a base de JCL. Nuevo Lote de JCL y adición de 7.6 ml de ácido Láctico.	81
34.	Curva, Concentración vs Tiempo en la Fermentación de 130 ml de Medio/Matraz de 250 ml en un Medio a base de JCL con <i>E. shermanii</i> ATCC 13673. Diferentes Concentraciones y Tiempos de Adición de Glicina	85
35.	Gráfica que Relaciona a la Producción,	

	Producción Especifica y Productividad de Vitamina B-12 vs A = Glicina Adicionada y B = Tiempo de Adición de Glicina	86
36.	Gráfica de contorno que relaciona la producción de vitamina B-12 (ug/l) vs Tiempo (h) de adición de glicina (mM).	87
37.	Gráfica de contorno, Concentración de glicina (nm) adicionada vs Tiempo (h) de adición de glicina en la Producción Especifica de Vitamina B-12 (ug de B-12/g de celula).	88
38.	Curva, Concentración vs Tiempo en la Fermentación de 130 ml de Medio/Matraz de 250 ml en un Medio a base de JCL con <i>E. shermanii</i> ATCC 13673. Diferentes Concentraciones y Tiempos. de Adición de Cobalto	92
39.	Gráfica que Relaciona la Producción de Vitamina B-12 vs A = Cobalto Adicionado y B = Tiempo de Adición de Cobalto.	94
40.	Gráfica que Relaciona la Producción Especifica de Vitamina B-12 vs A = Cobalto Adicionado y B = Tiempo de Adición de Cobalto	95
41.	Gráfica que Relaciona la Productividad de Vitamina B-12 vs A = Cobalto Adicionado y B = Tiempo de Adición de Cobalto	96
42.	Gráfica de contorno, Concentración de Cobalto (mg/l) adicionado vs Tiempo (h) de adición de Cobalto en la Producción de Vitamina B-12 cuantificado a las 96 h de Fermentación.	99
43.	Gráfica de contorno que relaciona la Producción Especifica de Vitamina B-12 vs Tiempo (h) de Adición de Cobalto a las 96 h de Fermentación.	100
44.	Gráfica de contorno, Concentración de Cobalto (mg/l) adicionado vs Tiempo (h) de adición de Cobalto en la Producción de Vitamina B-12 a las 120 h de Fermentación.	102
45.	Gráfica de contorno, Concentración de Cobalto (mg/l) adicionado vs Tiempo (h) de adición de Cobalto en la Producción Especifica de Vitamina B-12 a las 120 h de Fermentación.	103
46.	Gráfica de contorno que relaciona la Producción de Vitamina B-12 vs Tiempo (h) de adición de Cobalto a las 144 h de Fermentación.	104
47.	Gráfica de contorno que relaciona la Producción	

	Específica de Vitamina B-12 vs Tiempo (h) de adición de Cobalto a las 144 h de Fermentación.	105
48.	Curva, Concentración vs Tiempo en Fermentaciones de 130 ml de Medio/Matraz de 250 ml en Medios de Cultivo a base de Citrato de Sodio como Fuente de Carbono con <u>P. shermanii</u> ATCC 13673.	107
49.	Velocidades Específicas de Crecimiento de <u>P. shermanii</u> ATCC 13673 en la Fermentación de 130 ml de Medio/Matraz de 250 ml en Medios de Cultivo a base de Citrato de Sodio como Fuente de Carbono.	109
50.	Gráfica que Muestra la Fermentación de 130 ml de Medio/Matraz de 250 ml (A) y la Fermentación de 150 ml de Medio/Matraz de 250 ml (B) en un Medio a base de Glucosa con <u>P. shermanii</u> ATCC 13673.	112
51.	Velocidades Específicas de Crecimiento Promedio (h^{-1}) de <u>P. shermanii</u> ATCC 13673 en Fermentaciones del Diseño Experimental Plackett-Burman (0,0) y Experimento Control (). 0, Fermentaciones en 130 ml de Medio/Matraz de 250 ml y 0 Fermentaciones en 150 ml de Medio/Matraz de 250 ml.	113
52A.	Gráfica que Muestra los Experimentos E1 al E4 del Diseño Experimental Plackett-Burman en Fermentaciones a base de Glucosa con <u>P. shermanii</u> ATCC 13673.	118
52B.	Gráfica que Muestra los Experimentos E5 al E8 del Diseño Experimental Plackett-Burman en Fermentaciones a base de Glucosa con <u>P. shermanii</u> ATCC 13673.	119
53A.	Gráfica que Muestra la Producción, Producción Específica y Productividad de Vitamina B-12 al 4o., 5o. y 6o. día de las Fermentaciones a base de Glucosa con <u>P. shermanii</u> ATCC 13673 en los Experimentos E1 al E4 del Diseño Experimental Plackett-Burman.	120
53B.	Gráfica que Muestra la Producción, Producción Específica y Productividad de Vitamina B-12 al 4o., 5o. y 6o. día de las Fermentaciones a base de Glucosa con <u>P. shermanii</u> ATCC 13673 en los Experimentos E5 al E8 del Diseño Experimental Plackett-Burman.	121
54.	Gráficas que Muestran el Efecto e Interacción de los Factores: 54A Glicina-Volumen de Medio de	

Fermentación, 54B Glicina-DDC, 54C Glicina-Tween 80, 54D Glicina-Propanol CN y 54E Glicina-Cobalto Sobre el Crecimiento de <u>P. shermanii</u> ATCC 13673, Producción y Producción Especifica de Vitamina B-12 a los Tres Ultimos Dias de Fermentación	128
55A. Grafica que Relaciona el Crecimiento de <u>P. shermanii</u> ATCC y el pH en los Experimentos E1 al E4 del Diseño Factorial 2 ³ en Fermentaciones a base de Glucosa.	137
55B. Grafica que Relaciona el Crecimiento de <u>P. shermanii</u> ATCC 13673 y el pH en los Experimentos E5 al E8 del Diseño Factorial 2 ³ en Fermentaciones a base de Glucosa.	138
56A. Velocidades Especificas de Crecimiento de <u>P. shermanii</u> ATCC 13673 en Fermentaciones de 150 ml de Medio/Matriz de 250 ml empleando un Diseño Factorial 2 ³ en un Medio a base de Glucosa como Fuente de Carbono. Experimentos 2, 4, 6 y 8.	139
56B. Velocidades Especificas de Crecimiento de <u>P. shermanii</u> ATCC 13673 en Fermentaciones de 150 ml de Medio/Matriz de 250 ml Empleando un Diseño Factorial 2 ³ en un Medio a base de Glucosa como Fuente de Carbono. Experimentos 1, 3, 5 y 7.	140
57. Gráfica que Muestra el Efecto de los Factores Glucosa y Nitrógeno (Agua de Cocimiento de Maíz, ACM) al Variar sus Niveles (-,+) Sobre el Crecimiento de <u>P. shermanii</u> ATCC 13673 en la Fermentación de 150 ml de Medio/Matriz de 250 ml en un Medio a base de Glucosa.	144
58. Gráfica que Muestra el Efecto de los Factores, Glucosa, Nitrógeno (ACM) y Glicina al Variar sus Niveles (-,+) Sobre la Producción de Vitamina B-12 en la Fermentación de 150 ml de Medio/Matriz de 250 ml en un Medio a base de Glucosa.	146
59. Gráfica que Muestra el Efecto de Glucosa y Nitrógeno (ACM) al Variar sus Niveles (-,+) Sobre la Producción de Vitamina B-12 en la Fermentación de 150 ml de Medio/Matriz de 250 ml en un Medio a base de Glucosa.	147
60. Gráfica que Muestra el Efecto de los Factores Glucosa y Nitrógeno (ACM) al Variar sus Niveles (-,+) Sobre la Producción Especifica de Vitamina B-12 en la Fermentación de 150 ml de Medio/Matriz de 250 ml en un Medio a base de Glucosa con <u>P. shermanii</u> ATCC 13673	149

61.	Gráfica de contorno, Concentración de Glucosa (g/l) vs Concentración de Agua de Cocimiento de Maíz (ACM, g/l) en el Crecimiento (g/l) de <i>E. shermanii</i> ATCC 13673.	150
62.	Gráfica de contorno, Concentración de Glucosa (g/l) vs Concentración de glicina (mM) a diferentes niveles de ACM (g/l) en la Producción de Vitamina B-12 (mg/l).	151
63.	Gráfica de contorno, Concentración de Glucosa (g/l) vs Concentración de ACM (g/l) en la Producción Específica de Vitamina B-12.	154
64A.	Gráfica que Relaciona el Crecimiento de <i>E. shermanii</i> ATCC 13673, el pH durante todo el Curso de la Fermentación y la Producción de Vitamina B-12 a los 2 últimos Días de la Misma en un Medio a base de Glucosa. Experimentos del M1 al M4 Propuestos por los Resultados del Factorial 2 ³	159
64B.	Gráfica que Relaciona el Crecimiento de <i>E. shermanii</i> ATCC 13673, el pH durante todo el Curso de la Fermentación y la Producción de Vitamina B-12 a los 2 últimos Días de la Misma en un Medio a base de Glucosa. Experimentos del M5 al M8 Propuestos por los Resultados del Factorial 2 ³	160
64C.	Gráfica que Relaciona el Crecimiento de <i>E. shermanii</i> ATCC 13673, el pH durante todo el Curso de la Fermentación y la Producción de Vitamina B-12 a los 2 últimos Días de la Misma en un Medio a base de Glucosa. Experimento M9 Propuesto por los Resultados del Factorial 2 ³ y el Experimento Control.	161
65A.	Velocidades Específicas de Crecimiento (h^{-1}) de <i>E. shermanii</i> ATCC 13673 en Fermentaciones de 150 ml de Medio/Matraz de 250 ml en un Medio a base de Glucosa Propuestos por los Resultados del Factorial 2 ³ . Experimentos M1, M2, M3 y el Control.	162
65B.	Velocidades Específicas de Crecimiento (h^{-1}) de <i>E. shermanii</i> ATCC 13673 en Fermentaciones de 150 ml de Medio/Matraz de 250 ml en Medios a base de Glucosa Propuestos por los Resultados del Factorial 2 ³ . Experimentos M4, M5, M6 y el Control.	163
65C.	Velocidades Específicas de Crecimiento (h^{-1}) de <i>E. shermanii</i> ATCC 13673 en Fermentaciones de 150 ml de Medio/Matraz de 250 ml en Medios a base de	

Glucosa Propuestos por los Resultados del
Factorial 2³. Experimentos M7, M8, M9 y el
Control.

L I S T A D E T A B L A S

TABLA		PAGINA
I.	Composición Química del Jugo Cocido de Limón.	8
II.	Formas Coenzimáticas de las Vitaminas y sus Reacciones de Transferencia de Grupos. . . .	10
III.	Antecedentes Históricos de la Vitamina B-12..	11
IV.	Vitamina B-12 y Algunos Compuestos Relacionados: Nomenclatura y Estructura. . .	14
V.	Producción de Vitamina B-12 por Varios Microorganismos.	17
VI.	Procesos para la Producción de Vitamina B-12.	22
VII.	Importaciones Anuales de Vitamina B-12. . . .	32
VIII.	Análisis de Covarianza. Estudio de correlación entre los métodos de D. O. a 540 nm y cuantificación en absorbancia a 600 nm para la determinación de crecimiento microbiano en tres diferentes Fermentaciones.	51
IX.	Análisis de Varianza. Selección del mejor método para liberar el DNA de <u>P. shermanii</u> ATCC 13673.	54
X.	Análisis de Varianza. Selección del volumen adecuado de mezcla lítica en la extracción de DNA en células de <u>P. shermanii</u>	55
XI.	Análisis de covarianza. Reproducibilidad en la curva de calibración entre el contenido de DNA vs diferentes volúmenes de suspensión bacteriana.	57
XII.	Análisis de Varianza. Selección del volumen adecuado de suspensión bacteriana.	61
XIII.	Análisis de Varianza. Efecto del día de cuantificación, del volumen de suspensión bacteriana y de las replicaciones anidado en las dos primeras.	62
XIV.	Análisis de Covarianza. Estudio de correlación entre los triplicados de una misma fermentación.	65
XV.	Producción, Producción Específica y Productividad de Vitamina B-12 a Diferentes	

	Niveles de Oxígeno.	77
XVI.	Concentración de Glicina Empleada para la Producción de Vitamina B-12.	83
XVII.	Concentración de Cobalto Empleado para la Producción de Vitamina B-12.	90
XVIII.	Producción y Producción Específica de Vitamina B-12 obtenidas en la Fermentación donde fué Adicionado Cobalto.	97
XIX.	Ecuaciones estimadas para Producción y Producción Específica de Vitamina B-12 al emplear un diseño factorial 2^2 con un punto central.	98
XX.	Resultados en el Experimento Control Empleando Glucosa como Fuente de Carbono.	114
XXI.	Matriz de Tratamientos en el Diseño Experimental Plackett-Burman.	115
XXII.	Resultados en el Diseño Experimental Plackett-Burman empleando Glucosa como Fuente de Carbono.	123
XXIII.	Significancia de cada factor en el Diseño Experimental Plackett-Burman.	124
XXIV.	Comparación de los resultados del Diseño Plackett-Burman con los resultados de la Fermentación control.	125
XXV.	Matriz de Tratamientos en el Diseño Factorial 2^3	136
XXVI.	Resultados en el Diseño Factorial 2^3 Empleando Glucosa como Fuente de Carbono.	142
XXVII.	Significancia de los factores estudiados en un Diseño Factorial 2^3	143
XXVIII.	Comparación de los resultados del Diseño Factorial 2^3 con el resultado del tratamiento E2 del Diseño Experimental Plackett-Burman.	156
XXIX.	Composición de los Medios de Fermentación Propuestos en base a los Resultados obtenidos en el Diseño Factorial 2^3	157
XXX.	Resultados de los Experimentos Propuestos por el Análisis Estadísticos de los Resultados del Diseño Factorial 2^3 en un Medio con Glucosa	

	como Fuente de Carbono.....	165
XXXI.	Comparación de los resultados de los Tratamientos del Diseño Factorial 2^3 con respecto al experimento control empleando el método de Dunnet.	167

RESUMEN

Varias investigaciones se han realizado en torno a utilizar desechos agroindustriales con fines tendientes a obtener metabolitos de interés industrial (farmacéutica, alimentaria y de alimentos balanceados). De los desechos generados en nuestro país, los frutícolas son los más destacados (1,108,688 toneladas). En el presente trabajo, el desecho industrial del limón "Jugo Cocido de Limón" (JCL) se emplea como constituyente de un medio de fermentación para realizar estudios que puedan incrementar la producción de vitamina B-12, metabolito de gran demanda industrial y totalmente de importación (15,000 a 20,000 US Dls/Kg de vitamina B-12 con una pureza del 95 al 98 %).

Debido a que los medios de fermentación empleados en el presente trabajo presentan sólidos no orgánicos en suspensión, se decidió estudiar la correlación entre los métodos de densidad óptica (D.O.) y cuantificación del ácido deoxirribonucleico (DNA) para determinar el crecimiento microbiano en las fermentaciones de estudio. Esto con el fin de ver si era posible utilizar el primero, por ser éste un método más rápido y sencillo. Los resultados indicaron que la correlación entre estos dos métodos es adecuada ($r^2 = 0.97$).

El efecto de la aeración es un efecto muy importante para la producción de vitamina B-12 (Santana 1984). En virtud de este antecedente se llevaron a cabo experimentos para determinar el nivel de aeración que proporcionara mejores resultados en cuanto a producción, producción específica y productividad de vitamina B-12. Los mejores resultados se obtuvieron empleando las condiciones de 130 ml/250ml y 130 (72 h)--75 (72 h)/250 ml (ml de volumen de trabajo contenidos en matraz de 250 ml). Condición de aeración que fué empleada para los estudios de incremento de dicho metabolito.

Con el fin de lograr incrementos de vitamina B-12 (con respecto a un proceso previamente establecido con dicho sustrato), se probaron los precursores glicina y cobalto en un medio de fermentación a base de "J C L" y empleando al microorganismo *P. shermanii* ATCC 13673, obteniendo producciones de 2.3-3.5 mg de B-12/l con el primero y de 1.3-4.5 mg de B-12/l con el segundo precursor. Un análisis estadístico de los resultados indicó que no se puede incrementar la producción arriba de 3.8 mg de B-12/l empleando glicina y arriba de 4 a 6 mg de B-12/l empleando cobalto en un medio de cultivo a base de JCL. Como consecuencia de estos resultados se plantearon experimentos empleando glucosa como fuente de carbono para probar además de estos dos precursores otros agentes que pudieran incrementar dicha producción. Dichos experimentos mostraron incrementos hasta del 100 %. Resultados que se lograron empleando un diseño experimental Plackett-Burman y un diseño

factorial 2³. Los factores de variación fueron: glicina, cobalto, 1,4-Diethyl-2,4,6-trimethylpyridine-3,5-Dicarboxylate (DDC), propanol-cianurado, tween 80 y volumen de medio de fermentación, en el primer diseño; glicina, glucosa y nitrógeno, en el segundo diseño estadístico.

El primer diseño estadístico ayudó a seleccionar el factor que tuviera efecto sobre nuestras variables de respuesta, sobresaliendo en este caso la glicina, misma que con una concentración de 8 mM en el medio de fermentación proporcionó los mejores resultados: 8.5 mg de E-12/1, 659 µg de B-12/g de cel y 58.6 µg de B-12/1h en producción, producción específica y productividad, respectivamente. Siendo superiores a los alcanzados en el experimento control: 4.0 mg de E-12/1, 600 µg de E-12/ g de cel y 27 µg de B-12/1h. Con el Diseño Factorial 2³, al variar los niveles de los factores glucosa, nitrógeno y glicina se obtuvo un incremento del 15 % (9.83 µg de E-12/1) en producción, 14 % (68.27 µg de B-12/1h) en productividad sin presentar incremento en la producción específica de vitamina B-12 (790.6 µg de B-12/g de cel.). El análisis estadístico de estos últimos resultados indicaron disminuir los factores nitrógeno y glicina y aumentar la glucosa para lograr un mayor incremento de este metabolito. Sin embargo, los resultados con los nuevos medios de fermentación conformados no reflejaron un incremento significativo desde el punto de vista estadístico. Pero quizá desde el punto de vista económico, el costo de este metabolito en el mercado justifique dicho incremento.

En los últimos años, varios investigadores han dirigido sus estudios en la búsqueda de procedimientos por medio de los cuales puedan ser aprovechados todos aquellos productos orgánicos que se deriven directa ó indirectamente del sector agropecuario con el fin de obtener productos importantes en la industria Química, Farmacéutica, Alimentaria y de Alimentos Balanceados.

La potencialidad de estos estudios es muy importante ya que se aliviarían problemas de contaminación ocasionados por los desechos agroindustriales y paralelamente se obtendrían beneficios para el hombre, ya que la composición química de dichos subproductos es tal que solos ó complementados pueden ser empleados como sustratos en procesos fermentativos para obtener productos como: aminoácidos, vitaminas, proteína unicelular, antibióticos; en fin, todas aquellas sustancias para satisfacer necesidades alimentarias y de salud. Para que de esta forma hacer que lo que antes era considerado desperdicio agroindustrial ahora deba ser visto como materia prima disponible para su aprovechamiento.

Como ejemplo de utilización de subproductos se tienen a: la utilización del bagazo de caña en la producción de furfural, papel, lignosulfatos, tableros aglomerados y compostas para la producción de champiñones; utilización de melazas de caña en la alimentación ganadera, en la producción de alcohol, de antibióticos, aminoácidos, etc; utilización de residuos de la industria del limón para la obtención por precipitación de ácido cítrico y derivados. De los subproductos que son ó han sido motivo de estudio se tienen, además de algunos de los ya mencionados anteriormente a: la fermentación del almidón de la mandioca (huacamote) ó melaza de caña para obtener etanol (Viniegra 1981); a partir de recursos celulósicos obtener proteína unicelular (Quintero 1981); fermentación de desechos de jugos cítricos para obtener levadura alimenticia y etanol (Note et al. 1942); y actualmente, fermentación de un medio que contiene el desecho agroindustrial "jugo cocido de limón" para obtener ácido glutámico (Islas 1984) y vitamina B-12 (Pérez 1981).

De los desechos producidos en nuestro país, destacan los generados por las industrias frutícolas, con una proyección de residuos para 1982 de aproximadamente 1,108,666 toneladas (40 % del volumen procesado) (García y Pérez 1983). Como ejemplo de residuos frutícola que actualmente se encuentran bajo estudio para encontrar la posibilidad de emplearlo como constituyente de un medio de fermentación para la producción de vitamina B-12, se tienen a los residuos de la industrialización de la piña y al jugo cocido del limón. El primero representó un volumen de 134,640 toneladas (60 % del fruto) para 1978 concentradas en la Cuenca del Papalcapán; de

este subproducto, 60,740 toneladas (60 %) son residuos licuados, cuya composición química es adecuada para emplearse como fuente de carbono. La cáscara de piña, recortes y otros desperdicios son utilizados para la obtención de salvado (cáscara de piña prensada y deshidratada) que se destina a la alimentación de ganado. Los jugos se han querido emplear para producir alcohol y vinagre por medios fermentativos pero han ido al fracaso debido a las instalaciones inadecuadas que se tienen. El jugo cocido de limón representa aproximadamente 80 millones de litros anuales, el cual ha sido empleado para la obtención de ácido cítrico por precipitación con hidróxido de calcio, proceso obsoleto porque compete con el ácido cítrico producido por fermentación; dicho subproducto presenta buenas características para poder ser empleado como fuente de carbono en la obtención de metabolitos de interés comercial. Actualmente se han realizado estudios para producir vitamina B-12, sustancia terapéutica muy importante usada para el tratamiento de la anemia perniciosa, como antineurítico y en otras afecciones humanas; en la industria alimentaria se emplea como complemento alimenticio y en veterinaria como factor de crecimiento. La vitamina B-12 no se produce en México y su nivel de importación es alrededor de 200 millones de pesos anuales, bajo diferentes presentaciones comerciales, principalmente como polvo celular con un 50 % de actividad. A nivel laboratorio, las fermentaciones empleando un medio que contiene jugo cocido de limón y empleando al microorganismo Propionibacterium shermanii ATCC 13673, han enfocado los estudios para conocer el efecto que tienen el inóculo, las condiciones anaeróbicas y aeróbicas sobre el crecimiento y producción de vitamina B-12, así como el efecto que presentan al emplear diferentes fuentes de nitrógeno y la adición de algunos precursores de la vitamina B-12 sobre la producción de ésta (Pérez 1981).

En virtud de que el nivel de aeración parece ser importante en la producción de vitamina B-12 y que en el medio de fermentación hay producción de ácido succínico (Santana 1983), precursor inicial en la ruta biosintética de la vitamina B-12, se planteó realizar estudios para encontrar el mejor nivel de aeración y el efecto que pudieran presentar ciertos precursores tales como glicina y cobalto sobre la producción de vitamina B-12 en un medio de fermentación a base de jugo cocido de limón. Este mismo trabajo presenta estudios donde fué empleado además de glicina y cobalto, el precursor 1,4-Diethyl-2,4,6-trimethylpiridine-3,5-Dicarboxylate (DDC) y sustancias tensioactivas (propanol-cianurado y tween 80) en un medio de fermentación a base de glucosa como fuente de carbono. Finalmente el medio de fermentación propuesto por éstos últimos experimentos fué optimizado variando las concentraciones de la fuente de carbono, nitrógeno y glicina con el fin de incrementar la producción de vitamina B-12 que hasta la fecha se había obtenido con el medio base de glucosa (Santana 1983).

II.

ANTECEDENTES

III.

INDUSTRIA DEL LIMÓN MEXICANO

En la industrialización del limón mexicano, se obtienen como productos principales: aceite esencial, jugo y cáscara. El aceite esencial se encuentra distribuido en todas las celdillas de la cáscara del fruto; actualmente se conocen y utilizan 3 procesos de extracción que dan lugar a tres tipos de aceite esencial: aceite esencial destilado, aceite esencial centrifugado tipo A y tipo B. En el proceso de extracción de éste último aceite, se obtiene también jugo simple y jugo concentrado, el cual se obtiene por medio de un evaporador de doble efecto en una proporción de 5 a 1.

En general las plantas industrializadoras del limón, producen los siguientes derivados industriales:

a) Aceite esencial destilado. Se utilizan en la elaboración de refrescos embotellados (squirt, ginger-ale, seven-up), saborizantes para dulces, gelatinas, elados y esencias para repostería; en la elaboración de aditivos que dan aroma a lociones, perfumes y cosméticos.

b) Aceite esencial centrifugado tipo "B". Se utiliza como saborizante en dulces, gelatinas, elados y esencias para repostería.

c) Jugo concentrado congelado y centrifugado. Se utiliza como sustituto de limón fresco, en la elaboración de preparado para limonadas, mermeladas y jaleas; y para balancear la acidez de los jugos enlatados.

d) Cáscara deshidratada. Se utiliza como materia prima para la extracción de pectinas; las cuales tienen la propiedad de quelar líquidos azucarados, propiedad que la hace ser muy útil en la industria alimentaria en la elaboración de jaleas, dulces, gelatinas, mermeladas, etc. También se utiliza en la industria farmacéutica para elaborar suspensiones (Anónimo 1979).

Específicamente en la obtención del aceite esencial destilado (figura 1, proceso 2), se origina un subproducto conocido con el nombre de "jugo cocido", el cual representa a nivel nacional alrededor de 80 millones de litros al año. Dicho subproducto ha sido utilizado industrialmente para la obtención de ácido cítrico por precipitación con hidróxido de calcio, proceso que ha sido obsoleto ya que compete desventajosamente con el producido por fermentación, a pesar de su bajo costo.

Actualmente, este residuo de limón, representa un serio problema de eliminación. Desalojarlo al drenaje aumentaría la

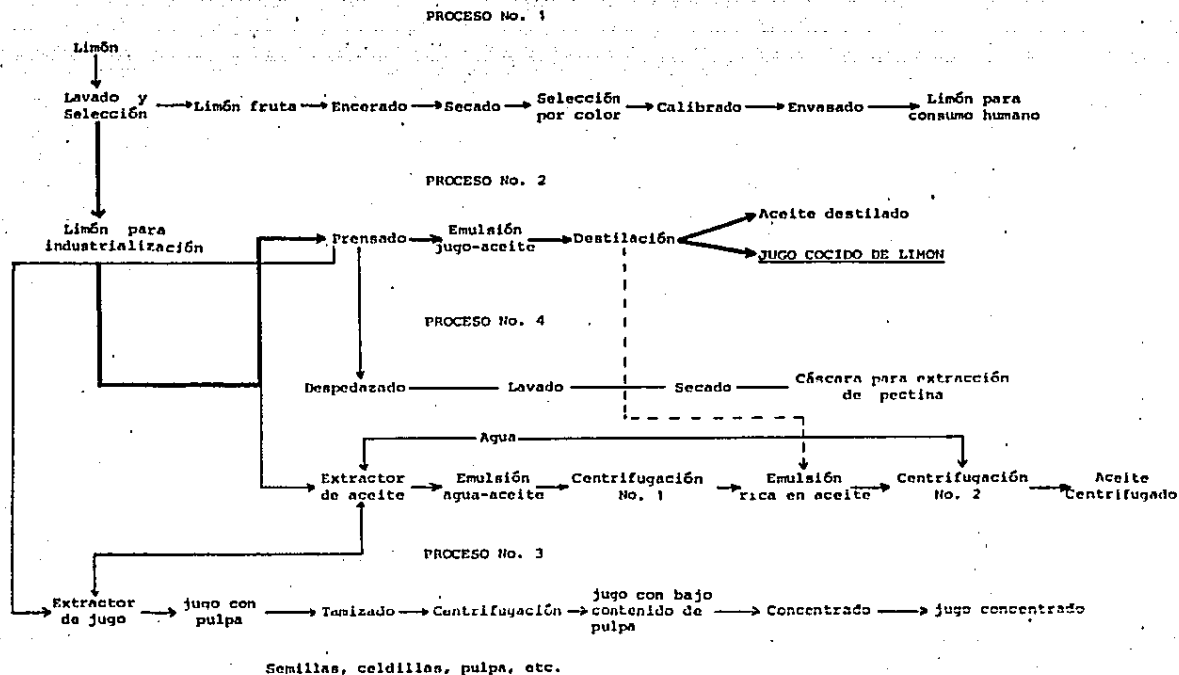


Fig. 1. Diagrama de bloques para la industrialización del limón mexicano.

demanda bioquímica de oxígeno (DBO) por la gran cantidad de material orgánico presente; desalojarlo al campo ocasionaría daños a la flora y como consecuencia contaminación ambiental; y si se deposita en pozos, la infiltración puede contaminar los mantos acuíferos subterráneos.

Por los problemas de eliminación, contaminación, así como por sus altos volúmenes y por su composición química (tabla I); específicamente por tener niveles aceptables de azúcares y ácido cítrico, puede ser empleado como un buen sustrato de fermentación para la producción de metabolitos de interés industrial, tales como: aminoácidos, antibióticos, vitaminas, enzimas, ácidos orgánicos, etc.. Sustancias de gran importancia para las industrias Farmacéutica, Alimentaria y de Alimentos balanceados. En el caso particular de uno de los grupos de investigación del departamento de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas seleccionaron emplear a este desecho industrial como fuente de carbono para la producción de vitamina B-12 (Pérez 1981, Santana 1983) y también para la producción de ácido glutámico (Islas, 1984), productos de gran importancia industrial. En el caso de la vitamina B-12 uno de los motivos primordiales de haberlo seleccionado fue por ser un producto totalmente de importación y de gran demanda en las industrias antes mencionadas.

TABLA I. COMPOSICION QUIMICA DEL JUGO COCIDO DE LIMON.

CONCEPTO	CONTENIDO
Manganeso	1.5 ppm
Cobre	0.85 ppm
Magnesio	8.0 ppm
Hierro	16.85 ppm
Cinc	4.2 ppm
Cromo	3.0 ppm
Fósforo	15.95 mg/100 ml
Azúcares reductores totales (método Ting)	1.5 %
Nitrógeno Total (Método Kjeldahl)	0.066 g/100 ml
Acidez (ácido cítrico)	5.43 %
Aceite esencial	0.02 %
@Brix (refracción)	8.06 %
pH	2.5

Fuente: Determinaciones realizadas por el laboratorio de análisis especiales de la Comisión Nacional de Fruticultura (CONAFRUT).

IIIib. GENERALIDADES SOBRE VITAMINA B-12

IIIia. INTRODUCCION.

Las células vivas además de contener proteínas, ácidos nucleicos, glúcidos y lípidos, contienen sustancias orgánicas que actúan en cantidades mínimas siendo vitales para muchas formas de vida, llamadas "vitaminas", cuya importancia biológica fué descubierta por su ausencia y no por su presencia.

La función biológica principal de las vitaminas en las células es en forma de coenzima (transportadores intermediarios de grupos funcionales, de átomos específicos ó de electrones) en reacciones metabólicas específicas catalizadas por enzimas (tabla II).

La vitamina B-12 (cianocobalamina) fué descubierta en estudios sobre nutrición realizados en animales de laboratorio y en bacterias convergiendo en un compuesto común. En los primeros como respuesta hematopoiética de pacientes con anemia perniciosa y en la segunda basado en la purificación del factor de crecimiento de Lactobacillus leichmanii (Davis 1980).

IIIib. ANTECEDENTES HISTORICOS.

Muchos estudios se han realizado en torno a la aparición y obtención de la vitamina B-12 (tabla III).

No solo se tienen reportes de la obtención de vitamina B-12 por extracción a partir del hígado, sino también a partir de su síntesis química. Woodward y Eschenmoser emplearon 10 años para lograr los primeros pasos de sus síntesis hasta que en 1973 Krieger y Maugh requirieron 70 pasos para sintetizarla finalmente. Indudablemente estos procesos no son costeables para propósitos industriales, por lo que hoy en día debido a los altos costos y pocos rendimientos con los métodos de extracción y síntesis química, la vitamina B-12 se obtiene mediante procesos fermentativos evitando de esta forma los grandes costos y tiempos de producción (vía química) (Krieger 1973, Maugh 1973).

TABLA II . Formas Coenzimáticas de las vitaminas y sus reacciones de transferencia de grupos.

Vitamina	Coenzima o forma activa	Entidad transferida
<u>Hidrosolubles</u>		
Riboflamina	Flavin Mononucleótido (FMN) Flavin Adenin Dinucleótido (FAD)	Atomos de H (electrones) Atomos de H (electrones)
Tiamina	Tiamin Pirofosfato (TPP)	Aldehídos
Acido Nicotínico	Nicotin-amida Adenin Dinucleótido (NAD) Nicotinamida Adenin Dinucleótido Fosfato (NADP)	Atomos de H (electrones) Atomos de H electrones)
Acido Pantoténico	Coenzima A (CoA)	Grupos Acilos
Piridoxina	Fosfato de Piridoxal	Grupos Amino
Biotina	Biocitina	Dioxo de Carbono
Acido Fólico	Acido Tetrahidrofólico	Metilo, Metileno o Forminino
Vitamina B12	Coenzima B12	Grupos Alquilos
Acido Ascórbico	_____	Cofactor en hidroxilación
Acido Lipoico	Lipoil-lisina	Grupos Acilos e H.
<u>Liposolubles</u>		
Vitamina A	11-cis Retinal	Tiamina en el ciclo Visual
Vitamina D	1,25-Dihidróxicolecalciferol	" " " Metabolismo del Calcio y del Fosfato.
Vitamina E	_____	Funciona como Antioxidante
Vitamina K	_____	Funciona en la Biosíntesis de Protombina

Fuente: Lehninger 1981.

TABLA III. ANTECEDENTES HISTORICOS DE LA VITAMINA B-12

DESCUBRIMIENTO POR / AÑO	HECHO HISTORICO
Wipple and Roodscheit-Robins (1925)	El hígado de toro contiene un principio activo que ayuda a combatir la anemia perniciosa
Minot and Murphy (1928)	El principio activo es extraído del hígado empleando agua.
En 1940	Los caldos de fermentación para la producción de estreptomina ricos en vitamina B-12 era esencial para el buen desarrollo de los animales. Se descubre que la B-12 es un buen factor de crecimiento para <u>Lactobacillus lactis</u> . *
Emery and Hurrán (1945)	Obtuvieron un concentrado de 1 mg de B-12 a partir del hígado.
Emery and Parker (1946)	Obtuvieron 5.5 mg de este mismo activo.
Smith - (en Inglaterra) Folkens and et al. (1948)	Obtuvieron cristales puros de vitamina B-12.
Rickes and et al. Stokstan and et al. (1949)	Indican que la vitamina B-12 es un producto exclusivamente de origen microbiano.
Lester, Smith y Parkers (1950)	Reportan la preparación en forma pura de la B-12.
Hodgkin and et al. (1955)	Aclaran la estructura de la vitamina B-12 por cristalografía de rayos "X".

* Metzler 1977

Fuente: Krieger 1973 y Maugh 1973.

IIIic. ESTRUCTURA QUIMICA.

La estructura de la vitamina B-12 (Cianocobalamina, Cianurofosfato 3'-ester con 3,5-dimetil-1-alfa-D-ribofuranosilbencimidazol cobinamida) es muy compleja (figura 3), cuya fórmula es C-63 H-88 O-14 N-14 P y Co con un peso molecular de 1355.42 g/mol. Está formado principalmente de dos porciones:

a) Un grupo planar, macroanillo llamado corrina, es muy semejante al anillo de la porfina (figura 2a), contiene 4 anillos pirrólicos reducidos (de A a D) que se unen a un átomo central de cobalto, cuyas dos porciones de coordinación restantes están ocupadas por cianuro (CN) por encima del macroanillo y un nucleótido por debajo del mismo. Los anillos pirrólicos están unidos entre sí por puentes metenos similares a los encontrados en las porfinas a excepción de los anillos A y D que están unidos directamente entre los carbonos alfa. Sus anillos pirrólicos están extensamente sustituidos con grupos metilos y con residuos largos de la acetamida ó propionamida (figura 2b). Contiene una molécula de D-1-amino-2-propanol (figura 2c) unido a un residuo de propionamida del anillo pirrólico D.

b) Un nucleótido, situado casi perpendicular al grupo planar, cuya base es el 5,6-Dimetilbencimidazol unida a una ribosa por una unión alfa-glucosídica, a diferencia de las uniones beta típicas de los ácidos nucleicos. La ribosa se encuentra fosforilada en el carbono 3.

Existen dos conexiones entre las porciones planar y el nucleótido: 1) Una unión éster entre el fosfato del nucleótido y una fracción 1-amino-2-propanol, la cual está combinada en unión amida con una cadena lateral propiónica en el anillo D y 2) La unión coordinada entre el cobalto y el átomo de nitrógeno glioxalino del bencimidazol (Drill 1978, Lehninger 1981).

La vitamina B-12 (cianocobalamina) aislada inicialmente, contenía cianuro en una de las posiciones de coordinación del cobalto. Ocurre con menor frecuencia en la naturaleza, pero es generado a través de la adición de cianuro durante el procedimiento de extracción. El término genérico, cobalamina, se usa para designar a la molécula de vitamina B-12 menos el grupo cianuro y es prefijado por el grupo aniónico "R". La nomenclatura y estructura de la vitamina B-12 y algunos compuestos relacionados se muestra en la figura 3 y en la tabla IV.

IIIid. FUENTES DE OBTENCION

La vitamina B-12 no es sintetizada por animales o vegetales.

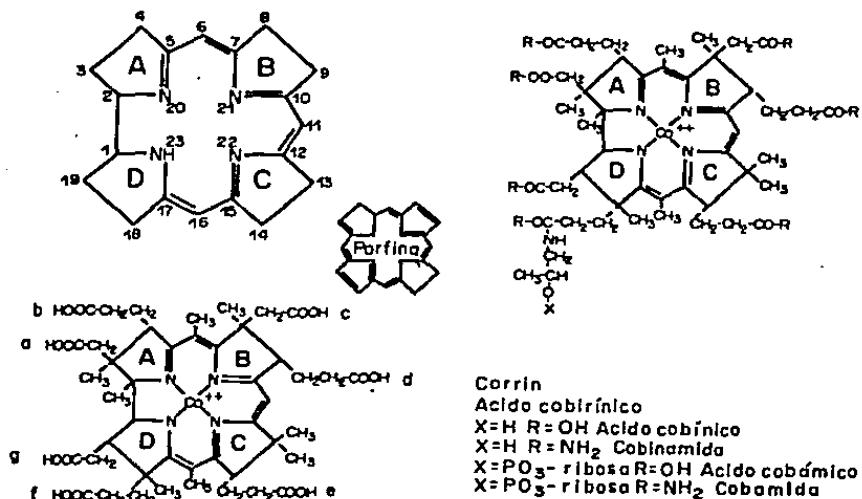


FIGURA 2. Nomenclatura Sistemática de la Vitamina B-12 y Compuestos Relacionados. El diagrama pequeño muestra la estructura de la porfina para comparación. Los anillos pirrólicos del macroanillo corrin se designan de A a D. Los grupos sustitutos acetamida y propionamida se designan de a a g. Drill 1978.

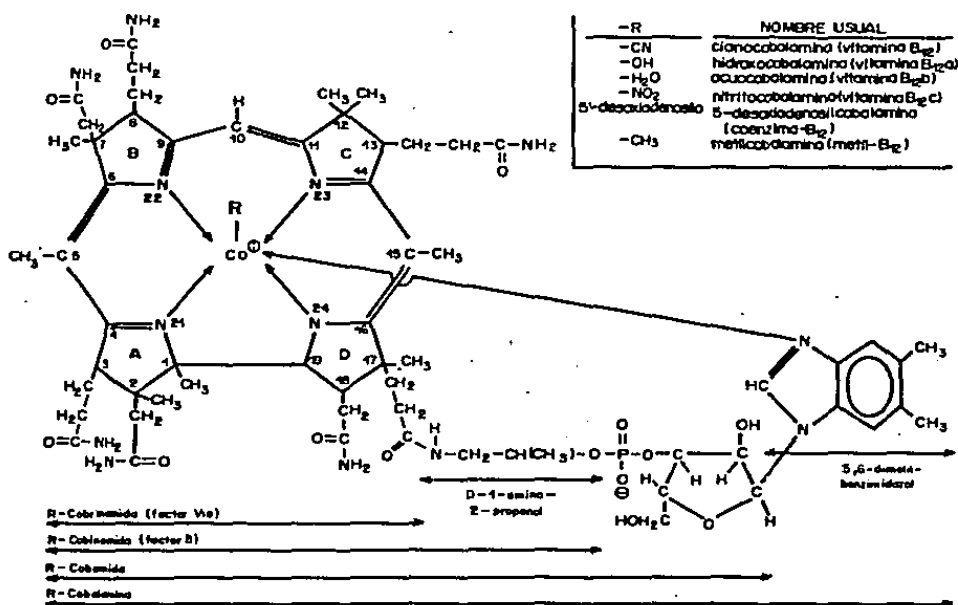


FIGURA 3. Fórmula Estructural de la Vitamina B-12 (Cianocobalamina).

TABLA IV. Vitamina B12 y algunos compuestos relacionados: nomenclatura y estructura

Nombre común	Nombre semi-sistemático	Nombre sistemático	Ligandos del cobalto		Estructura*
			Encima del plano	Debajo del plano	
Vitamina B12	Cianocobalamina	α -(5,6-Dimetil-benzimidazolil)-cianocobamida	CN	5,6-dimetilbenzimidazolil	
Vitamina B12a	Hidroxicobalamina	α -(5,6-Dimetil-benzimidazolil)hidroxicobamida	OH	5,6-dimetilbenzimidazolil	
Vitamina B12b	Acuocobalamina	α -(5,6-Dimetil-benzimidazolil)-acuocobamida	H ₂ O	5,6-dimetilbenzimidazolil	
	Diacuocobalamina	α -(5,6-Dimetil-benzimidazolil)-diacuocobamida	H ₂ O	H ₂ O	
Vitamina B12c	Nitrocobalamina	α -(5,6-Dimetil-benzimidazolil)-nitrocobamida	NO ₂	5,6-dimetilbenzimidazol	
Seudovitamina B12		α -(Adeninil)cianocobamida	CN	Adeninil	
Factor B	Atiocobalamina	Cianocobinamida	CN-	H ₂ O	
Factor B ribosa-fosfato	Atio-cobalamina fosforibosa	Cianocobamida	CN-	H ₂ O	
	Desoxiadenosil-cobalamina	α -(5,6-Dimetil-benzimidazolil)-5'-desoxiadenosil-cobamida	Ad-	5,6-dimetilbenzimidazolil	
Metil B12	Metilcobalamina	α -(5,6-Dimetil-benzimidazolil)metilcobamida	CH ₃		

* La nomenclatura estructural se explica en el texto

Fuente: Drill 1978.

Sin embargo algunos animales son portadores de este metabolito. Su fuente original y única en la naturaleza es la producida por los microorganismos que crecen en el suelo, desagües, agua, abonos, intestinos y panzas de ruminantes (Drill 1976, Goodman 1978).

Las fuentes alimenticias ricas en cobalamina con más de 10 ug/100 g de peso húmedo son: hígado, riñones, corazón de cordero y de buey; las ostras y las almejas que toman del mar microorganismos que sintetizan vitamina B-12. De 3 a 10 ug/100 g de peso seco: la leche descremada, en polvo, algunos alimentos marinos (cangrejos, ciertos peces de las rocas, salmones y sardinas) y la yema de huevo. De 1 a 3 ug/100 g de peso húmedo: carnes musculares, algunos alimentos marinos (langosta, vieira, lenguado, el baddock "pez semejante al pez bacalao), el pez espada y el atún) y algunos quesos (camembert, limburgo). Menos de 1 ug/100 g de peso húmedo en productos lácteos líquidos, crema, queso cheddar y tipo cottage (Goodman 1978).

Su existencia en los tejidos animales procede de los alimentos y de la síntesis microbiana en el tubo digestivo.

De los microorganismos que sintetizan vitamina B-12 por arriba de sus necesidades, se pueden citar a *Propionibacterium shermanii*, *Streptomyces griseus* (productor de estreptomycin) y *Streptomyces aureofaciens* (aureomicina), *Pseudomonas denitrificans*.

IIIie. USOS TERAPEUTICOS

La vitamina B-12 es ampliamente usada debido a que no presenta efectos tóxicos. Se emplea en el tratamiento de la hepatitis infecciosa, la esclerosis múltiple, la neuralgia del trigémino, como estimulante del apetito, en diversas neuropatías, en el crecimiento deficiente, alteraciones psiquiátricas, el envejecimiento, la esterilidad, varias formas de desnutrición, alteraciones dermatológicas, tirotoxicosis, como placebo y como "tónico". La vitamina B-12 se ha utilizado ampliamente como complemento nutritivo para animales de granja y aves de corral (Meyers 1980, Drill 1978, Goodman 1978). El único uso clínico establecido es en el tratamiento de la anemia perniciosa.

IIIif. FUNCIONES METABOLICAS

Las cobalaminas intervienen en muchos sistemas metabólicos en el hombre. Son esenciales para el crecimiento y nutrición normal, para la hematopoyesis normal, para la producción normal de todas las células epiteliales (incluyendo las del tubo digestivo) y para conservar la mielina del sistema

nervioso. Son tres los sistemas de enzimas cobamida-dependientes de mayor importancia fisiopatológica en el hombre (Conn 1976, Metzler 1977, Lehninger 1981):

- a) - Sistema metilmalonil-Coa mutasa desoxiadenosilcobalamina dependiente.
- b) - Sistema ribonucleótido reductasa.
- c) - Sistema de la sintetasa de metionina metilcobalamina dependiente.

III19. MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE VITAMINA B-12

Varios microorganismos sintetizan vitamina B-12, algunos lo hacen en cantidades mínimas necesarias, otros la sintetizan en exceso. Existen microorganismos que la necesitan exógenamente para poder crecer (*Lactobacillus leichmanii*, *L. lactis*) y otros no parecen requerirla ni mucho menos pueden sintetizarla (*E. coli*). La concentración de vitamina B-12 necesaria para obtener un crecimiento máximo es muy variable, pero en general se estima de 1 a 50 ng/ml (Rose 1977).

La vitamina B-12 es producida principalmente por Actinomicetos y bacterias (Darken 1953). Entre los primeros se encuentran las especies de *Nocardia rugosa* y *N. garneri* quienes producen principalmente 5'-Deoxiadenosilcobalamina en un 80 % y el género *Streptomyces* quien produce generalmente hidroxocobalamina. Entre las bacterias destacan: *Propionibacterium freudenreichii* (produce 5'-hidroxiadenosilcobalamina en un 80 %), *P. shermanii* (produce 5'-hidroxiadenosilcobalamina en un 80 % e hidroxocobalamina), y *Pseudomonas denitrificans*.

No todos los microorganismos sintetizan cianocobalamina como tal, sino la producen en forma de pseudovitamina.

Las cobalaminas son frecuentemente encontradas en la naturaleza como una mezcla de ciano-, hidrox-, deoxiadencil- y metil-cobalamina. Estas cuatro formas tienen importante actividad metabólica en los organismos vivos. La hidroxocobalamina fué primeramente aislada de *Streptomyces*, productores de antibióticos y también de *P. shermanii*. La coenzima B-12 (deoxiadenosilcobalamina) siempre es endocelular (en cepas silvestres), puede ser extraída y estabilizada con cianuro a diferencia de la metilcobalamina quien no reacciona con este radical (Florent and Ninent 1979).

De los microorganismos productores pocos son o han sido empleados a escala industrial (tabla V), de los cuales destacan las especies de *Propionibacterium* y *Pseudomonas denitrificans* como los mejores productores de vitamina B-12 (Perlman 1978, Florent and Ninent 1979).

TABLA V. PRODUCCION DE VITAMINA B₁₂ POR VARIOS MICROORGANISMOS

Cepa	Fuente de carbono	Rendimiento (mg / l)	Referencias
<u>Micromonospora</u> sp.	Glucosa	11.5	Wagman, <u>et al.</u> (1969)
<u>Nocardia rugosa</u>	Glucosa-melazas de caña	14	Farmaceutici Italia (1970)
<u>Propionibacterium freudenreichii</u>	Glucosa	25	Uclaf (1960)
<u>Propionibacterium shermanii</u>	Glucosa	23	Speedie and Hull (1960)
<u>Propionibacterium shermanii</u>	Glucosa	28	Chincin Gyosyszer (1965)
<u>Propionibacterium shermanii</u>	Glucosa	39	Pierrel S.p.A. (1965 b)
<u>Propionibacterium vannielli</u>	Glucosa	25	Piva R. F.K.P. (1964)
<u>Pseudomonas denitrificans</u>	Melazas de remolacha	59	Merck and Co. (1971)
<u>Streptomyces olivaceus</u>	Glucosa lactosa	8.5	Terada, <u>et al.</u> (1959)
<u>Mezcla de bacterias metanogénicas</u>	Metanol	35	Richter Gedeon V.G. (1966)
<u>Bacterium</u> FM 021	Metanol	2.6	Toraya, <u>et al.</u> (1975)
<u>Metano bacillus omelianski</u>	Metanol	8.8	Pantskhava, Bykhosky (1966)
<u>Protoaminobacter ruber</u>	Metanol	2.5	Kojima, <u>et al.</u> (1976)
<u>Corinebacterium</u> y <u>Rhodopseudomonas</u>	n-Parafins	23	Nakao, <u>et al.</u> (1974)
<u>Nocardia gardner</u>	Hexadecano	4.5	Kyowa Hakko, Kogyo Co. LTD. (1970)

Fuente: Florent and Ninet, 1979.

IIIh. PROCESOS FERMENTATIVOS PARA LA PRODUCCION DE VITAMINA B-12.

En algunos procesos de fermentación, los rendimientos de vitamina B-12 van correlacionados con el crecimiento microbiano; por lo que parte de los estudios para aumentar su producción están dirigidos a incrementar el crecimiento del microorganismo (Ferlman 1978).

Industrialmente las Propionibacterias y las Pseudomonas son los microorganismos más importantes dado que proporcionan buena producción de vitamina B-12. Por tal motivo son empleados en estudios para incrementar la producción de este metabolito e incluso participan en los procesos fermentativos que se encuentran pantetados.

Las Propionibacterias son microorganismos microaerofílicos, producen cobaltocorrinoides en medios de cultivos con carbohidratos convencionales (glucosa o melasas invertidas, 10 a 100 g/l), complementado con sales de cobalto (10 a 100 mg/l). Sin aeración producen principalmente adenosilcobalamina dependiendo del suplemento interno o externo del 5,6-DMB.

Los procesos con *E. freudenreichii* ATCC 6207 y con *E. shermanii* ATCC 13673 (subespecies y mutantes) resultan ser muy importantes ya que pueden sintetizar bajo condiciones aeróbicas su propio 5,6-DMB.

En virtud de sus características microaerofílicas y la propiedad que tienen de sintetizar su propio 5,6-DMB se recomienda que el proceso de producción de este metabolito se realice en dos etapas de aeración. La primera bajo condiciones anaeróbicas hasta casi el total consumo de sus azúcares con el fin de promover el crecimiento del microorganismo y la producción del factor B (cobinamida); la segunda bajo condiciones aeróbicas para facilitar la formación del 5,6-DMB y promover su unión con el factor B y formar finalmente el 5,6-dimetilbencimidazol-cobamida-5-deoxiadenosina (5'-deoxiadenosilcobalamina). Estas dos etapas pueden realizarse en un solo fermentador o bien en un sistema de dos fermentadores.

Uno de los procesos que emplean dos etapas para la producción de la vitamina B-12 es el de Speedie and Hull (1960), donde la parte anaeróbica consta de 2 a 4 días y la aeróbica de 3 a 4. Un sistema de fermentación continua en dos etapas basado en el proceso antes mencionado es descrito por Riley et al. (1961) quien produjo vitamina B-12 y un análogo.

De 2 mg/l obtenidos de esta vitamina la producción pasó rápidamente a 50 mg/l y posteriormente a 100 - 120 mg/l en los últimos años. La patente de Aries (1974) permite duplicar la última cifra obteniendo cristales puros de vitamina B-12

con un rendimiento del 90 % empleando una cepa mutante de E. freudenreichii ATCC 6207 en una fermentación de dos etapas y con adiciones de precursores en el medio de fermentación.

Pseudomona denitrificans es una cepa muy productora de vitamina B-12. En contraste con las fermentaciones con Propionibacterias, el crecimiento de este microorganismo avanza al mismo tiempo que la biosíntesis de la cobalamina bajo condiciones aeróbicas y con agitación a lo largo de la fermentación. Esta cepa requiere de la adición de sacarosa, extracto de levadura y varias sales minerales en el medio de crecimiento en el cual también se deben incluir 5,6-DMB (10 a 25 mg/l) y nitrato de cobalto (40 a 200 mg/l) con el fin de incrementar la producción de vitamina B-12. La betaina se adiciona con el objeto de favorecer alguna etapa de la biosíntesis o probablemente con el fin de modificar la superficie de la célula haciéndola más permeable a los sustratos y ayudando a la excreción de productos de desecho (Perlman 1976, Florent an Ninent 1979). La betaina puede ser sustituida por las melasas de betabel (20 - 120 mg/l), las cuales tienen un alto contenido de ácido glutámico que estimula el crecimiento de la bacteria. Su temperatura óptima es de 20 °C y su pH de 7.0.

Daniels (1970) probó el efecto de algunos precursores y cofactores sobre la producción de vitamina B-12 en un medio constituido por sacarosa, ácido glutámico y sales minerales. Empleó a Ps. denitrificans y encontró que solo la betaina y el cobalto son esenciales para la producción de vitamina B-12. La glicina inhibe el crecimiento, el ácido láctico, el 5,6-DMB y el molibdeno estimulan la síntesis de esta vitamina. Especialmente el ácido oxálico a una concentración de 0.4 % (p/v) incrementa la producción en un 20 %. La metionina, ácido d-aminolevullínico, ácido succínico y 1-amino-2-propanol no presentan efecto sobre la producción de este metabolito.

Entre las compañías mundialmente productoras de vitamina B-12 se encuentran: Farmitalia S. P. A. (Milano Italia); Glaxo Laboratories, Ltd. (Greenford, England); Merck and Company, Inc. (Rahway, New Jersey); Rhone Poulenc (Paris Francia); Roussel U. U. L. A. F. (Romainville, Francia); G. Richter Pharmaceutical Company (Budapest, Hungary) and Chinoin (Hungary) (Perlman 1977). En conjunto la producción mundial de vitamina B-12 es de 10 toneladas.

Los procesos donde se emplean a las Propionibacterias en comparación a aquellos donde utilizan a Pseudomonas denitrificans resultan ser más ventajosas ya que sus requerimientos nutricionales no son tan exigentes ni requieren de aeración y/o agitación excesiva ya que se tratan de microorganismos microaerofílicos, características que ocasionan un proceso menos costoso.

III. MEDIOS DE FERMENTACION PARA LA PRODUCCION DE VITAMINA B-12.

Los microorganismos productores de vitamina B-12 son mesófilos (su temperatura óptima de crecimiento es de 29 a 31 °C), sus pHs son cercanos a la neutralidad (6.5 a 7.5), requieren de oxígeno (en algunos casos en dos etapas de aeración, anaeróbica y aeróbica), de algunos iones metálicos y de algunos factores de crecimiento.

Durante mucho tiempo la vitamina B-12 fué aislada como un subproducto de los procesos fermentativos para la obtención de antibióticos. Sin embargo debido al incremento en la demanda, este tipo de fermentación dual no podía proporcionar cantidades suficientes de vitamina, por lo que fué necesario desarrollar procesos individuales de ambos metabolitos.

El medio de fermentación para la producción de vitamina B-12 está constituida básicamente por una fuente de carbono (principalmente carbohidratos), una fuente de nitrógeno, y una sal de cobalto. Además necesita ser complementado de iones tales como: magnesio, manganeso, fierro y principalmente cobalto. En algunos casos es necesario la adición de factores de crecimiento (como pantotenato de calcio y biotina para *P. shermanii* y ácido glutámico en *Es. denitrificans*) y precursores de vitamina B-12 con el fin de incrementar su producción.

Entre las materias primas que pueden ser empleadas como fuentes de carbono se encuentran a la glucosa, maltosa, xilosa, azúcar invertido, jarabe de malz, sacarosa, betabel, caña, melazas de zanahoria, almidón, hidrolizados de almidón, y compuestos orgánicos (particularmente ácido láctico) en concentraciones de 0.5 a 10 % por peso de medio de cultivo.

Entre las fuentes de nitrógeno se tienen: frijol de soya, avena, malz, trigo y otros granos que contengan proteínas. Levadura, extracto de levadura, caseína digerida, extracto de carne, harina de sangre, desecho de carne y hueso, harina de pescado, solubles de pescado, peptona, harina de cacahuete, harina de semilla de algodón, licor de malz extracto de malta, extracto malteado de cereal y destilados solubles, en concentraciones de 1 a 5 % por peso o más de medio de cultivo. Se sugiere que el licor de malz se emplee en los medios de cultivos para Propionibacterias ya que proporcionan ácido láctico y pantoténico, factores que incrementan el crecimiento microbiano y la producción de dicha vitamina.

El medio de fermentación para la producción de vitamina B-12 también necesita de sales nutritivas tales como: sulfato de amonio, sulfato de magnesio (Vorob'eva and Kuznetzova 1964), fosfato dibásico de potasio, sales de cobalto (en forma de cloruro, sulfato o nitrato) y cianuro de sodio (Lim 1968).

La tabla VI muestra algunos medios y condiciones de fermentación para la producción de vitamina B-12 así como a los microorganismos que la producen. De todos ellos el proceso que más destaca es el de Speedie and Hull (1960).

Como otros ejemplos se tiene a la patente de Sudarsky y Fisher (1957), cuyo medio de cultivo está constituido por melazas, autolizados de desechos de levadura y amonio acuoso. Emplean una temperatura de incubación de 30 °C, un pH ajustado entre 6.5 a 7.0 y emplean como microorganismos de fermentación *Propionibacterium freudenreichii*. En la patente de Aries, el medio de cultivo está constituido por cerelesa (60 g/l), licor de malz líquido (55.2 g/l), fosfato monobásico de potasio (1.2 g/l), fosfato dipotásico (1.68 g/l), benzoato de sodio (1.4 g/l) y precursores (ácido pantoténico, ácido paraaminobenzoico y 5,6-DMS en partes iguales, 8.0 mg/l). Emplean una temperatura de incubación de 29 °C y un pH ajustado entre 6.5 a 7.0 y el microorganismo que utilizan es *P. freudenreichii* ATCC 6207 (mutante).

Se han realizado algunas investigaciones tendientes a reemplazar a los carbohidratos por alcoholes (principalmente metanol) e hidrocarburos (hexano, n-parafinas) como fuente de carbono con el fin de abaratar los procesos de producción de vitamina B-12. Hasta la fecha los procesos encontrados aún no alcanzan los niveles de producción obtenidos por los métodos convencionales. Entre dichas investigaciones destacan las realizadas por Kamikubo (1978), Toray (1975 y 1976), Yamane (1976), Nishio (1977), Dumenil (1979 y 1981) y Tsuchiya et al. (1980).

En un medio de fermentación para la producción de vitamina B-12 es importante considerar los niveles de ciertos iones metálicos.

El ión cobalto adicionado al medio de fermentación depende de la cantidad presente en los componentes del medio y de la tolerancia del microorganismo a este ión. Se ha encontrado que la influencia del cobalto adicionado es más pronunciado en condiciones aeróbicas que anaeróbicas.

El ión cobre en poca cantidad ayuda a la producción de vitamina B-12, pero en exceso bloquea su formación. No es éste el caso para algunos microorganismos donde el cobre favorece tanto el crecimiento como la producción de este metabolito.

En algunas investigaciones se ha establecido que el zinc es esencial para la síntesis de vitamina B-12. Mientras que el molibdeno, cromo y manganeso no son favorables para su producción (en concentraciones de 2, 5 y 10 ppm, respectivamente) pero sí para el crecimiento del microorganismo.

El boro inhibe el crecimiento y el níquel tanto al

TABLA VI.

PROCESOS PARA LA PRODUCCION DE VITAMINA B₁₂.

MICROORGANISMO	CONSTITUYENTES DEL MEDIO	RENDIMIENTO DE VITAMINA B ₁₂ (mg/l)	CONDICIONES	REFERENCIA
<u>Bacillus megaterium</u>	Melazas de betabel, fosfato de amonio, sal de cobalto, sales inorg.	0.45	Fermentación Aerada (18 h)	Lewis et al. (1949)
<u>Propionibacterium freudenreichii</u>	Agua de cocimiento de maíz, glucosa, sal de cobalto, mantenido a Ph de 7 con NH ₄ OH.	19.0	Tres días anaeróbico y tres días aeróbico.	Speedie and Hull (1960)
<u>Propionibacterium freudenreichii</u>	Agua de cocimiento de maíz (6 autolizado de micelio de Penicillium), glucosa, sal de cobalto, mantenido a pH de 7 con NH ₄ OH.	8.0	Fermentación continua en dos etapas; tiempo de retención de 33 h.	Riley et al. (1961)
<u>Propionibacterium shermanii</u>	Agua de cocimiento de maíz, sal de cobalto, mantenido a pH de 7 con NH ₄ OH.	23.0	Tres días anaeróbico y cuatro días aeróbico.	Speedie and Hull (1960)
<u>Streptomyces spp.</u>	Harina de soya, glucosa sal de cobalto, K ₂ HPO ₄ .	5.7	Fermentación aerada durante 6 días.	Págano and Greenspan (1954)
<u>Streptomyces olivaceus</u>	Harina de soya, glucosa, destilados solubles, sal de cobalto, sales inorg.	3.3	Fermentación aerada durante 6 días.	Hall et al. (1953)
<u>Micromonospora spp.</u>	Harina de soya, glucosa CaCO ₃ , sal de cobalto	11.5	Fermentación aerada durante 7 días.	Wagman et al. (1969)
<u>Pseudomonas denitrificans</u>	Sacarosa, detaina, ácido glutámico, sal de cobalto, 5,6-dimetilbenzimidazol, sales.	15.0	Fermentación aerada durante 2 días.	Deman et el. (1968)
<u>Butyrbacterium Fettgeri</u>	Agua de cocimiento de maíz, sal de cobalto, glucosa, mantenido a un pH de 7 con NH ₄ OH.	5.0	Fermentación anaeróbica durante 4 días	Perlman and Senar (1963)

Este metabolito se produce en forma de coenzima de vitamina B₁₂ (5,6-dimetil-a-benzimidazolcobamida-5'-deoxidadenosina), la vitamina B₁₂ frecuentemente se aisla en forma de cianó.

FUENTE: Perlman 1978.

crecimiento como a la producción de vitamina B-12 en concentraciones de 0.2 ppm.

El magnesio en concentraciones de 50 a 100 ppm favorece la producción de vitamina B-12.

El hierro juega un papel muy importante en la biosíntesis de los tetrapirroles (ver regulación de los tetrapirroles IIIii), ya que forma parte del hemo, compuesto que en muy poca concentración puede llegar a inhibir o reprimir la primera enzima de la ruta biosintética (Lascelles 1960, Burnham and Lascelles 1963, Lascelles and Hatch 1969), misma ruta que emplean ciertos microorganismos para producir vitamina B-12, la cual corre el riesgo de ser inhibida por la presencia de este ión y desviar la síntesis hacia la producción del grupo hemo.

IIIij. Propionibacterium shermanii CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE VITAMINA B-12.

Las propionibacterias son generalmente caracterizadas como: gram positivas, catalasa positivas, no forman esporas, no son móviles, crecen bajo condiciones anaeróbicas y aeróbicas, no son proteolíticas, sus requerimientos nutricionales son pocos. Crecen en presencia de aminoácidos, pero no son esenciales (Wood 1938), requieren de pantotenato de calcio y biotina como los principales factores de crecimiento (Delwich 1949). Requieren de ciertos minerales y extracto de levadura para su buen crecimiento y metabolismo. La riboflavina (0.05 gamas/ml) y la tiamina en cultivos con sulfato de amonio estimulan el crecimiento (Wood 1938).

En Propionibacterium freudenreichii la glucosa es más eficiente como fuente de energía, pero la mejor producción de vitamina B-12 se obtiene al emplear ácido láctico como fuente de carbono. En P. shermanii, la velocidad de crecimiento es la misma en glucosa y lactato como fuentes de carbono con un rendimiento molar celular de 8.35 veces más grande en glucosa que en lactato. En una mezcla de ambas fuentes de carbono presenta un crecimiento diauxico utilizando primero el lactato y posteriormente la glucosa sin presentar dos fases en la curva de crecimiento (Inn Hee Lee 1974).

La producción de vitamina B-12 se realiza en dos etapas, la primera bajo condiciones anaeróbica en la cual hay formación del factor B y la segunda bajo condiciones aeróbicas en la cual se forma el nucleótido 5,6-Dimetilbencimidazol (5,6-DMB) y se une al primero para formar vitamina B-12 en forma de 5'-deoxiadenosilcobalamina (en un 80 %) y de hidroxocobalamina.

Las bacterias ácido propiónicas forman vitamina B-12 en condiciones favorables de potencial redox (Vorob'eva 1962, Kramli and Vorob'eva 1974). En la práctica, la acumulación de vitamina B-12 se observa al segundo día del crecimiento bacteriano.

Las bacterias ácido propiónicas tienen completas las enzimas del ciclo de Kreb's y forman cantidades considerables de catalasa, característica que indica que pueden ser adaptadas a crecer bajo condiciones aeróbicas. Incorporan oxígeno molecular a su metabolismo, por lo que condiciones estrictamente anaeróbicas no son óptimas para su crecimiento (Ibragimova and Shul'govskaya 1979).

La velocidad específica de crecimiento es significativamente mayor a pHs neutros que a pHs ácidos y alcalinos. Conforme aumenta la aeración del medio, la cantidad de ácidos volátiles (propiónico y acético) disminuyen y la constante de inhibición (K_i) aumenta (Ibragimova et al. 1979).

La presencia de citocromos y del ciclo del ácido cítrico en *P. freudenreichii* (De Vries 1972) y en *P. pentosaceum* (Delwiche & Carson 1953) son típicos del metabolismo aeróbico con energía generada por la fosforilación oxidativa. Por lo tanto, los experimentos de De Vries (1972) indican que la energía para el crecimiento de las Propionibacterias bajo condiciones aeróbicas es tomada de la fosforilación oxidativa.

Las bacterias ácido propiónicas tienen un sistema de transporte de electrones unido a membrana (posiblemente citocromos b y d, Pritchard 1980) que cataliza la transferencia de equivalentes reducidos de NADH, glicerofosfato y lactato a oxígeno y fumarato (Sone 1972, De Vries et al. 1972, 1973). El citocromo b participa en el sistema de electrones anaeróbico a fumarato. Poco se conoce de los componentes del camino aeróbico en Propionibacterias a pesar de la habilidad que tienen para usar el oxígeno como un aceptor de electrones.

En Propionibacterias se han realizado muchos estudios en torno a factores que presentan efecto sobre el crecimiento y producción de vitamina B-12. Algunos de ellos modifican medios y condiciones de fermentación. Se ha encontrado que 27 y 30 °C es una temperatura donde *P. shermanii* presenta su máxima velocidad de crecimiento y entre 18 a 25 °C un alto contenido de corrinoídes (Zodrow 1963 a). Existe un efecto sinérgico entre pantotenato de calcio y biotina sobre el crecimiento del microorganismo y solo el primer factor sobre la producción de vitamina B-12 (Zodrow 1963 b). En presencia de hidrolizado alcalino de caseína, el crecimiento y producción de ese metabolito ofrecen un buen comportamiento (Zodrow 1963 c). La adición de 1 mg de 5,6-DME al 60. día de fermentación de un medio con glucosa e hidrolizado ácido de caseína bajo condiciones anaeróbicas-aeróbicas, incrementa la producción de vitamina B-12 y la adición de este mismo precursor al comienzo de la misma inhibe la producción de corrinoídes (Zodrow 1963 d). La inhibición de vitamina B-12 también ocurre al adicionar sulfato de manganeso (0.01 %) a una fermentación de 6 días (Vorob'eva and Kusznetsova 1963). Un medio con glucosa, extracto de levadura y glicina (0.1 a

0.3 %) favorece que la producción de vitamina B-12 se incremente (Lim 1968). Con un medio de fermentación a base de suero de leche, el crecimiento de *E. skermanii* y la producción de este metabolito presentan comportamientos muy semejantes a los encontrados con otros sustratos (Bullerman and Berry 1966 a). La adición de 5 ppm de cobalto y 10 ppm de 5,6-DMB en ausencia de aeración son adecuadas para obtener una buena producción de vitamina B-12 (Bullerman and Berry 1966 b y c).

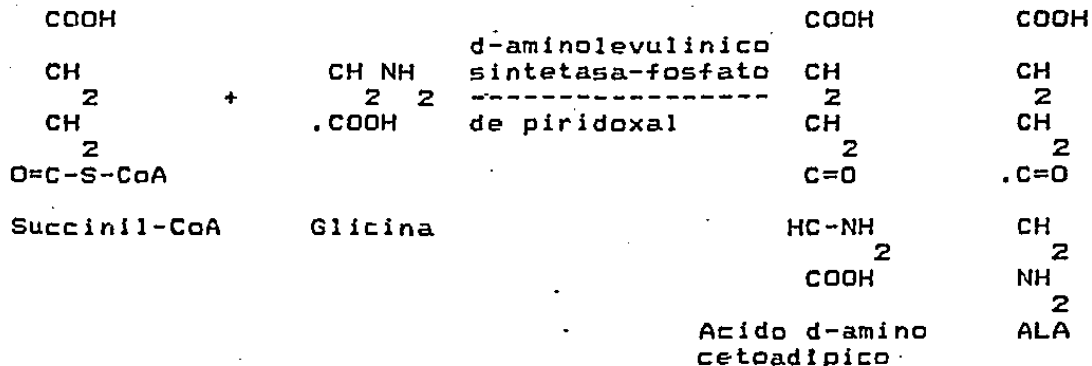
Como se puede observar, muchos factores deben ser considerados para conformar un medio de fermentación adecuado si se desea incrementar la producción de vitamina B-12 empleando a *E. skermanii* como microorganismo productor.

IIIik. BIOSINTESIS DE VITAMINA B-12

La vitamina B-12 es sintetizada principalmente por microorganismos: aerobios anaerobios ó aerotolerantes. Estos últimos requieren de condiciones anaeróbicas y aeróbicas para sintetizarla (Propionibacterias). La ruta para la biosíntesis de vitamina B-12 en su totalidad es la misma independientemente de las características de aeración del microorganismo. Sus precursores de partida son diferentes. Como ya se mencionó anteriormente, la vitamina B-12 está formada por un anillo de corrina y un nucleótido (5,6-DMB). El precursor del primero es el ácido d-aminolevulinico. Este y el 5,6-DMB son los dos compuestos que convergen en la ruta biosintética de esta vitamina independientemente de los precursores iniciales que los forman en cada uno de estos microorganismos.

Biosíntesis del Ácido d-aminolevulinico (ALA).

En todos los tetrapirroles existentes en la naturaleza (figura 4) la primera etapa de su biosíntesis convergen en la formación de este ácido.



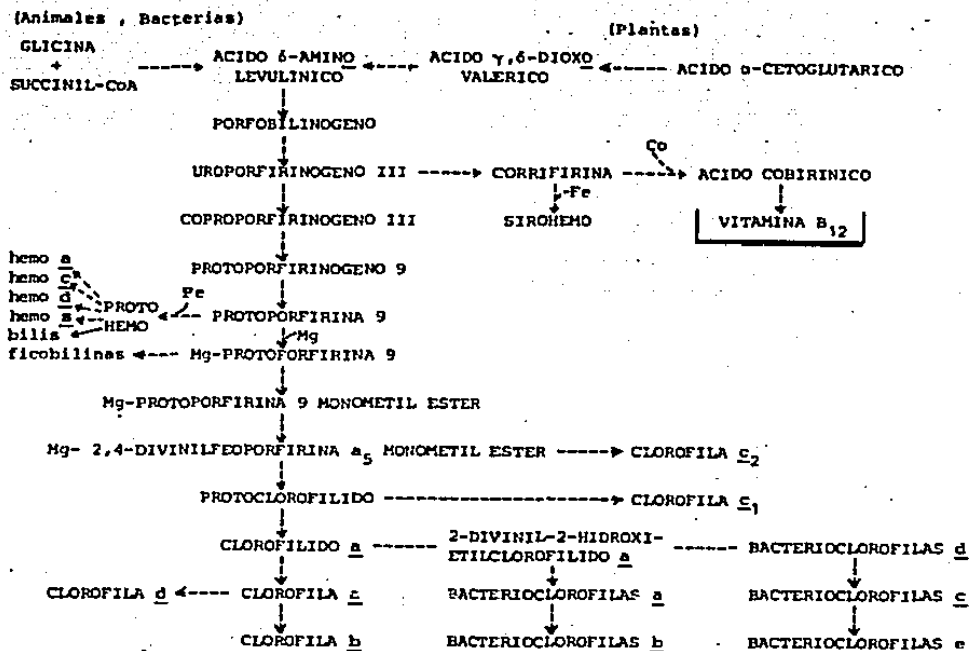


FIGURA 4. Camino Biosintético de los Tetrapirroles. Los hemos, corrinas, clorofilas y bilis son productos del camino multirramificado, teniendo un intermediario común. Etapas tentativas y caracterizadas incompletamente son indicadas con líneas punteadas. Granick and Beale 1978.

Biosíntesis del 5,6-DME

Dentro de los microorganismos que biosintetizan vitamina B-12 y que han sido estudiados para conocer su ruta biosintética se tienen (Hollriegel 1982):

Microorganismos Aeróbicos

Bacillus megaterium
Pseudomonas denitrificans
Streptomyces sp
Mycardia rugosa

Microorganismos anaeróbicos

Eubacterium limosum
Clostridium barkeri
Cl. thermopasticum

Microorganismos microaeróbicos

Propionibacterium shermanii
E. freudenreichii

En los microorganismos aeróbicos y microaeróbicos, este nucleótido se sintetiza a partir de la riboflavina; mientras que en los anaeróbicos se sintetiza a partir de glicina (figura 5).

Los estudios hasta ahora realizados en torno a la biosíntesis de la vitamina B-12 (Granick and Beale 1978, Gibson et al. 1961, Lascelles 1961, Friedmann and Cagen 1970, Scott 1975, Battersby and McDonald 1976) convergen con la ruta general que se muestra en la figura 5 (Florent and Ninet 1978, Bykhovskii and Zaitseva 1976).

III.1. REGULACION DE LA SINTESIS DE TETRAPIRROLES (VITAMINA B-12)

Entre los factores que regulan la síntesis de tetrapirroles se encuentran: el grupo hemo ó hemina, el oxígeno, la luz y el hierro (figura 6). Esta regulación principalmente se lleva a cabo a nivel de la primera y con muy poca frecuencia en la segunda enzima de la vía biosintética, la d-ALA sintetasa y la d-ALA dehidratasa, respectivamente.

El oxígeno puede reprimir ó inducir la síntesis de tetrapirroles dependiendo del organismo, como por ejemplo en levaduras induce la formación de hemo mientras que en la mayoría de los sistemas que se han estudiado inhibe ó reprime esta vía biosintética.

Existe un nivel óptimo de oxígeno para la síntesis de porfirinas y su efecto parece ser que lo lleva a cabo a nivel de la conversión de PBG a uroporfirinógeno III (Burham 1969).

En E. shermanii, el oxígeno es un factor importante en la

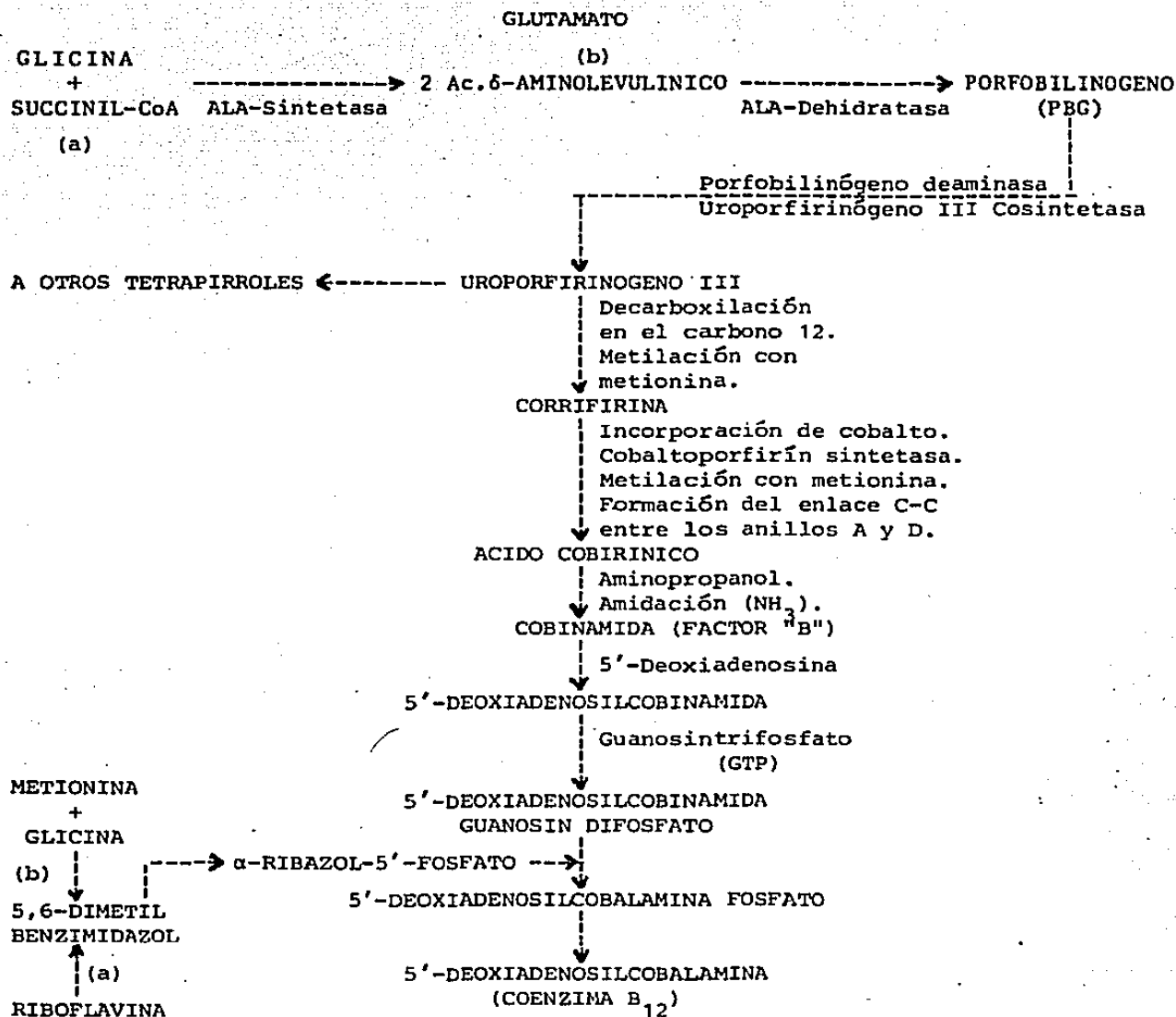


FIGURA 5. Ruta Biosintética para la Formación de Vitamina B-12. (a) Ruta biosintética presentada por microorganismos aeróbicos y aeróbicos aerotolerantes. (b) Ruta biosintética en microorganismos anaeróbicos.

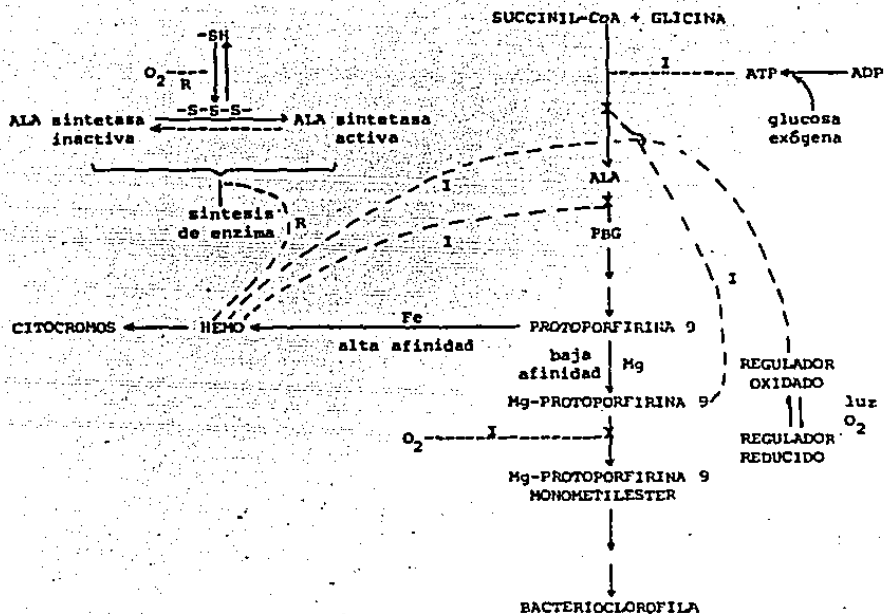


FIGURA 6. Regulación de la Síntesis de Tetrapirroles en *Rhodospseudomonas spheroides*. La tensión de oxígeno es el regulador primario en la etapa de inserción del magnesio. Mg-Protoporfirina 9 y/o hemo están regulados en las primeras etapas por inhibición y represión. Las líneas punteadas y las cruces indican retroalimentación negativa. Granick and Beale 1978.

producción de vitamina B-12. Se ha detectado mayor actividad de las enzimas ALA sintetasa y ALA dehidratasa en extractos de este microorganismo crecidos anaeróbicamente (Menon and Shemin 1967) y de 250 a 700 veces más vitamina B-12 bajo condiciones anaeróbicas comparadas con la producción aeróbica (Friedman and Cagen 1970). Durante el crecimiento anaeróbico, el contenido total de corrinoïdes, es paralelo a la masa celular, pero la formación de la molécula de vitamina B-12 se logra en la última etapa del crecimiento logarítmico y en fase estacionaria (Granick and Beale 1978). En estudios realizados con Propionibacterias encontraron que la aeración reprime en mayor grado la síntesis de citocromos en *E. fraudenreichii* y *E. shermanii* que en *E. pentosaceum* y *E. rubrum* (De Vries et al 1972).

Se ha encontrado que la presencia ó ausencia de oxígeno puede afectar la acción de una ó más de las enzimas en la vía biosintética de tetrapirroles de forma directa ó indirecta, causado por la acumulación de una sustancia activadora (obtenida en células crecidas en condiciones anaeróbicas) ó inhibidora (obtenida en células crecidas en condiciones aeróbicas) de la actividad de la ALA sintetasa (Marriot et al. 1969). Esta sustancia regulatoria posiblemente sea sensible a las condiciones oxidoreductoras en la célula. Se convertirla en su forma oxidada a altas tensiones de oxígeno ó en presencia de luz y de esta forma inhibir la síntesis de bacterioclorofila (Burham 1969).

Un cultivo de *E. shermanii* crecido 3 días en un medio conteniendo vitamina B-12 no produjo corrina (Bykhovskii and Zaitseva 1976), indicando inhibición de su propia síntesis.

IIIim. IMPORTANCIA COMERCIAL DE LA VITAMINA B-12.

La vitamina B-12 no solo se emplea en la industria Farmacéutica, sino también en la industria Alimentaria, este último como complemento alimenticio en humanos y en alimentos balanceados para la alimentación de ganado, ya que permite la mejor asimilación de proteínas vegetales.

La vitamina B-12 no se produce en México por lo que año con año se tiene que importar en grandes cantidades para cubrir la demanda interna (tabla VII). Dichos valores de importación son indicativos del amplio mercado que se presenta en nuestro país y como consecuencia representa una fuga de divisas. Estos hechos aunado al costo tan elevado en el mercado internacional (15,000 a 20,000 US Dlls/Kg de vitamina B-12 con una pureza del 95 al 98 %) promovieron la realización de un proyecto de investigación para intentar producirla en México.

TABLA VII. IMPORTACIONES ANUALES DE VITAMINA B-12

AÑO	VOLUMEN (Kg)		COSTO (Dóllars)		COSTO UNITARIO (Dóllars/Kg) para b
	a	b	a	b	
1978		714		1,326,623	1,858
1979		800			
1980	459	819	18,579	1,866,051	2,278
1981	699	854	77,221	2,013,972	2,358
1982	762	774	18,220	1,715,736	2,216
1983		1,111		2,584,409	2,226
1984		842		2,066,453	2,454

a: Vitamina B-12 ó cianocobalamina.

b: Polvo de fermentación bacteriano (55 % con actividad de cianocobalamina).

Fuente: Instituto Mexicano de Comercio Exterior 1985. Departamento de Promoción Industrial, México.

OBJETIVO

Empleando un medio de fermentación a base de jugo cocido de limón como fuente de carbono, realizar estudios que permitan incrementar la producción de vitamina B-12 con respecto a un proceso previamente establecido con dicho sustrato.

METAS ESPECIFICAS

- Determinar experimentalmente el nivel de aeración en el cual se logre una mejor producción, producción específica y productividad de vitamina B-12.
- Determinar experimentalmente cual es la mejor concentración y tiempo de adición de los precursores glicina y cobalto en fermentaciones bajo el mejor nivel de aeración seleccionado.
- Determinar experimentalmente si el uso de algunos precursores y/o factores adicionados al medio de fermentación pueden incrementar la producción de vitamina B-12.

IV.

MATERIALES Y METODOS

El desarrollo de la parte experimental se muestra en la figura 7.

IVi.- Microorganismo

El microorganismo utilizado es *Propionibacterium shermanii* ATCC 13673 seleccionado en anteriores estudios (Pérez 1981).

La reactivación y conservación de este microorganismo se estableció con anterioridad (Santana 1983). Es importante señalar que se conserva en un medio de lactato-extracto de levadura contenidos en tubos roscados y almacenados a 4 °C.

IVii.- Preparación de los medios de fermentación

Los medios de fermentación son los siguientes:

A: Medio a base de jugo cocido de limón

Melácidas diluida 1:10	500.0	ml/l
Nitrógeno (agua de cocimiento de maíz)	3.5	g/l
Cloruro de cobalto hexahidratado	5.0	mg/l
Agua de la llave	a	1.0 litro
pH		7.0

Las melácidas son el resultado de concentrar 10 veces el desecho de la industria del limón mexicano "Jugo Cocido de Limón (JCL)".

B: Medio a base de Glucosa

Glucosa	32.8	g/l
Nitrógeno (agua de cocimiento de maíz)	3.5	g/l
Cloruro de cobalto hexahidratado	5.0	mg/l
Agua de la llave	a	1.0 litro
pH		7.0

Cualquier modificación al medio se indica en su oportunidad.

Las melácidas* almacenadas a 4 °C durante su uso, se diluye 1:10 y se ajusta el pH a 8.0 con hidróxido de sodio.

El agua de cocimiento de maíz también almacenado a 4 °C durante su uso se diluye 1:3, se ajusta el pH entre 8.3-8.5 con hidróxido de amonio y se centrifuga (centrifuga Sorvall/Dupont RC 5) a 10,000 rpm durante 20 minutos a 4 °C, con el fin de eliminar sólidos presentes.

La fuente de carbono (respectiva de cada medio de cultivo) y

I N O C U L O

REALIZAR ESTUDIOS DE CORRELACION ENTRE LOS METODOS DE D.O. Y CONTENIDO DE DNA PARA LA DETERMINACION DEL CRECIMIENTO MICROBIANO.

DETERMINAR LA PRODUCCION, PRODUCCION ESPECIFICA Y PRODUCTIVIDAD DE VITAMINA B-12 A DIFERENTES NIVELES DE AERACION.

REALIZAR FERMENTACIONES DE LAS POSIBLES COMBINACIONES ENTRE LOS MEJORES NIVELES DE AERACION QUE SE OBTENGAN.

LLEVAR A CABO LA CINETICA DE FERMENTACION AL NIVEL DE AERACION SELECCIONADO.

BAJO EL NIVEL DE AERACION SELECCIONADO, ESTUDIAR EL EFECTO QUE PRESENTAN LOS PRECURSORES GLICINA Y COBALTO SOBRE LA PRODUCCION, PRODUCCION ESPECIFICA Y PRODUCTIVIDAD DE VIT. B-12 EMPLEANDO UN MEDIO A BASE DE J.C.L. COMO FUENTE DE CARBONO.

BAJO EL NIVEL DE AERACION SELECCIONADO, ESTUDIAR EL EFECTO QUE TIENEN CIERTOS PRECURSORES Y AGENTES TENSIOACTIVOS SOBRE LA PRODUCCION, PRODUCCION ESPECIFICA Y PRODUCTIVIDAD DE VIT. B-12 EN UN MEDIO A BASE DE CARBONO COMO FUENTE DE CARBONO.

OPTIMIZAR EL MEDIO DE FERMENTACION

FIGURA 7. Diagrama de bloques para el desarrollo experimental.

de nitrógeno se mezclan en agua de la llave y se esterilizan a 15 libras de presión por 20 minutos. El cloruro de cobalto, así como los factores probados glicina, Diethyl-1,4,2,4,6-triethylpyridine-3,5-dicarboxylate (DDC), propanol y tween 80² se adicionan ya estériles bajo condiciones asépticas antes de inocular los medios de fermentación.

IViii.- Preparación del Inóculo

El microorganismo se adapta al medio de fermentación correspondiente como se muestra en la figura 8. Se incuba a 29 °C con una agitación de 125 rpm (en una agitadora rotatoria de 1.5 cm de radio de giro) durante 60 h en un medio a base de jugo cocido de limón y de 36 a 40 h en un medio a base de glucosa, bajo condiciones anaeróbicas. Para mantener las condiciones anaeróbicas se utilizan 200 ml de cada uno de los medios en matraces Erlenmeyer (Pyrex) de 250 ml.

IViv.- Condiciones de Fermentación

Las fermentaciones se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones:

- En matraces de 250 ml.
- Ciento cuarenta y cuatro horas de fermentación (6 días). Cada 12 ó 24 horas (h) se iban sacrificando los matraces que fueran necesarios.
- Temperatura de 29 °C.
- Agitación de 125 rpm en una agitadora rotatoria de 1.5 cm de radio de giro.
- Un pH entre 6.5-7.5 ajustados con hidróxido de sodio ó ácido clorhídrico (Baker) al 20 % estériles. Los volúmenes adicionados fueron de 0.1 a 1 % del volumen de trabajo.
- Aeración. La aeración fué controlada mediante la cantidad de volumen de medio de fermentación contenido por matraz Erlenmeyer de 250 ml, con lo que se pretende diferentes niveles de oxigenación. Para las fermentaciones a base de jugo cocido de limón se realizaron a 1 y 2 niveles de aeración; como se especifica a continuación.
 - a) A un solo nivel de aeración; se emplearon los siguientes volúmenes de trabajo: 25, 75, 130 y 200 ml.
 - b) A dos niveles de aeración, se realizaron las siguientes combinaciones de volúmenes de trabajo: 200-130, 200-75 y 130-75 ml. Estas condiciones se mantuvieron 3 y 3 días respectivamente en cada uno de los niveles de aeración.

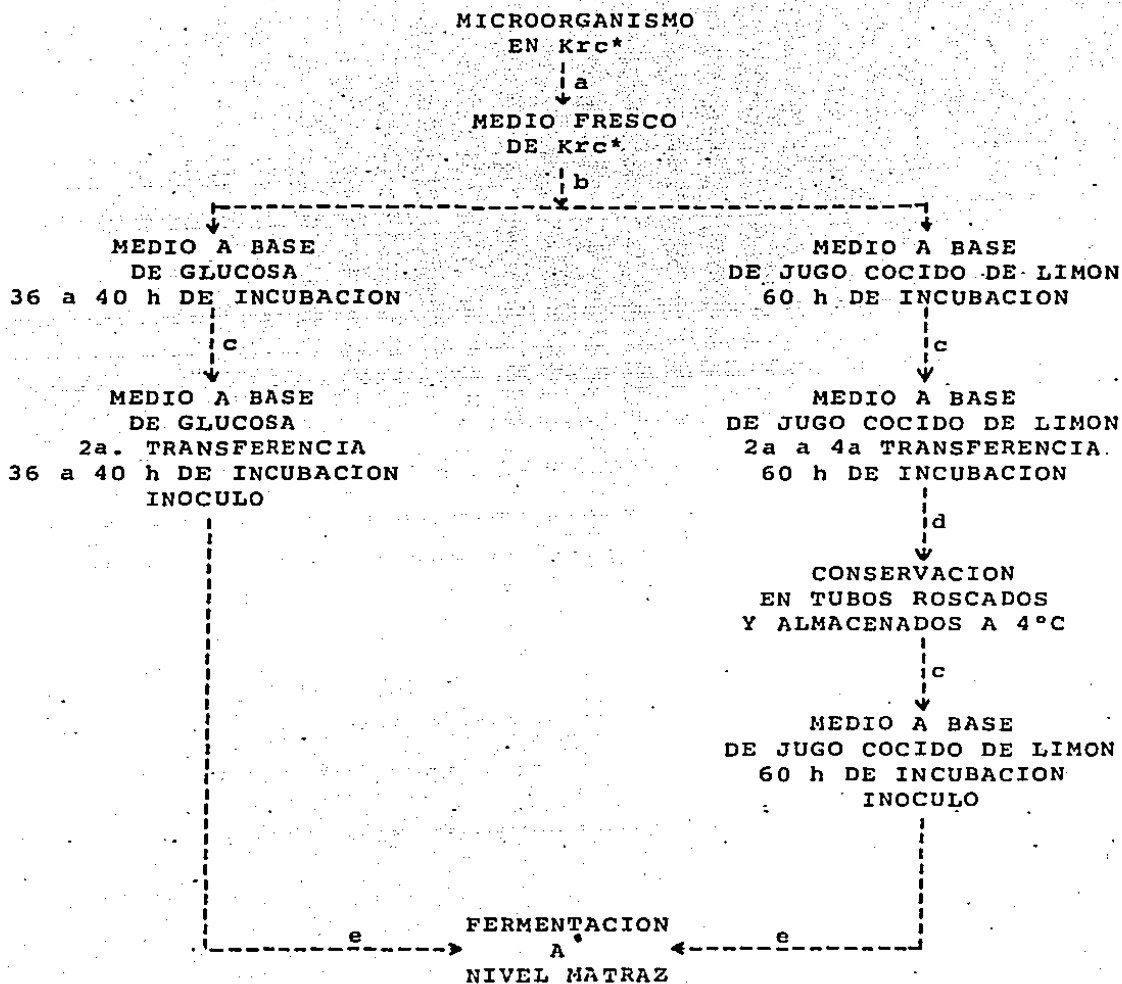


FIGURA 8. Preparación del Inóculo. En medio a base de glucosa y a base de jugo cocido de limón. a) Se añade 1 ml; b) Se inocula al 5 %; c) Se inocula al 10 %; d) A tubos roscados, cada uno con 20 ml de suspensión bacteriana; e) Se inocula a una densidad óptica (D. O.) de 1 (a tiempo cero). Krc* = Medio de Kreb's con rezasurina y cisteína.

Para las fermentaciones a base de glucosa se llevaron a cabo con 130 y 150 ml de medio en matraces de 250.

IVv.- Determinaciones Analíticas

Las muestras de fermentación fueron centrifugadas (centrifuga Sorvall/Dupont RC 5) a 10,000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. En el paquete celular, después de lavado con agua destilada y centrifugadas (2 veces), se determina vitamina B-12 (Fisher 1956). En el caldo de fermentación se cuantifican: azúcares reductores totales (Ting 1956); nitrógeno total (Método de Kjeldahl) y ácido cítrico, succínico y láctico por cromatografía de gases (Santana 1983).

Crecimiento Microbiano

El crecimiento microbiano se determina por densidad óptica (D.O.) a 540 nm en un fotocolorímetro Spectronic 20 Bausch & Lomb. Muestras de 1 ml de suspensión bacteriana son centrifugadas (centrifuga Wifug) a 5,700 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente; lavadas con aproximadamente 8 ml de agua destilada y centrifugadas (2 veces). Se resuspenden a una dilución adecuada en agua destilada. La D.O. se multiplica por un factor de 0.28 (valor promedio obtenido de curvas estándares de D.O. vs peso seco (g/l) en los medios a base de jugo cocido de limón y a base de glucosa) (Santana 1983) con el fin de reportar el crecimiento en peso seco (g/l).

Se empleó también un método de cuantificación del ácido deoxiribonucleico (DNA) para determinar el crecimiento microbiano; para tal caso fue necesario liberarlo de su envoltura celular. Los procesos de extracción del DNA que se emplearon fueron los siguientes:

a) Muestras de 1 a 2 ml de suspensión bacteriana se centrifugan (centrifuga Wifug) a 5,700 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente y se lavan con aproximadamente 8 ml de solución salina y se centrifugan (3 veces). El pellet se resuspende en 2.5 ml de ácido tricloroacético (ATC Baker) frío al 10 %, se homogeniza por 15 minutos, se centrifuga a 5,700 rpm durante 20 minutos y se elimina el sobrenadante. El precipitado se lava con 2.5 ml de ATC al 10 % frío, se resuspende, se centrifuga y se tira el sobrenadante. El precipitado se resuspende en 5 ml de etanol al 95 %, se centrifuga, se tira el sobrenadante y las partículas sólidas se secan con aire (Burton 1956).

b) Mismo procedimiento del anterior empleando ATC al 20 % y homogenizando por 5 minutos.

c) El paquete celular proveniente de 2.0-2.5 ml (a menos que otro volumen se especifique) de suspensión bacteriana se

resuspenden en 3.0 ml de buffer SET agitando en un vortex (Vortex-Genie) durante un minuto. Centrifugar (centrifuga Wifug) por 15 minutos y resuspender en 2.5 ml de buffer SET. Adicionar 3.0 ml de mezcla litica a temperatura ambiente, agitar en vortex durante un minuto y mantenerlos en hielo por 10 minutos. Adicionar 4.0 ml de buffer acetatos y agitar invirtiendo los tubos varias veces (12 veces). Incubar en hielo por 30 minutos, centrifugar por 15 minutos y descartar el sobrenadante (Rodriguez 1983). Adicionar 5.0 ml de isopropanol, agitar invirtiendo los tubos varias veces (12 veces), centrifugar por 15 minutos a temperatura ambiente y descartar el sobrenadante. Secar las particulas sólidas con aire.

Una vez extraído el DNA, el paquete celular seco se resuspende en 2.0 ml de hidróxido de sodio 1 N y se incuba a 37 °C durante 20 h en un baño de agua (baño Grant) con agitación constante. Cumplido el tiempo se sacan los tubos, se neutralizan con 0.4 ml de ácido clorhídrico 5 N, se adicionan 2.0 ml de ATC al 5.0 % frío, se centrifuga a 5,700 rpm por 20 minutos y se elimina el sobrenadante. Solubilizar la pastilla con 2.0 ml de ácido perclórico 0.5 N, incubar a 70 °C durante 15 minutos y tomar alícuotas de 0.5 ml por triplicado colocandolos en tubitos roscados. Adicionar 1 ml de la solución B e incubar a 30 °C entre 16 a 20 h. Se desarrolla un color azul que se lee a 600 nm en un espectrofotómetro (Beckman modelo 35).

Se prepara una curva tipo con cantidades conocidas de DNA. La curva estandar se muestra en la figura 9.

Las soluciones que se emplean en esta metodología son las siguientes:

Solución	Reactivo	Cantidad	Indicación
Buffer SET	Sacarosa	20.0 g	Prepararla en el momento de usar.
	Tris-HCl	50.0 mM	
	EDTA	50.0 mM	
	Agua dest.	100.0 ml	
	pH	7.6	
Mezcla Litica	Lauril Sulfato de sodio (SDS)	1.0 g	
	Hidróxido de sodio	0.2 N	
	agua dest.	100.0 ml	
Buffer Acetatos	Acetato de sodio	3.0 M	Almacenar a 4 °C.
	Agua dest.	100.0 ml	
	pH	4.8	
Solución A	Difenilamina	1.5 g	Preparar en el momento
	Acido acetico	100.0 ml	

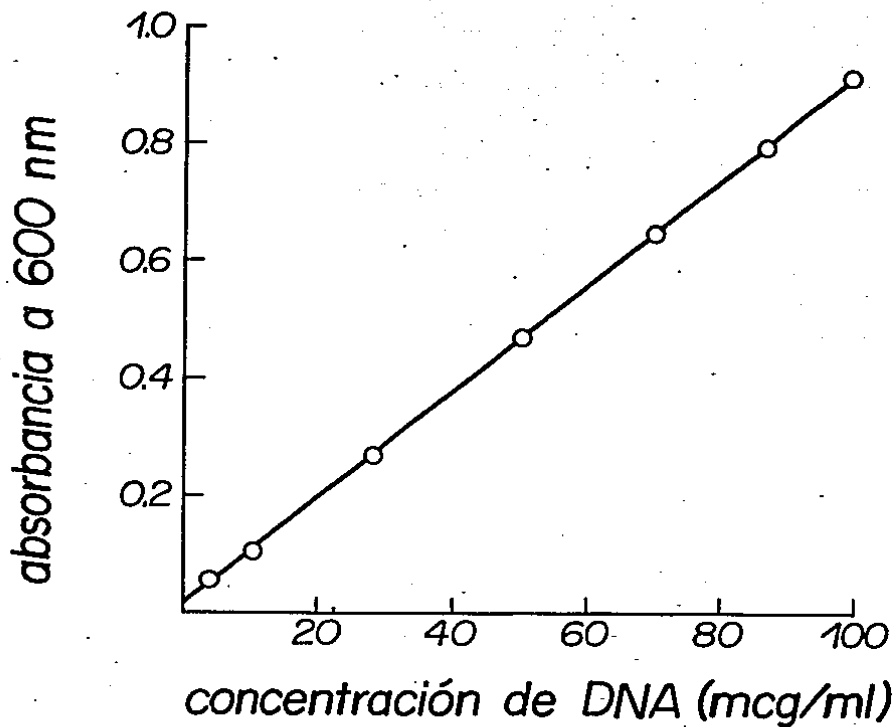


FIGURA 9. Curva Estandar, Absorbancia a 600 nm vs concentración de ácido deoxirribonucleico (DNA de becerro) en $\mu\text{g/ml}$. $r^2 = 0.999$. r^2 coeficiente de correlación.

Acido sul-
fúrico conc. 1.5 ml de usar.

Solución B Solución A 20.0 ml Preparar al mo-
Acetaldehido mento de
(16 mg/ml) 0.1 ml usar.

NOTA: Todos los reactivos son Baker excepto la Difenil amina, ácido acético y el acetaldehido que son Merck. Es importante que este último sea muy puro.

Vitamina B-12 (Fisher 1954).

El paquete celular proveniente de 100 ml de medio fermentado una vez lavado se resuspende en 40 ml de propanol cianurado (10 ml de una solución al 0.5 % de cianuro de potasio adicionados a 100 ml de propanol), se ponen a hervir en baño maria por 30 minutos procurando agitar por lo menos 15 minutos. Una vez transcurrido ese tiempo, se filtra através de papel filtro Watman No. 41 recibiendo el filtrado en una probeta de 50 ml, se ajusta el volumen a 42 ml con propanol cianurado y se toman 4 muestras de 10 ml cada una, los cuales son transferidos a tubos de ensaye. A dos de las cuatro muestras se le adicionan 2.0 ml de cianuro de potasio al 10 % (p/v) y a las otras dos muestras 2.0 ml de ácido cítrico al 5.0 % (p/v). Dichas muestras son leídas a 587 nm en un fotocolorimetro Spectronic 20 Bausch and Lomb. La vitamina B-12 se calcula empleando la siguiente ecuación:

$$\frac{\mu\text{g}}{\text{l}} \text{ B-12} = \frac{\Delta A \times 1.2 \times 42}{E} \times 10$$

Donde:

- ΔA = Diferencia entre la absorbancia de la forma diciano menos la absorbancia de la monociano.
E = Coeficiente de extinción para la vitamina B-12 a 587 nm, 0.0054.

Azúcares Reductores totales (Ting 1956).

Una muestra del caldo de fermentación obtenido por centrifugación se diluye 1:50. A 1.0 ml de esta solución se le adicionan 5.0 ml del reactivo de ferricianuro y se ponen a hervir a baño maria durante 15 minutos. Se ponen durante 5 minutos en hielo y se le adicionan 10 ml de una solución 2.0 N de ácido sulfúrico. Se agita la solución hasta eliminar el gas generado en la reacción y se adicionan 4.0 ml de una solución de arsenomolibdato para generar un color azul. Se diluye 5 veces y se lee a 515 nm. La cantidad de azúcares reductores totales se calcula mediante la fórmula:

$$S = A K (F.D.)$$

Donde:

S = Azúcares Reductores totales en g/100 ml.

A = Absorbancia medida a 515 nm.

K = Inverso de la pendiente de una curva estandar de glucosa y fructosa, 0.25.

F.D. = Factor de Dilución, 50.

Las soluciones que se emplean en esta metodología son las siguientes:

Solución	Reactivo	Cantidad	Indicaciones
Ferricianuro Alcalino	Carbonato de sodio anhidro	160.0 g	Proteger la solución de la luz.
	Fosfato disódico heptahidratado	150.0 g	
	Ferricianuro de potasio	4.0 g	
	Agua dest.	1.0 litro	
Arsenomolibdato	Molibdato de amonio tetrahidratado	25.0 g	Proteger la solución de la luz. Calentar a 55 °C por 30' en baño de agua.
	Agua dest.	450.0 ml	
	Acido sulfúrico conc.	21.0 ml	
	Arsenato disódico	3.0 g en 25 ml de agua destilada.	

NOTA: Todos los reactivos son Baker, excepto ferricianuro de potasio y arsenato disódico que son Merck.

Nitrogeno Total (A. O. A. C. 1975).

Muestras de 5.0 ml del caldo de fermentación ya centrifugado se pesan, se vacía en un matraz Kjeldahl, se adiciona 3.0 g de mezcla selénica (Merck), 20 ml de ácido sulfúrico concentrado y se digieren en una parrilla de calentamiento por 45 minutos. Una vez ya digeridos y frios se adicionan 400 ml de agua, unas gotas del indicado fenolftaleína al 0.1 %, piedras de ebullición, 40-70 ml de hidróxido de sodio al 50 % (p/v) y se conecta a un equipo de destilación. El amoniaco destilado se recibe en 50 ml de ácido bórico al 4.0 % (p/v) con unas gotas del indicador verde de bromocresol al 1.0 % contenidos en un matraz de 500 ml hasta recibir un volumen total de 250 ml. La muestra destilada se valora con una solución patrón de ácido clorhídrico 0.1 N y el porcentaje de nitrógeno se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\% N = \frac{V N \text{ pmeq}}{2 \text{ peso de la muestra}} * 100$$

Donde:

- N = % de Nitrógeno.
 2 =
 V = Volumen (ml) de HCl 0.1 N gastados en la valoración.
 N = Normalidad del HCl, 0.1.
 pmeq = Peso miliequivalente del nitrógeno, 0.014.

Acidos Citrico, Láctico y Succinico

Una muestra de 0.3 ml de caldo de fermentación centrifugado, se coloca en un reactival de 5.0 ml, se acidifica con una gota de ácido clorhídrico al 20 % y se seca a 60 °C a vacío, se deja enfriar, se adicionan 0.5 ml de BF₃-metanol al 14 % (Pierce Chemical, Co.) y se incuba toda la noche a temperatura ambiente con agitación, se agrega 0.87 ml de sulfato de amonio al 33 % y un ml de cloroformo, se mezcla y centrifuga a 5,700 rpm durante 10 minutos. Se inyecta un microlitro de la fase clorofórmica a un cromatógrafo Varian modelo 3700 equipado con un registrador Varian modelo 9174, la columna utilizada fue de 2 metros por 1/8" empacada con 3 % de OV-17 Cromosorb WHP 80-100 de malla. Las temperaturas del detector de ionización de flama y del inyector fueron de 220 °C y 195 °C respectivamente. El programa de temperatura fue de 100-185 °C a 20 °/minuto, la temperatura final se mantuvo por 3 minutos. Los gases acarreadores fueron nitrógeno e hidrógeno 30 cm³/minuto y aire a 350 cm³/minuto. Las mediciones fueron realizadas a una atenuación de 8 y un rango de 10 a la menos nueve. La concentración de cada ácido se calcula refiriendolo a una concentración estandar de cada uno de ellos, mediante la siguiente fórmula:

$$X = \frac{h-p (C-st)}{h-st}$$

Donde:

- X = Concentración de cada ácido en g/l.
 h-p = Altura del pico de la muestra problema, en cm.
 C-st = Concentración del estandar, 6.0 mg de los ácidos láctico y citrico y 3.0 mg para el ácido succinico.
 h-st = Altura del estandar, en cm.

Preparación de la solución estandar. Se prepara una solución que contenga 12.0 mg de ácido citrico, 12.0 mg de ácido láctico y 6.0 mg de ácido succinico. Se toma una alícuota de 0.5 ml, se seca a 60 °C a vacío y se sigue exactamente el mismo procedimiento que con las muestras problema.

V.

RESULTADOS Y DISCUSION

VI. ESTUDIOS DE CORRELACION ENTRE LOS METODOS DE DENSIDAD OPTICA (D.O.) Y CONTENIDO DE ACIDO DEOXIRIBONUCLEICO (DNA) PARA LA DETERMINACION DEL CRECIMIENTO MICROBIANO.

El medio de fermentación a base de jugo cocido de limón después de ser esterilizado presenta sólidos en suspensión, esto dificulta la determinación del crecimiento microbiano por densidad óptica (D.O.). Razón por la cual, se consideró emplear el método de DNA para determinar el crecimiento de *P. shermanii* y posteriormente establecer la correlación.

Via. Crecimiento Microbiano determinado por ambos métodos.

A pesar de que el contenido de DNA dentro de un rango (0.2 a 2.0 ml) de suspensión bacteriana libres de sólidos no orgánicos guardan una relación lineal ($r^2 = 0.99$) (figura_10_); el contenido de DNA del microorganismo en las fermentaciones de 200-75/250, 130-75/250 y 130/250 (ml de medio/matraz de 250 ml) no siguen un comportamiento semejante al crecimiento determinado por D.O.. El crecimiento cuantificado por este método muestra una tendencia hacia el incremento, mientras que el cuantificado por el método de DNA se comporta de forma diferente; ya sea manteniéndose estacionario, tendiendo a disminuir ó bien a continuar creciendo en menor grado a partir de las 24 ó 48 h de fermentación (figuras_11,_12 y_13_). Hasta las 48 h de fermentación, el crecimiento medido por ambos métodos, presenta un comportamiento semejante, mismo que no se observa después de ese tiempo. Así mismo no mantiene una linealidad entre ambos métodos (figuras_14, _15_y_16_) a pesar de encontrar tendencias de respuestas semejantes entre los duplicados de las fermentaciones (tabla_VIII), (ver anexo 1).

Vib. Selección del método de Extracción del DNA.

Ambos métodos no se correlacionaban durante el curso de las fermentaciones probablemente debido a la ineficiencia del procedimiento empleado para extraer el DNA de células de más de 48 h de incubación (a partir de este tiempo comienza a haber mayor número de células y posiblemente la pared celular con el tiempo se hace más rígida). Por tal razón, y debido a que dicho procedimiento era demasiado laborioso, se utilizaron otros dos tratamientos extractivos: uno empleando ácido tricloroacético (ATC) al 20 %-homogenizando por 5 minutos y el otro usando una mezcla litica (ver materiales y métodos).

Al comparar los dos procedimientos con el inicial iATC al

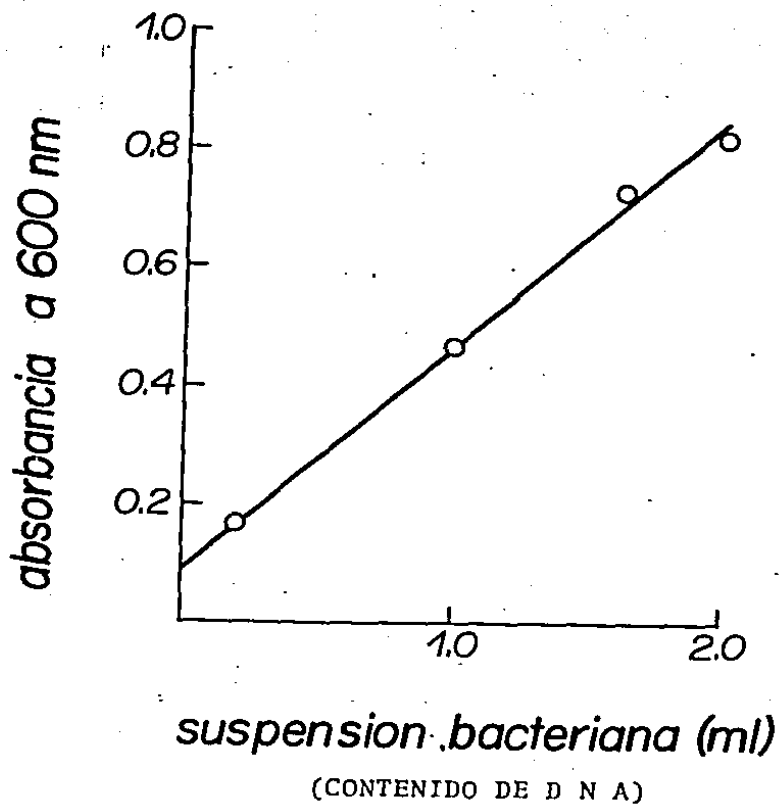


FIGURA 10. Gráfica que relaciona la Absorbancia a 600 nm (para cuantificar D N A) vs Mililitros de Suspensión Bacteriana (crecimiento en D.O. = 0.2154×10^{-2}). $r^2 = 0.99$.

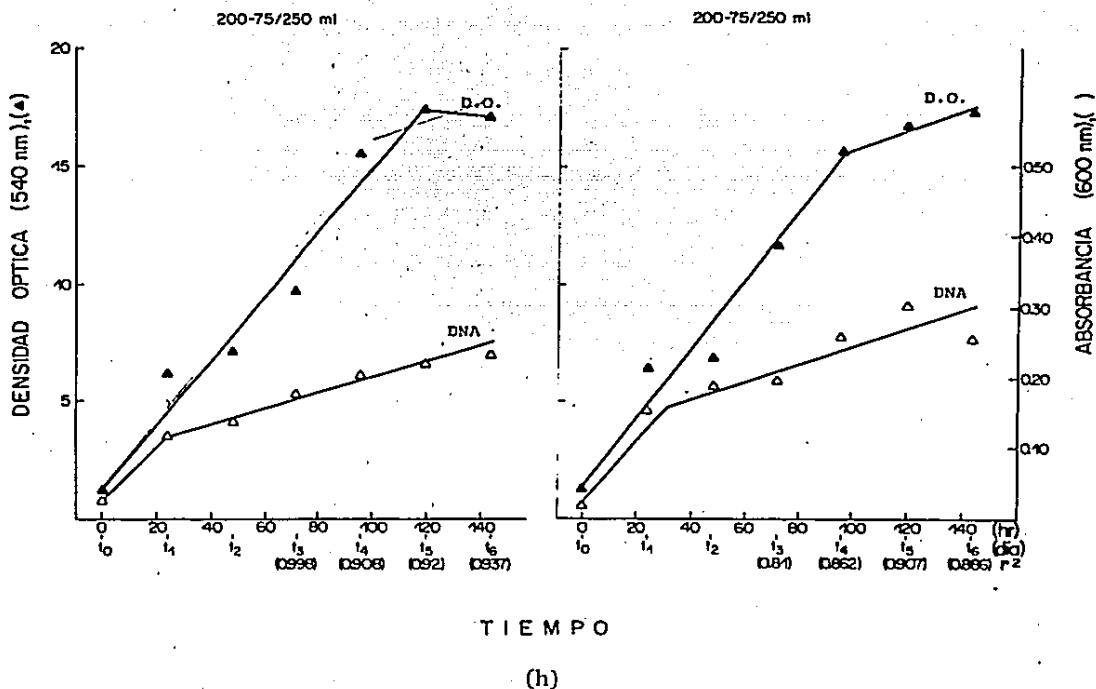


FIGURA 11. Curva, D.O. a 540 nm y Absorbancia a 600 nm (para cuantificar DNA) vs Tiempo en la Fermentación de 200-75 ml de volumen de trabajo/matraz de 250 ml en un Medio a base de Jugo Cocido de Limón (JCL) con *E. shermanii* ATCC 13673. Del tiempo 4 al tiempo 6 se dan los coeficientes de correlación (r^2) entre los dos métodos. A y B fermentaciones bajo las mismas condiciones.

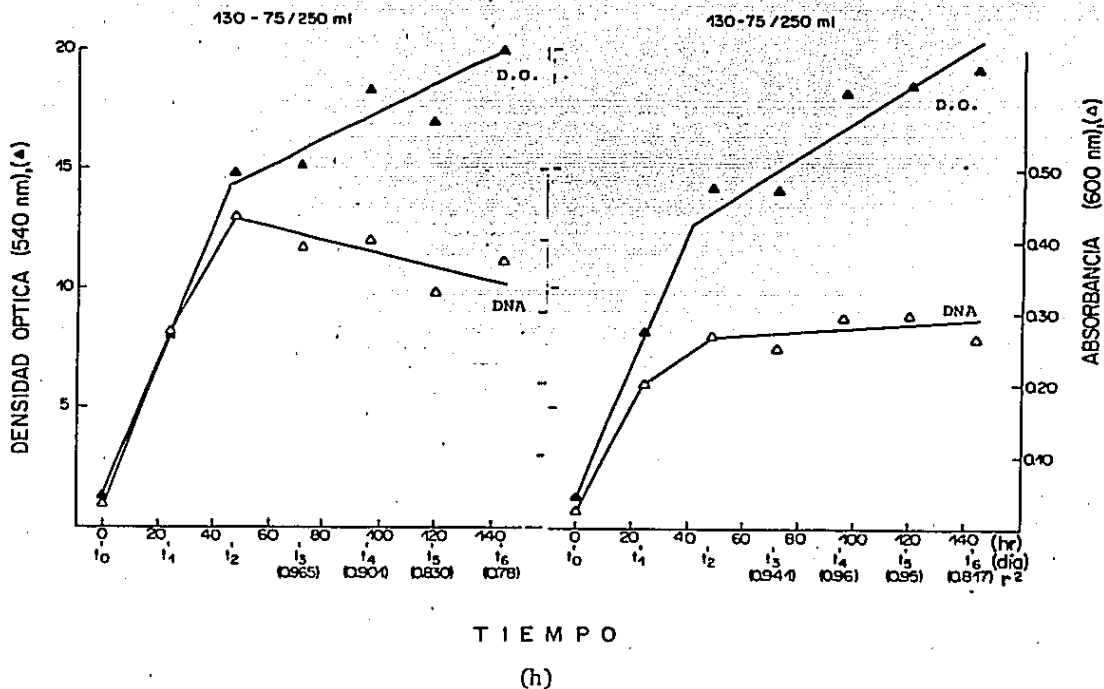


FIGURA 12. Curva, D.O. a 540 nm y Absorbancia a 600 nm (para cuantificar DNA) vs Tiempo en la Fermentación de 130 ml de volumen de trabajo (3 días). - 75 ml de volumen de trabajo (3 días) / matraz de 250 ml en un Medio a base de JCL con *E. shermanii* ATCC 13673. Del tiempo 3 al tiempo 6 se dan los coeficientes de correlación (r^2) entre los dos métodos. A y B fermentaciones bajo las mismas condiciones.

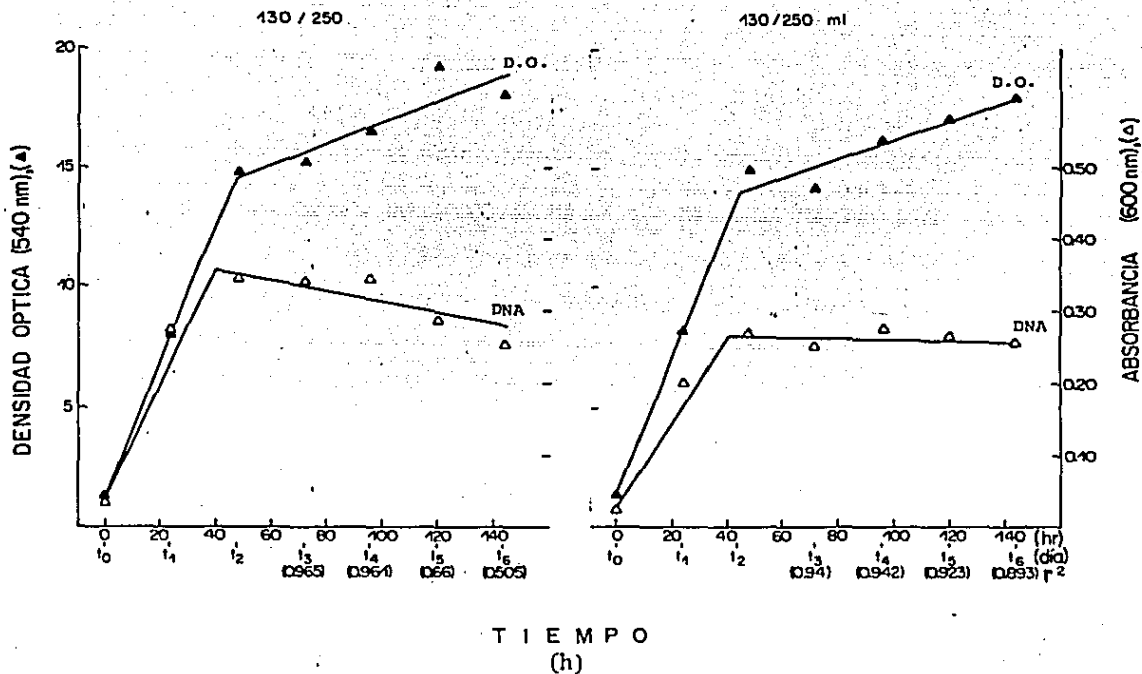


FIGURA 13. Curva, D.O. a 540 nm y Absorbancia a 600 nm vs Tiempo en la Fermentación de 130 ml de volumen de trabajo / matraz de 250 ml en un Medio a base de JCL con *E. shermanii* ATCC 13673. Del tiempo 3 al tiempo 6 se dan los coeficientes de correlación (r^2) entre los dos métodos. A y B fermentaciones bajo las mismas condiciones.

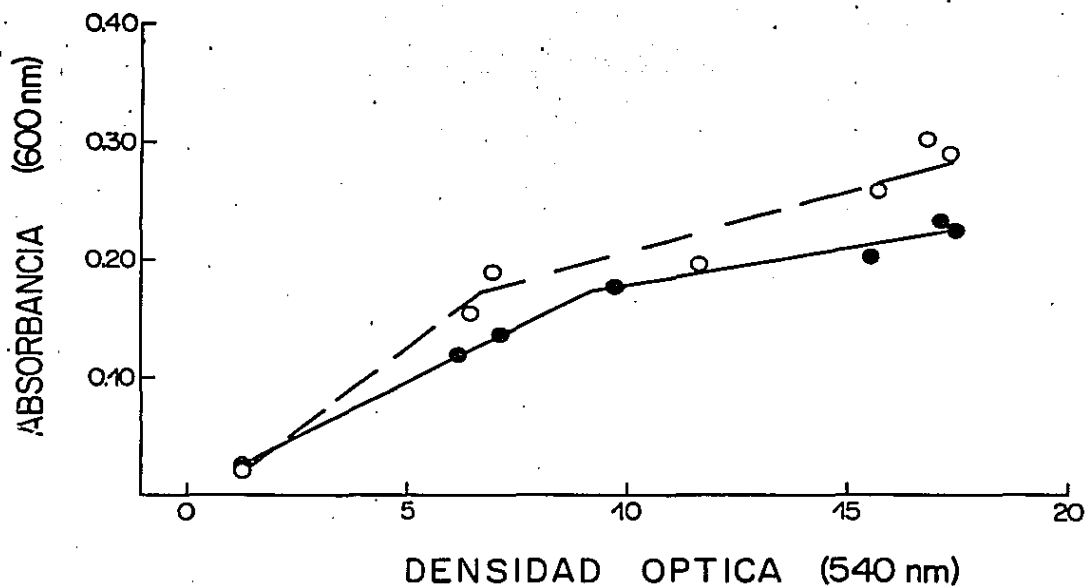


FIGURA 14. Curva que correlaciona el Crecimiento medido a 600 nm (para cuantificar DNA) vs el determinado por D.O. a 540 nm en la Fermentación de 200 ml de volumen de trabajo (2 días) - 75 ml de volumen de trabajo (4 días) / Matraz de 250 ml en un medio a base de JCL con *P. shermanii* ATCC 13673.

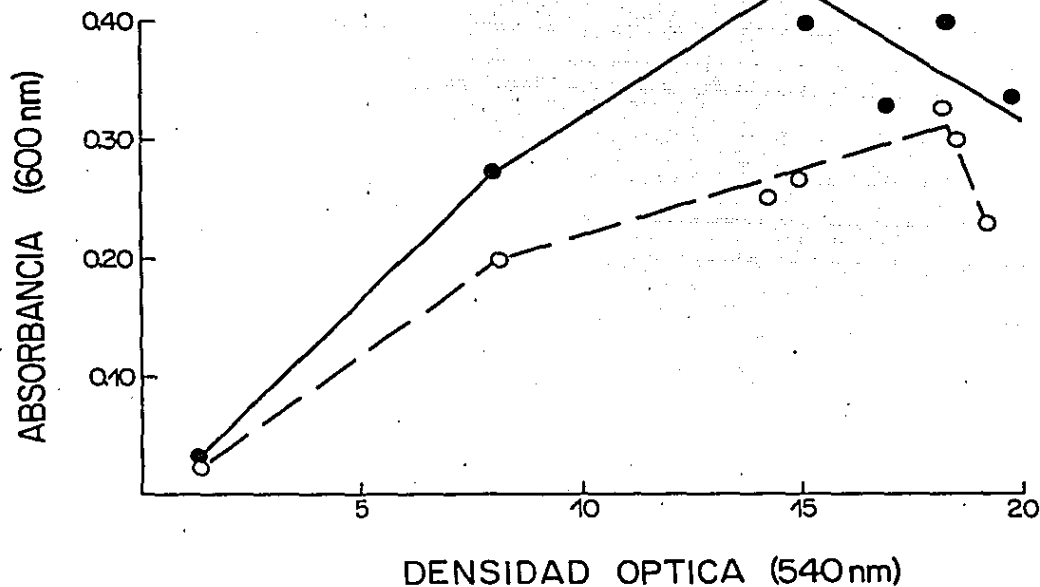


FIGURA 15. Curva que Correlaciona el Crecimiento Medido a 600 nm (para cuantificar D N A) vs el Determinado por D.O. a 540 nm en la Fermentación de 130 ml de volumen de trabajo (3 días) - 75 ml de volumen de trabajo (3 días) / Matraz de 250 ml en Medio a base de JCL con *P. shermanii* ATCC 13673.

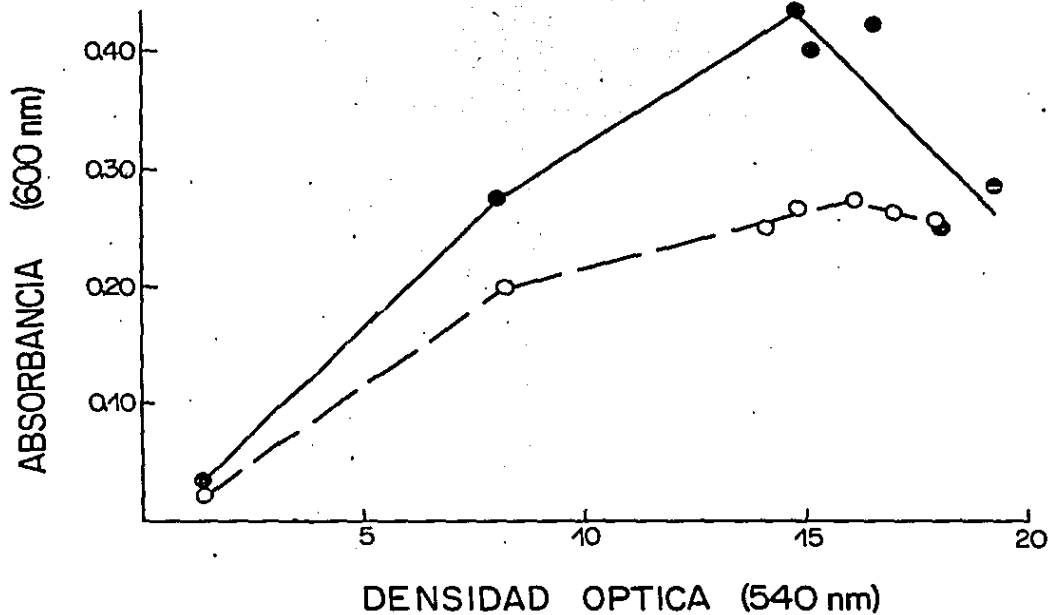


FIGURA 16. Curva que Correlaciona el Crecimiento Medido a 600 nm (para cuantificar D N A) vs el Determinado por D.O. a 540 nm en la Fermentación de 130 ml de trabajo (6 días) / Matraz de 250 ml en un Medio a base de JCL con *E. shermanii* ATCC 13673.

TABLA VIII. ANALISIS DE COVARIANZA

FERMENTACION	CRITERIO	D A T O S			
		4	5	6	7
200 - 75 / 250	1 F cal.	0.53	0.99	3.16	4.42 *
	2 F cal.	---	---	---	1.10
130 - 75 / 250	1 F cal.	0.36	5.54 *	4.93	3.45
	2 F cal.	---	2.43	2.38	---
130 / 250	1 F cal.	2.00	10.93 **	2.40	1.03
	2 F cal.	---	4.12	---	---

1 $H_0: b_{01} + a_{11} x = b_{02} + a_{12} x$

2 $H_0: a_{11} = a_{12}$

* Significativo

10%-homogenizando 15 minutos, se muestra que la respuesta obtenida cuando se emplea ATC es similar y al usar mezcla lítica la respuesta aumenta (figura_17_).

Al realizar un análisis de varianza se demuestra que con éste último método, la extracción del DNA de células de *E. shermanii* mostró un incremento significativo de las 96 a las 120 h de incubación (Tabla_IX_), (ver anexo_2_).

Vic. Selección del volumen de mezcla lítica adecuada para aumentar la eficiencia extractiva de DNA.

Se utilizarón los volúmenes de 3.0 y 5.5 ml de mezcla lítica con el fin de seleccionar el volumen para aumentar la eficiencia del DNA. Este experimento se realizó en dos diferentes volúmenes de suspensión bacteriana (0.5 y 1.5 ml) y a tres tiempos de fermentación (0, 24 y 48 h). Los resultados indicaron (figura_18_) que se obtienen respuestas semejantes con ambos volúmenes de mezcla lítica, corroborándose esto mismo al realizar un análisis de varianza (Tabla_X_), (ver anexo_3_) y encontrar que el cambio de volumen de 3.0 a 5.0 ml de mezcla lítica no fué significativo. Este mismo análisis también señaló que el incremento de DNA al aumentar tanto el volumen de suspensión bacteriana como el tiempo de incubación (0, 24 y 48 h) resultaron ser altamente significativos, tal y como se esperaba. Sin embargo, éstos dos parámetros (volumen de suspensión bacteriana y tiempo de incubación) muestran interacción (tabla_X_), (ver anexo_2_) debido a que el contenido de DNA en las alícuotas de 0.5 ml no presenta incrementos proporcionales a los tiempos de incubación empleados (0, 24 y 48 h), (figura_19_). Estos resultados se pueden explicar probablemente debido a la presencia de sólidos en la muestra ya que entre los triplicados no se encontró que esa diferencia fuera significativa (tabla_X_), (ver anexo_2_).

Vid. Selección del volumen adecuado de suspensión bacteriana para la cuantificación de DNA en células de *E. shermanii*.

Empleando 3.0 ml de mezcla lítica, se determinó el contenido de DNA a células de *E. shermanii* ATCC 13673 de 60 h de incubación (D.O. = 8.62) provenientes de los siguientes volúmenes de suspensión bacteriana: 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0 ml. Los resultados (figura_20_) obtenidos indican que en todo éste rango la respuesta es lineal ($r^2 = 0.98-0.99$); cuyas pendientes son similares a pesar de que sus ordenadas al origen no sean las mismas (tabla_XI_), (ver anexo_1_); y sobre todo que los volúmenes de 2.0 y 2.5 ml de suspensión bacteriana son las alícuotas que muestran menor error experimental (Tabla_XI_), (ver anexo_2_).

Debido a que este experimento se hizo por triplicado, se

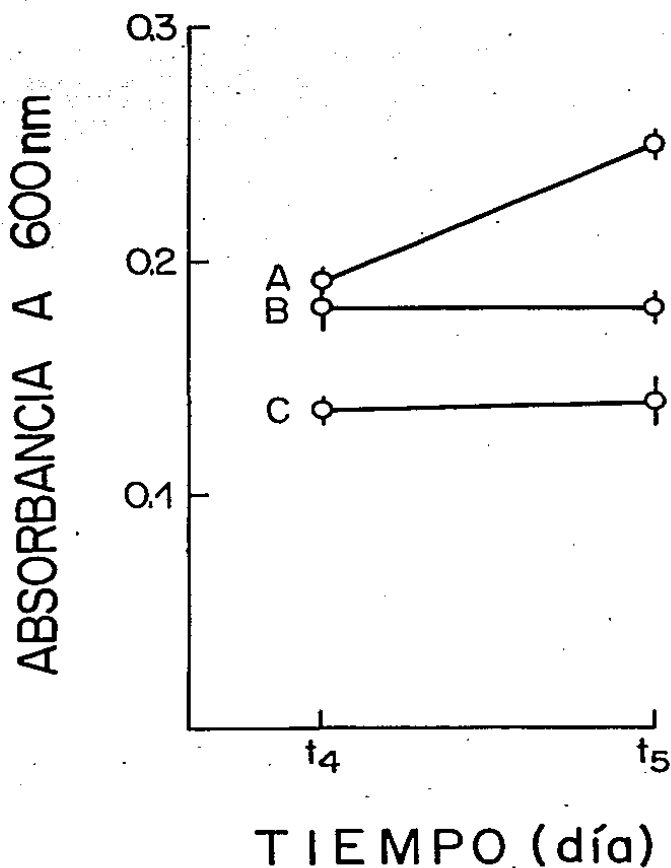


FIGURA 17.

Curva, Absorbancia a 600 nm (para cuantificar D N A vs Tiempo (96 y 120 h) de crecimiento en la Fermentación de 130 ml de volumen de trabajo de trabajo / Matraz de 250 ml en un Medio a base de JCL con *P. shermanii* ATCC 13673. Respuesta al rompimiento celular con: A = mezcla lítica, B = ácido tricloroacético al 10 % homogenizando 15 minutos y C = ácido tricloroacético al 20 % homogenizando 5 minutos.

TABLE IX.

ANALISIS DE VARIANZA

SELECCION DEL MEJOR METODO PARA LISAR CELULAS
DE *E. shermanii* ATCC 13673.

FUENTE DE VARIACION	F cal.
M	284.03 **
T	65.22 **
MT	49.162 **
E	

Modelo Propuesto:
$$Y_{ijk} = \mu + M_i + T_j + MT_{ij} + E_{k(ij)}$$

Donde:

- μ = Media poblacional
- M_i = Metodo
- T_j = Tiempo de cuantificación.
- MT_{ij} = Interacción
- $E_{k(ij)}$ = Error experimental
- Y_{ijk} = Variable de respuesta (Absorbancia a 600 nm).

Tabla X.

ANALISIS DE VARIANZA

EFFECTO DE LA CANTIDAD DE MEZCLA LITICA EN
LA EXTRACCION DEL DNA DE CELULAS DE SHERMANII.

FUENTE DE VARIACION	Fcal.
C	0.760
i	**
V	25.650
j	**
T	29.520
k	
CV	0.600
ij	
CT	0.452
ik	**
VT	8.500
jk	
CVT	2.440
ijk	
M	0.820
l(ijk)	
E	
m(ijk:l)	

Modelo:

$$Y_{ijklm} = \mu + C_i + V_j + T_k + CV_{ij} + CT_{ik} + VT_{jk} + CVT_{ijk} + M_l + E_{m(ijkl)}$$

Donde:

- Y_{ijklm} = Variable de respuesta (absorbancia a 600 nm).
 μ = Media poblacional.
 C_i = Cantidad de mezcla litica (3 y 5.5 ml), i = 1...2
 V_j = Volumen de suspensión bacteriana (0.5 y 1.5 ml), j = 1...2
 T_k = Tiempo de incubación (0, 24 y 48 h), k = 1...3
 M_l = Muestras, l = 1...2
 E_m = Error experimental, (m = replicación) m = 1...3

CV, CT, VT y CVT = representan las interacciones.

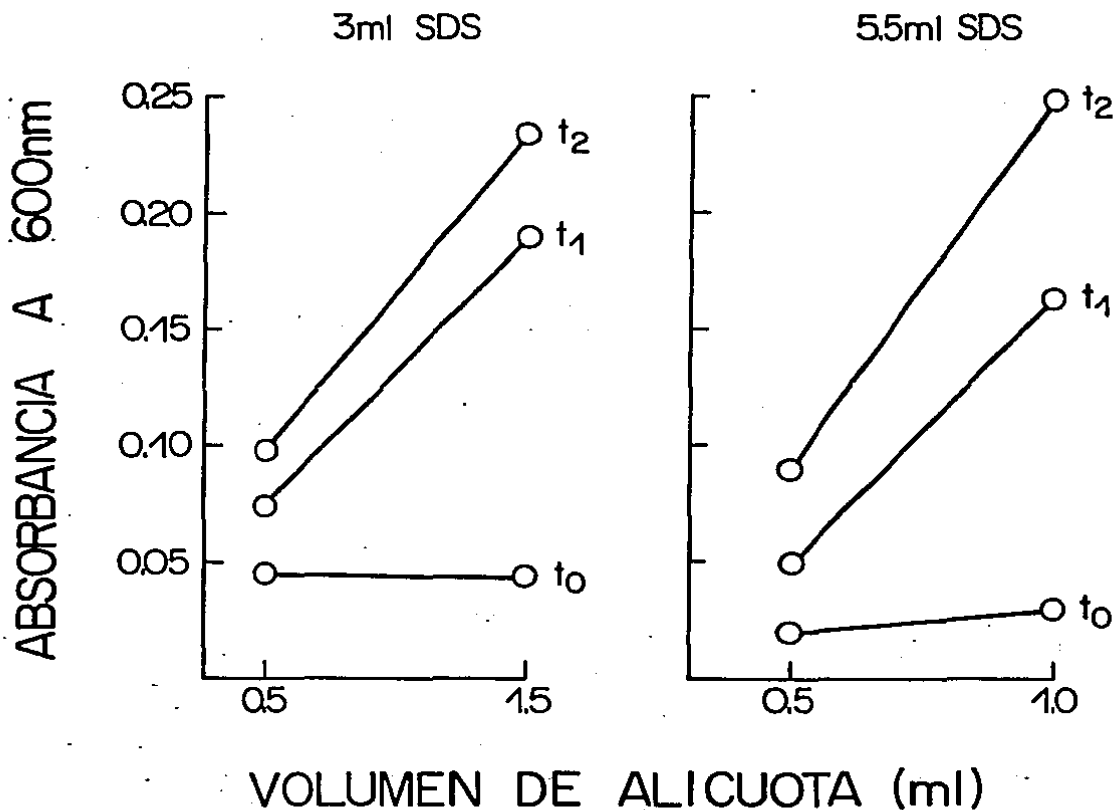


FIGURA 18. Curva, Absorbancia a 600 nm (para cuantificar D N A vs Volumen de suspensión bacteriana (0.5 y 1.5 ml) en la Fermentación de 130 ml de volumen de trabajo / Matraz de 250 ml en un Medio a Base de JCL con *P. shermanii* ATCC 13673 A = 3 ml de mezcla lítica; B = 5.5 ml de mezcla lítica a los tiempos 0, 1 y 2.

TABLA XI.

ANALISIS DE COVARIANZA

REPRODUCIBILIDAD SOBRE LA CURVA DE CALIBRACION
EN EL CONTENIDO DE DNA CON DIFERENTES VOLUME
NES DE SUSPENSION BACTERIANA.

	F cal.	
	1	2
	7.35**	1.30

1 Ho: $b_{01} + a_{11}x_1 + b_{02} + a_{22}x_2 = b_{03} + a_{33}x_3$

2 Ho: $a_1 = a_2 = a_3$

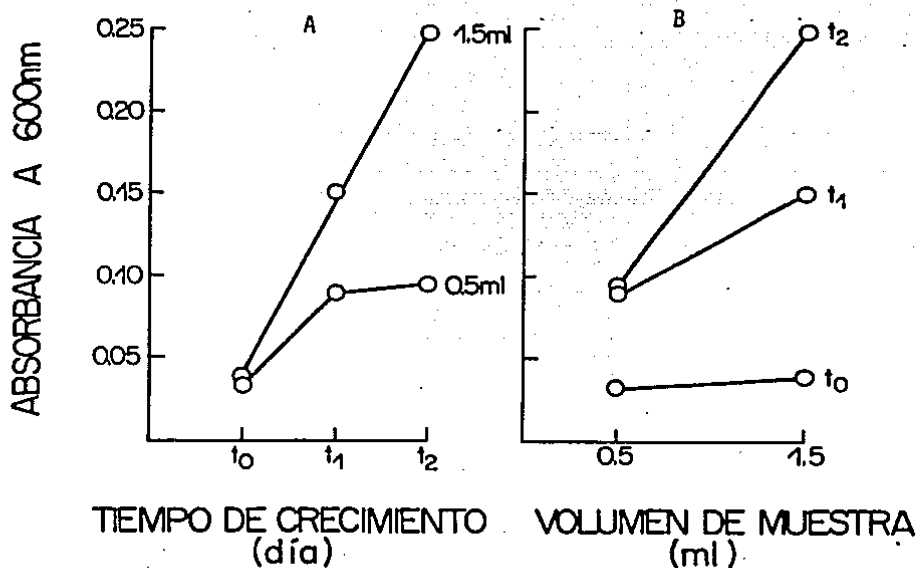


FIGURA 19. Curva, Absorbancia de DNA a 600 nm (para cuantificar vs A = Tiempo de crecimiento (t_0 , t_1 y t_2) a dos Volúmenes de Suspensión Bacteriana (0.5 y 1.5 ml); B = Volumen de Suspensión Bacteriana (0.5 y 1.5 ml) a 3 tiempos de Fermentación (t_0 , t_1 y t_2) en la Fermentación de 130 ml de volumen de trabajo / Matraz de 250 ml en un Medio a Base de JCL con *E. shermanii* ATCC 13673.

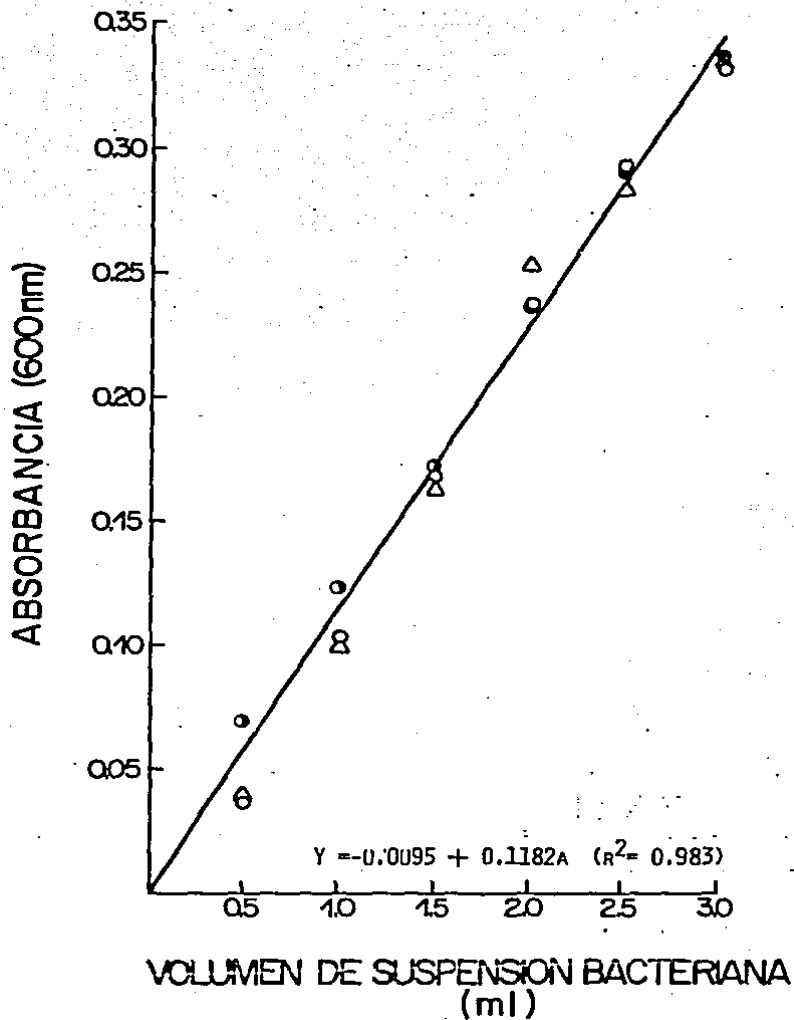


FIGURA 20. Curva, Absorbancia a 600 nm (para cuantificar D N A) vs Volumen de Suspensión Bacteriana (ml) de 60 h de incubación (D.O. = 0.862×10) en 200 ml de medio a base de JCL/matraz de 250 ml. La gráfica es el resultado de tres fermentaciones (o, o,) bajo las mismas condiciones.

realizó un análisis de varianza (Tabla XIII), (ver anexo 2) encontrando que hubo efecto de día, es decir, la cuantificación de DNA depende mucho del día en que se determinen las muestras; hay efecto de toma de muestra entre los triplicados, posiblemente debido a la heterogeneidad del medio, por lo que se recomienda tomar muestras por lo menos por triplicado cuando se desee cuantificar el contenido de DNA de células provenientes de medios de fermentación heterogéneos.

Vie. Correlación entre los métodos de D.O. y DNA.

Ambos métodos se emplearon para cuantificar el crecimiento del microorganismo durante el curso de la fermentación 130/250 (ml de medio/matraz de 250 ml) realizada por triplicado, con el fin de encontrar si existía correlación entre ellos. Los resultados mostraron semejanza en el crecimiento durante la fermentación al emplear ambos métodos (figura 21 y 22). Al realizar un análisis de covarianza se encontró que una de las tres fermentaciones no presenta semejante ecuación de regresión, al comparar las ecuaciones de regresión de la correlación de las fermentaciones B y C (Tabla XIV), (ver anexo 1) este no muestra pendientes semejantes. A pesar de esto ambos métodos presentan buena correlación (Figura 23). Con estos experimentos se demuestra que ambos métodos, D.O. y DNA si se correlacionan, durante el curso de una fermentación.

En base a los resultados hasta aquí obtenidos, el crecimiento microbiano en el presente trabajo se realizó por D. O., además de ser un procedimiento rápido y sencillo.

Vii ESTUDIOS PARA INCREMENTAR LA PRODUCCION FERMENTATIVA DE VITAMINA B-12 EN UN MEDIO A BASE DE JUGO COCIDO DE LIMON.

Vii.a. Efecto del nivel de aeración sobre la producción de vitamina B-12.

En virtud de que en estudios anteriores (Santana 1983), la fermentación aeróbica fué más eficiente para la producción de vitamina B-12, se planearon los presentes experimentos con el fin de seleccionar el mejor nivel de aeración donde se obtuviera la mayor producción ($\mu\text{g/l}$), producción específica ($\mu\text{g/g}$ de célula) y productividad ($\mu\text{g/lh}$) de vitamina B-12.

-- Experimentos a un solo nivel de aeración.

Estos experimentos se llevaron a cabo con diferentes volúmenes de medio de fermentación, de tal forma que proporcionaran diferente nivel de oxigenación, dichos volúmenes fueron los siguientes: 25, 75, 130 y 200 ml

TABLA VII.

ANÁLISIS DE VARIANZA

SELECCION DEL VOLUMEN ADECUADO DE SUSPENSION BACTERIANA PARA SU CUANTIFICACION POR EL METODO DE CONTENIDO DE DNA.

F cal.			
VOLUMEN DE SUSPENSION BACTERIANA	FUENTE DE VARIACION		
(ml)	D i	L j (i)	E k (ij)
0.5	17.83 **	3.19	
1.0	5.04 *	12.08 **	
1.5	1.37	9.92 **	
2.0	1.02	9.25 **	
2.5	0.57	4.40 **	
3.0	8.99 *	1.78	

Donde:

D = Efecto de día

i

L = Efecto de la replicación

j (i)

E = Error experimental

TABLA XIII.

ANALISIS DE VARIANZA

EFFECTO DEL DIA DE CUANTIFICACION, DEL VOLUMEN DE SUSPENSION BACTERIANA Y DE LAS REPLICACIONES ANIDADOS EN LOS DOS PRIMEROS.

FUENTE DE VARIACION	F. cal.
D	14.94
V	1013.91
VD	1.27
L k(ij)	5.31
E l(ijk)	

$$\text{Modelo Propuesto: } Y_{ijk} = \mu + D_i + V_j + VD_{ij} + L_{k(ij)} + E_{l(ijk)}$$

Donde:

- μ = Media poblacional
- D_i = Efecto de día
- V_j = Efecto de volumen
- VD_{ij} = Interacción día-volumen
- $L_{k(ij)}$ = Efecto de la replicación
- $E_{l(ijk)}$ = Error experimental

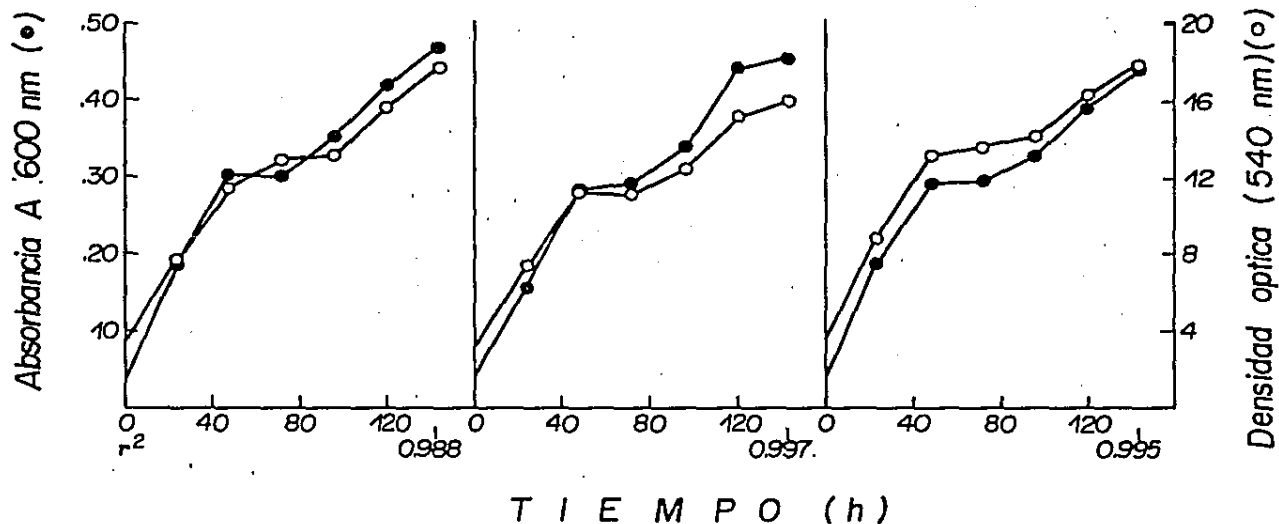


FIGURA 21. Gráfica que Relaciona la Absorbancia a 600 nm (para cuantificar D N A) y D. O. a 540 nm vs Tiempo (h) en la Fermentación (triplicado) de 120 ml de volumen de trabajo / Matraz de 250 ml en un Medio a Base de JCL con *E. shermanii* ATCC 13673. En cada fermentación se da el coeficiente de correlación (r^2) entre los dos métodos, D.O. y DNA.

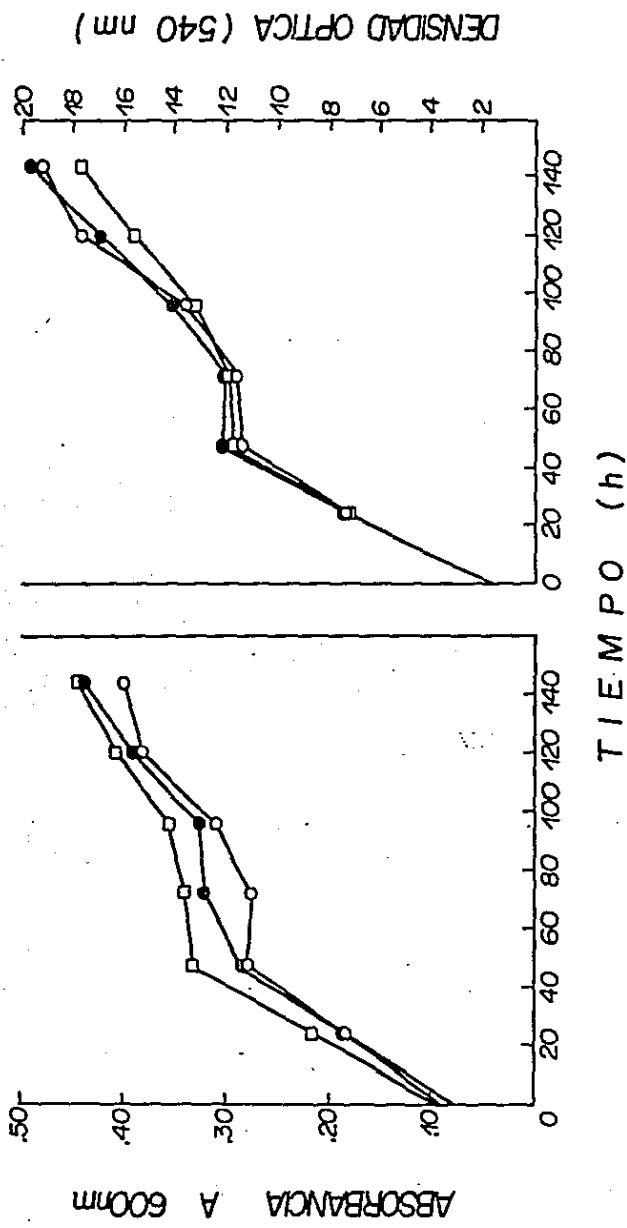


FIGURA 22. Curva de Absorbancia de DNA a 600 nm (A) y Densidad Optica a 540 nm (D) vs Tiempo (h) en la Fermentación de 130 ml de Medio/Matriz de 250 ml en un Medio a base de JCL con *P. shermanii* ATCC 13673.

TAELA XIV. ANALISIS DE COVARIANZA ENTRE LAS FERMENTACIONES A, B y C.

CRITERIO	FERMENTACIONES			
	A B C	A B	A C	B C
1 F cal.	20.66 **	3.88	14.04 **	68.96 **
2 F cal.	4.73 *	----	2.36	16.66 **

1 Ho: $b_{01} + a_{11} x = b_{02} + a_{12} x = b_{03} + a_{13} x$

2 Ho: $a_{11} = a_{12} = a_{13}$

* Significativo

** Altamente Significativo

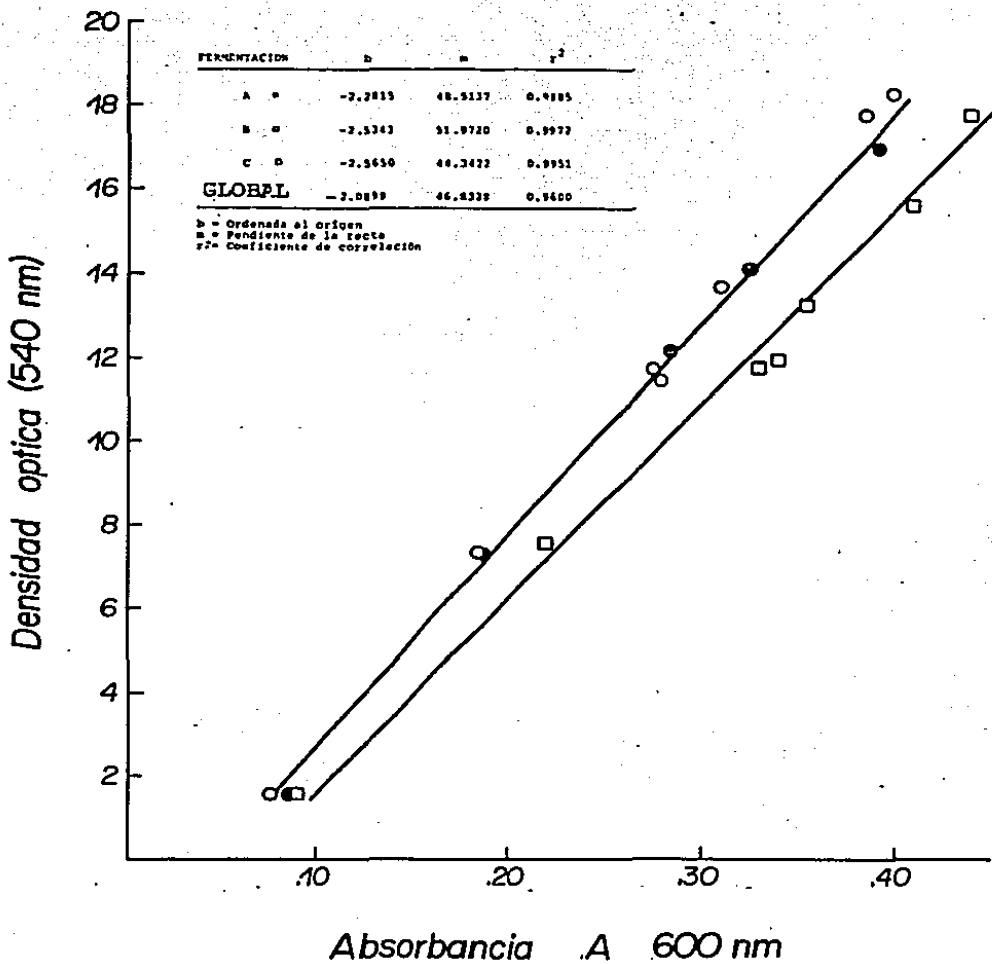


FIGURA 23. Curva que Correlaciona el Crecimiento de *P. shermanii* ATCC 13673 Cuantificado por D.O. a 540 nm vs Absorbancia a 600 nm en la Fermentación de 130 ml de volumen de trabajo / Matraz de 250 ml en un Medio a Base de JCL con *P. shermanii* ATCC 13673.

(volumen de trabajo /matraz de 250 ml). Los resultados (figura _24_) muestran que el nivel de aeración presenta efecto tanto en crecimiento como en producción de vitamina B-12.

A mayor nivel de aeración mayor crecimiento y viceversa. El crecimiento del microorganismo fué mayor (8.0 a 9.0 g/l) donde el volumen de medio de fermentación fué menor disminuyendo el crecimiento (6.0, 5.8 y 3.0 g/l; respectivamente) conforme el volumen de medio se incrementaba (figura _24_) sin presentar diferencia notable en cuanto al patrón de comportamiento en el pH. La velocidad específica de crecimiento ($\mu = h^{-1}$) en condiciones altas de aeración (25 ml/250 ml) es muy diferente al encontrado bajo las condiciones anaeróbicas (200 ml/250 ml) y ambas diferentes a las presentadas bajo condiciones semianaeróbicas (75 y 130 ml/250 ml), en las cuales el microorganismo crece a velocidades específica muy semejantes (figura _25_). Así mismo se observa que el crecimiento del microorganismo se detiene rápidamente (alrededor de las 48 h) cuando se encuentra a bajo nivel de aeración (200 ml/250 ml) y continúa creciendo cuando se encuentra bajo condiciones altas de aeración (25 ml/250 ml); este comportamiento se debe a la mejor utilización del sustrato para formar parte del material celular. Por otro lado, los niveles de 75 y 130 (ml de medio/matraz de 250 ml) parecen tener un nivel intermedio entre los otros dos niveles, ya que el crecimiento se detiene a partir de las 72 h de iniciada la fermentación; condiciones en las que se presenta la mayor producción de vitamina B-12.

La vitamina B-12 fué cuantificada a las 95, 119 y 143 h de fermentación en los 4 niveles de aeración estudiados. Los mejores resultados en cuanto a producción ($\mu\text{g/l}$), producción específica ($\mu\text{g/g}$ de célula) y productividad ($\mu\text{g/lh}$) 5195.83, 1034.20 y 54.70, respectivamente se obtuvieron cuando el microorganismo creció en 130 ml/matraz de 250 ml (figura _26_). La producción y producción específica de este metabolito se mantienen casi estables durante los últimos 3 días de fermentación (figura _26_ y _24_) mientras que la productividad disminuye en este mismo intervalo de tiempo (figura _27_). Los crecimientos más bajos se obtienen cuando el microorganismo se encuentra en los volúmenes de medio de 25 y 200 ml / matraz de 250 ml a pesar de que en esta última condición se presente un mayor incremento en la producción específica a las 119 y 143 h, pero esto se debe a que se tiene menor crecimiento ocasionando que al dividir la cantidad de vitamina producida entre el poco crecimiento que se obtuvo da como consecuencia una producción específica más alta (figura _27_).

Con estos experimentos se demuestra una vez más que el nivel de aeración es importante en la producción de vitamina B-12 empleando al microorganismo *P. shermanii* ATCC 13473, el cual debe estar en una cantidad o proporción tal que permita un adecuado crecimiento y producción de este metabolito.

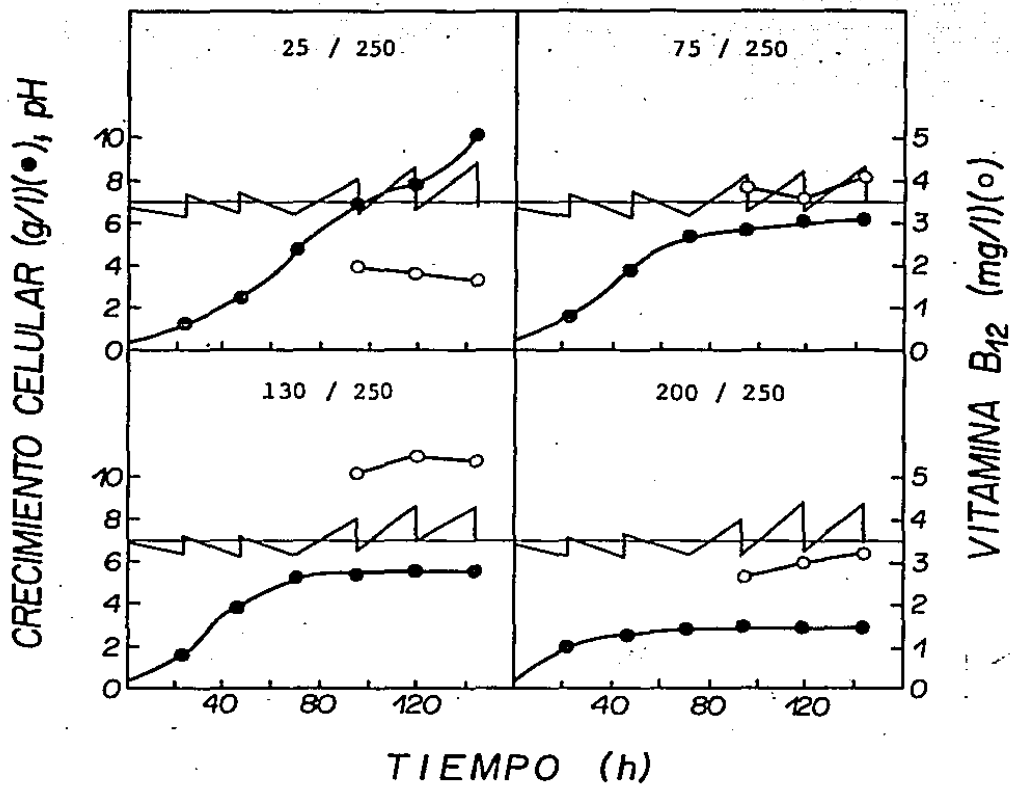


FIGURA 24. Crecimiento Celular y Producción de Vitamina B-12 en la Fermentación con *E. shermanii* ATCC 13673 en un Medio a Base de JCL. bajo Diferentes Niveles de Aeración.

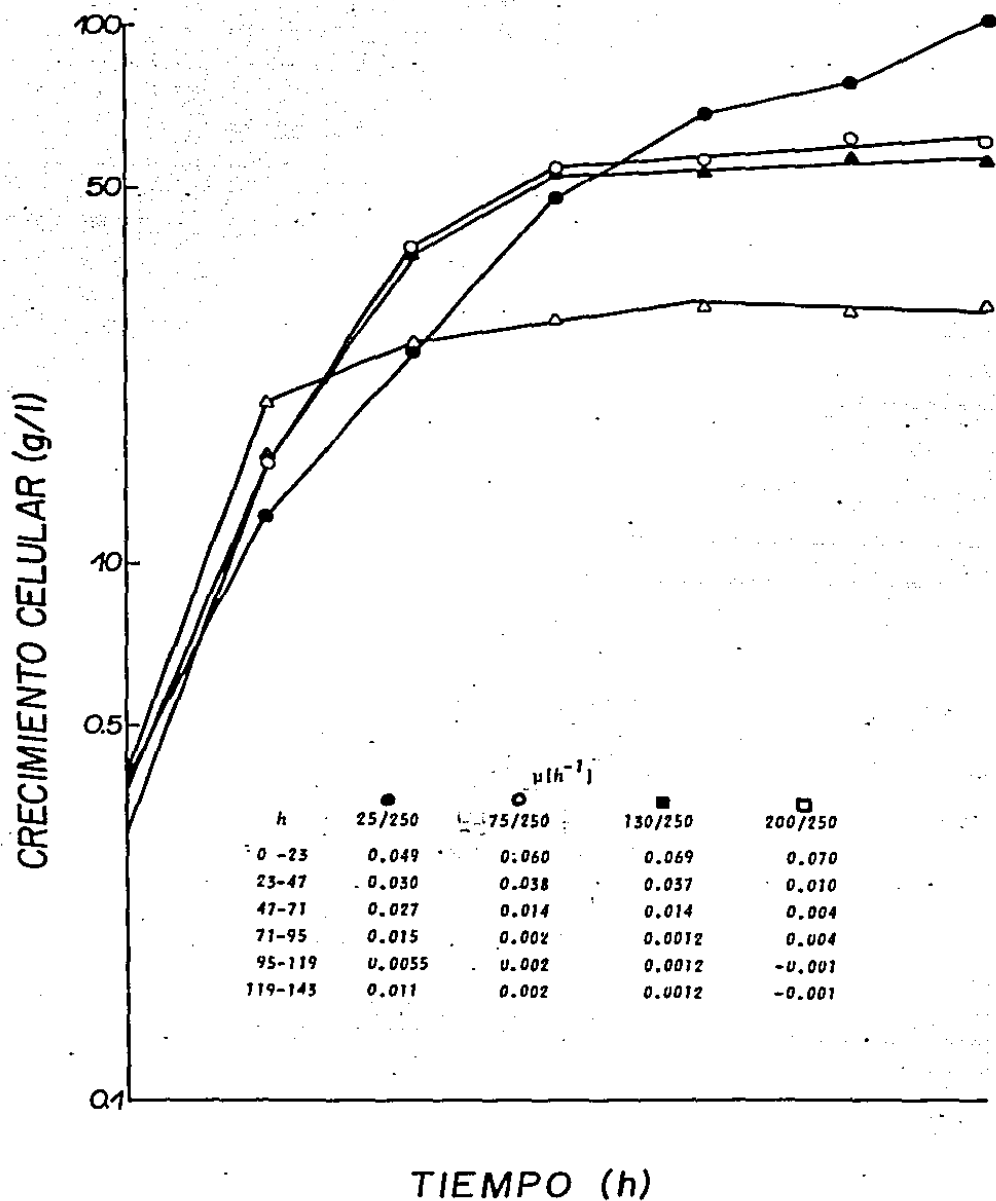


FIGURA 25. Velocidades Especificas de Crecimiento (μ) de *E. shermanii* ATCC 13673 en un Medio a Base de JCL bajo Diferentes Niveles de Aeración.

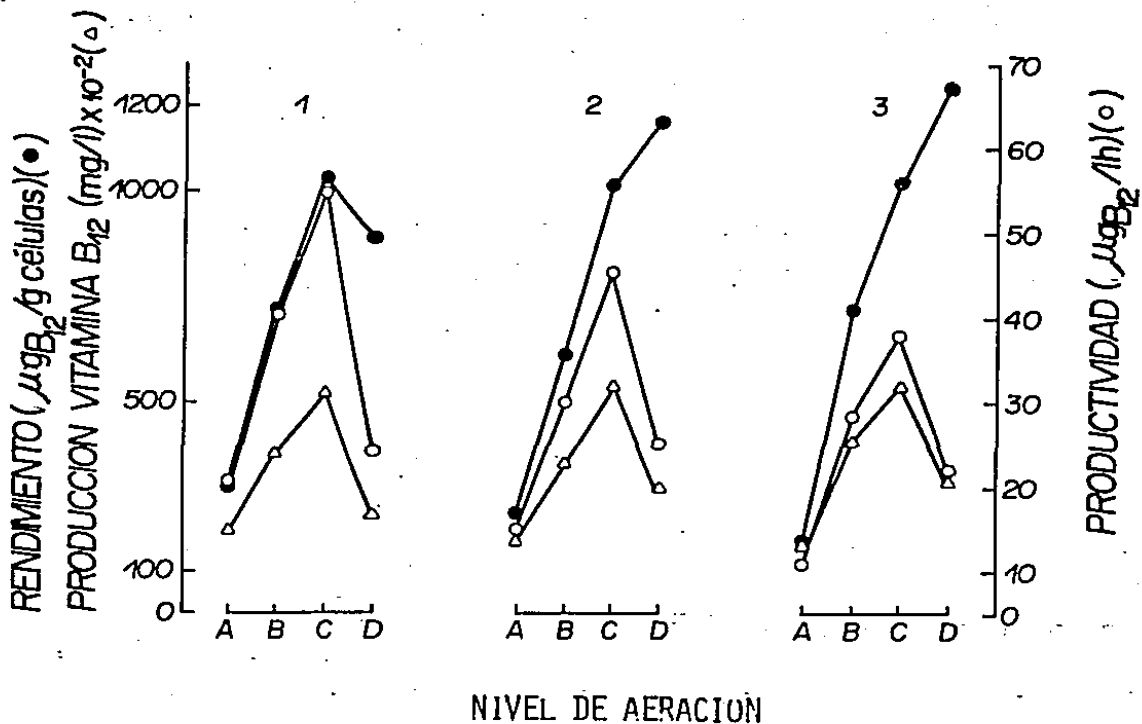


FIGURA 26. Gráfica que Relaciona la Producción, Productividad y Producción Especifica de Vitamina B-12 en Fermentaciones a Base de JCL bajo Diferentes Niveles de Aeración. A = 25 ml, B = 75 ml, C = 130 ml y D = 200 ml de volumen de trabajo contenidos en matraces de 250 ml. 1 = 95 h, 2 = 119 h y 3 = 143 h de haber iniciado la fermentación.

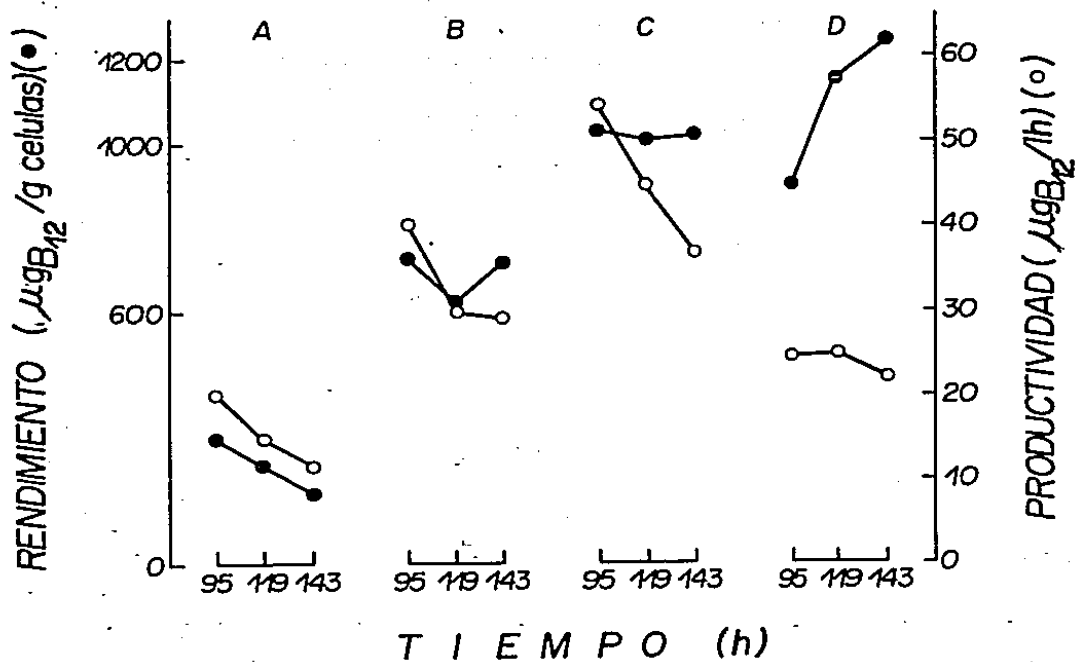


FIGURA 27. Gráfica que Relaciona la Productividad y la Producción Específica de Vitamina B-12 en Función de los 3 últimos días de Fermentación en un Medio a base de JCL. A = 25 ml, B = 75 ml, C = 130 ml y D = 200 ml de volumen de trabajo contenidos en matraz de 250 ml.

Posiblemente a este nivel de aeración (130 ml de volumen de trabajo/en matraz de 250 ml) se producen ciertos compuestos que permitan condiciones favorables para que el crecimiento y producción sean mejores. Dichos compuestos podrían ser sustancias regulatorias sensibles a las condiciones oxidoreductoras que en presencia de altas tensiones de oxígeno se convierte en su forma oxidada y de esta forma inhibir la síntesis del tetrapirrol como sucede en Rhodospseudomonas spheroides con la bacterioclorofila (Burnham 1969) a nivel de la ALA sintetasa (Marriot et al. 1969).

-- Experimentos a dos niveles de aeración.

Convencionalmente la vitamina B-12 es producida por esta clase de microorganismos (Propionibacterias) en fermentaciones a dos etapas de aeración; la primera bajo condiciones anaeróbicas, en la cual se produce la cobinamida (factor B), y una segunda etapa, bajo condiciones aeróbicas, en la cual se forma el nucleótido 5,6-dimetilbencimidazol uniéndose a la primera estructura para formar la vitamina B-12 (cobalamina).

En base a este antecedente se plantearon, las siguientes combinaciones de niveles de aeración: 200-130/250, 200-75/250 y 130/250 (ml de volumen de trabajo/matraz de 250 ml); el cambio de una etapa a otra se realizó a las 72 h de fermentación. Los resultados (figura 28) muestran que en las dos primeras fermentaciones, el microorganismo presenta un crecimiento diádico debido posiblemente al cambio de nivel de aeración que ocasionó un cambio en su metabolismo; situación que no se presentó en la tercera fermentación, lo cual indica una vez más, un comportamiento similar entre las condiciones de 130 y 75 (ml de volumen de trabajo/matraz de 250 ml) infiriendo que la transferencia de oxígeno proporcionado por estos volúmenes de medio es similar, como ya antes se habla comprobado en fermentaciones individuales en cada uno de estos niveles de aeración (sección VIIIa). El crecimiento alcanzado en las dos primeras condiciones son de 2.6 y 5.5 g/l en la primera y segunda etapa de aeración respectivamente, cantidades que fueron menores al presentado en la tercera fermentación, 4.9 y 6.6 g/l respectivamente en cada una de las dos etapas, lo cual indica que esta última fue más eficiente comparada con el crecimiento alcanzado cuando las fermentaciones se llevaron a cabo solo en una etapa (75 ó 130 ml de volumen de trabajo/matraz de 250 ml). Así mismo no se presentó diferencia en el comportamiento de pH.

La velocidad específica de crecimiento ($\mu = h^{-1}$) bajo las condiciones de 200-130 y 200-75 (ml de volumen de trabajo/matraz de 250 ml) son muy semejantes entre ellas y totalmente diferentes a la presentada en la condición de 130-75 (ml de trabajo/matraz de 250 ml) a pesar de que a las primeras 24 h parten con la misma velocidad específica

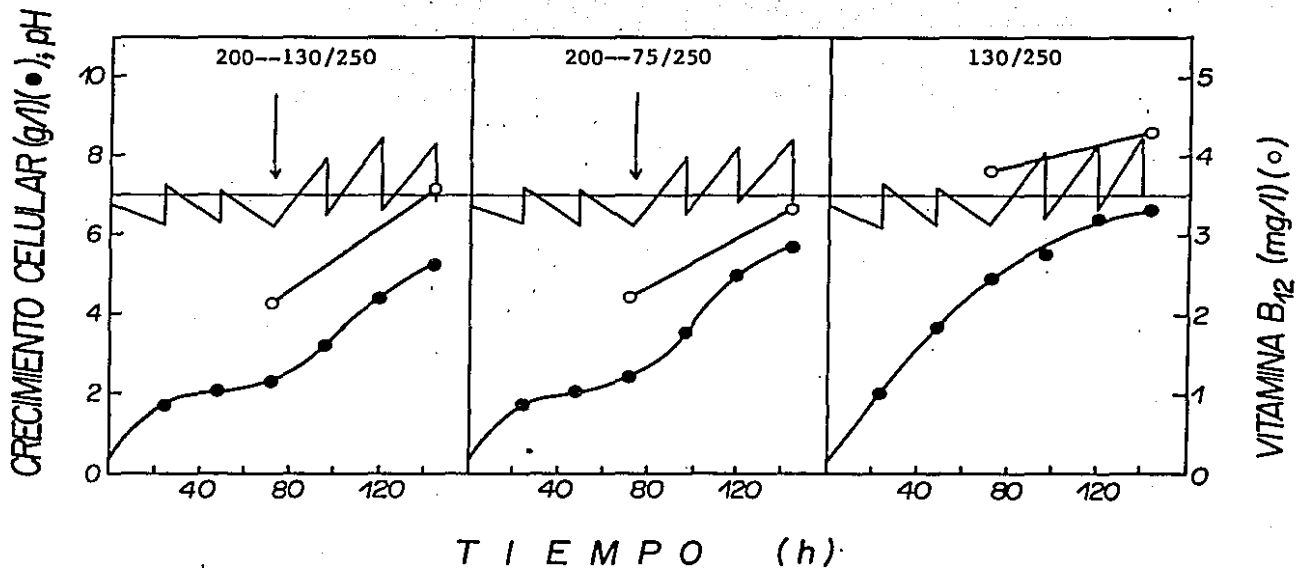


FIGURA 28. Crecimiento Celular y Producción de Vitamina B-12 en la Fermentación con *P. shermanii* ATCC 13673 en un Medio a Base de JCL bajo diferentes niveles de aeración. La flecha indica cambio de nivel de aeración. Los números en la parte superior es el volumen de trabajo contenidos en matraz de 250 ml.

(figura _29_).

La producción de vitamina B-12 que solo fué cuantificada al cambio de aeración y al final de la fermentación fué similar en las dos primeras fermentaciones, siendo de 2.0 a 3.5 mg/l respectivamente al cambio de aeración y al final de la misma, y menores a la producida en la tercera fermentación, la cual produjo 3.8 y 4.3 mg/l al cambio y al final del proceso, respectivamente, valor casi comparable al producido bajo las condiciones de 130 ml de volumen de trabajo/matraz de 250 ml.

La producción específica y productividad, muestran tendencia a disminuir del tercer al sexto día de la fermentación siendo más drástica la caída del primer parámetro en las dos primeras fermentaciones y el segundo parámetro en la tercera fermentación (figura _30_).

De todas las condiciones de aeración probadas, el mejor nivel de aeración encontrado fué al emplear 130 ml de medio de fermentación/matraz de 250 ml en los tres parámetros determinados en las fermentaciones, mismas que son 5 veces mayores con las encontradas a nivel fermentador (Santana 1983) y con la producción específica reportada en la bibliografía (Tabla _XV_).

Al mejor nivel de aeración encontrado se le determinó su cinética de fermentación, con el fin de tener un panorama general del comportamiento de este microorganismo (figura _31_) bajo esta condición de aeración.

En dicho experimento se cuantificaron los parámetros cada 24 h durante los 6 días que duró la fermentación. El microorganismo alcanzó un crecimiento entre 5.2 a 5.6 g/l y una producción de vitamina B-12 de 4.5 mg/l. Hubo consumo de 8.0 g/l de azúcares reductores totales hasta las 72 h, cantidad que parece ser la disponible para poder ser usada por el microorganismo y 0,75 g/l de nitrógeno total, consumidos poco a poco durante el curso de la fermentación. El ácido láctico presente en el medio de fermentación fué consumido en su totalidad (5.5 g/l) en las primeras 24 h de la fermentación, presentándose producción de ácido succínico alrededor de 1.0 g/l sin que se definiera un patrón de comportamiento razonable en el consumo de ácido cítrico, posiblemente a causa de algún error en la técnica empleada, o bien una utilización no bien definida por el microorganismo ó no ser fácilmente metabolizada por *E. shermanii* ATCC 13673.

Viiib. Efecto de la concentración y tiempo de adición de los precursores glicina y cobalto sobre la producción de vitamina B-12.

Un precursor se define (Lee 1951), como aquella(s) sustancia(s) adicionada(s) al medio de fermentación antes de

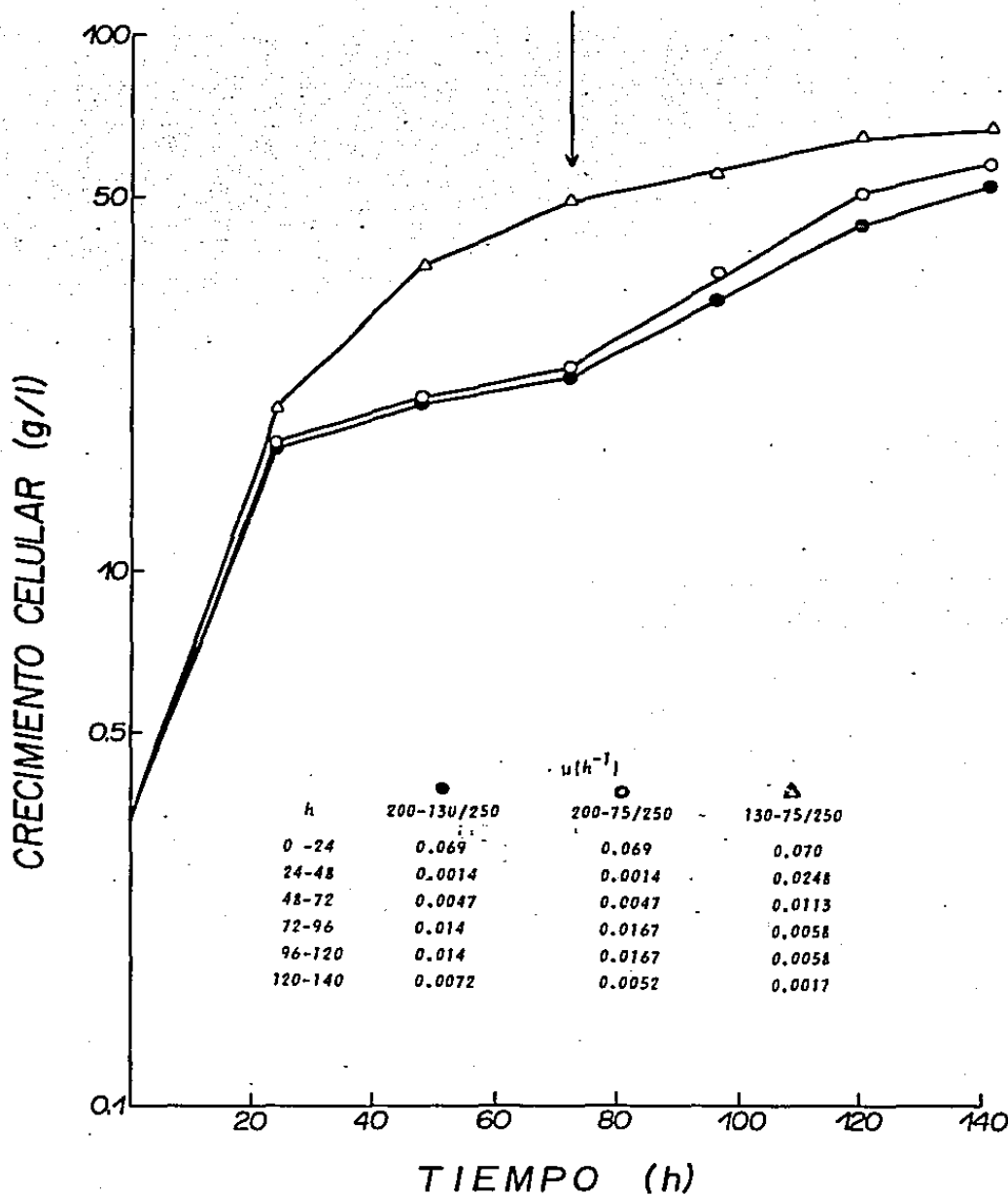


FIGURA 29. Velocidades Especificas de Crecimiento (μ) de *P. shermanii* ATCC 13673 en un Medio a base de JCL bajo condiciones combinadas de nivel de aeración. La flecha indica el momento en que se realizó el cambio en el nivel de aeración para \circ y \bullet .

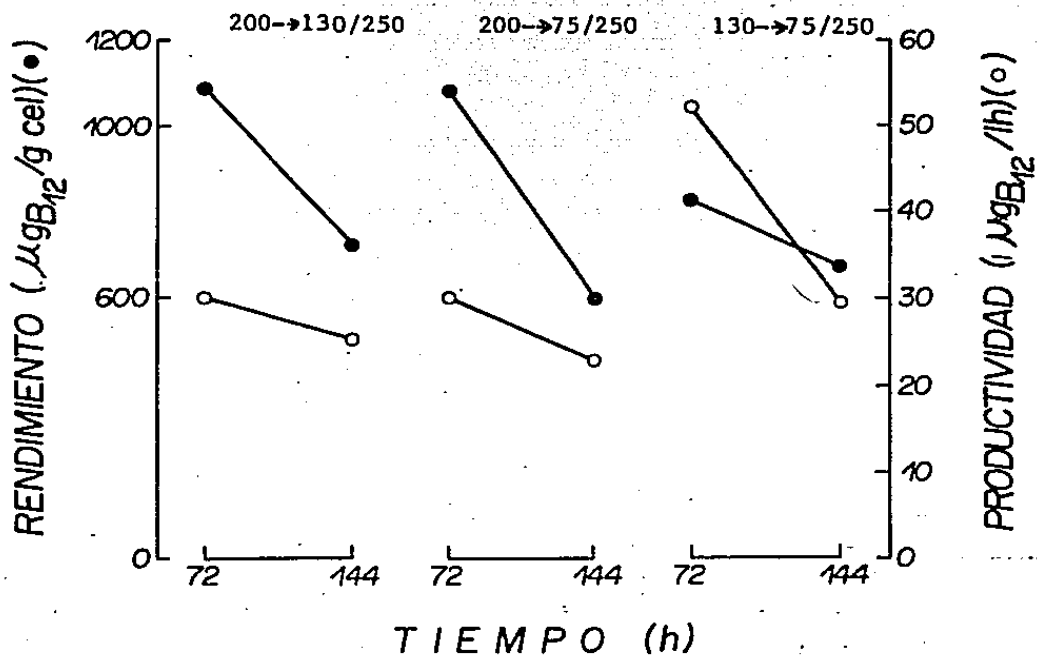


FIGURA 30. Gráfica que Relaciona la Productividad y la Producción Específica de Vitamina B-12 a las 72 y 144 horas de Fermentación en un Medio a Base de JCL a Diferentes Niveles de Aeración.

TABLA XV . PRODUCCION, PRODUCCION ESPECIFICA Y PRODUCTIVIDAD DE VITAMINA B₁₂ A DIFERENTES NIVELES DE OXIGENO.

CONDICION	TIEMPO MAXIMO DE PRODUCCION (h)	PRODUCCION ($\mu\text{gB}_{12}/\text{l}$)	PRODUCCION ESPECIFICA ($\mu\text{gB}_{12}/\text{g}_{\text{cel}}$)	PRODUCTIVIDAD ($\mu\text{gB}_{12}/\text{lh}$)
Perlman (1977)				385.00
* Anaeróbica	168	1838.30	10.94	557.07
* Aeróbica	117	2558.40	21.90	802.00
* Anaerób-Aerob.	166	1326.60	8.00	449.70
* Anaerób-Aerob/Adn	72	1468.80	20.40	397.00
** 25/250	95	1492.17	20.44	301.18
** 75/250	95	3835.25	40.37	730.18
** 130/250	95	5195.83	54.70	1034.20
** 200/250	143	3186.78	22.30	1240.72
& 200-130/250	144	3567.67	24.80	729.58
& 200- 75/250	144	3280.70	22.78	612.07
& 130- 75/250	144	4300.00	29.57	680.00

* A nivel fermentador (Santana, 1983)

** Volumen de medio de fermentación contenidos en matraces de 250 ml.

& Cambio de volumen de medio de fermentación en matraces de 250 ml.

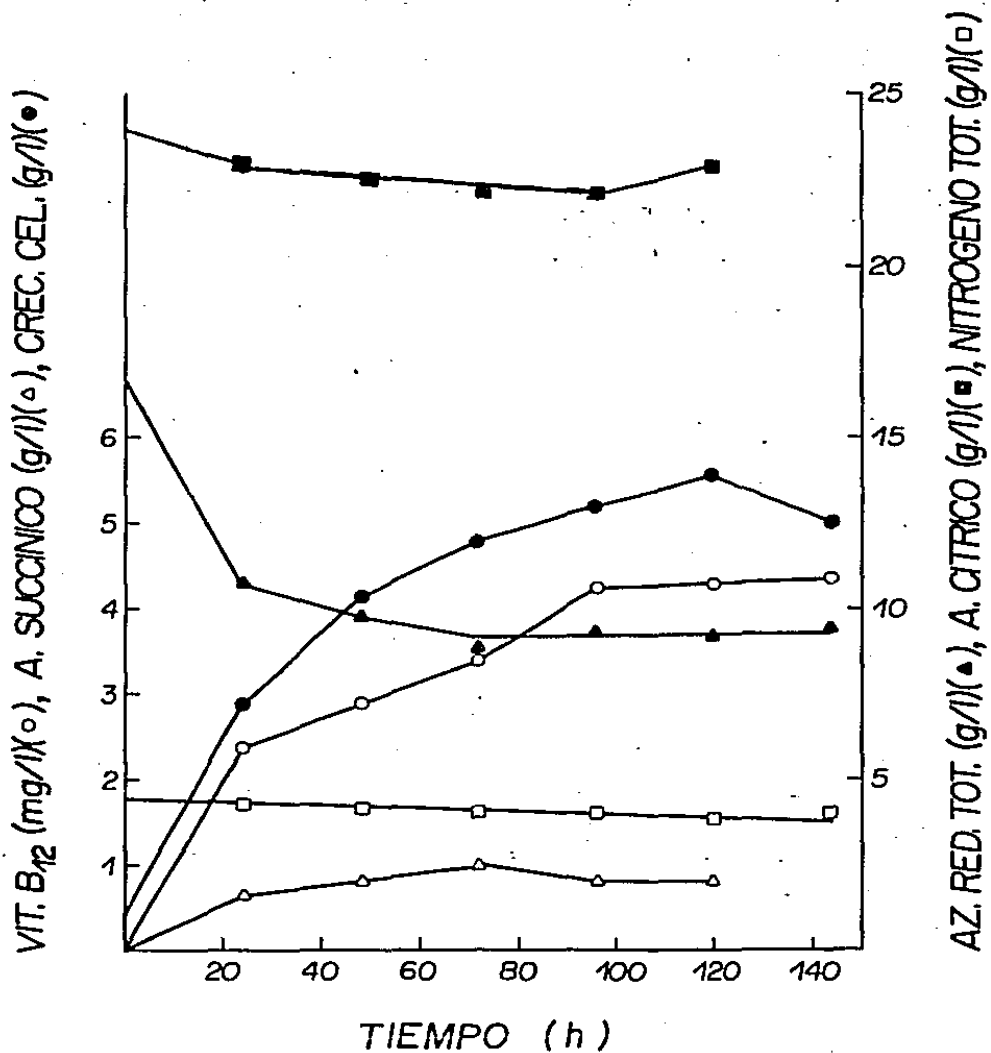


FIGURA 31. Curva, Concentración vs Tiempo en la Fermentación de 130 ml de volumen de trabajo / Matraz de 250 ml en un Medio a base de JCL con *E. shermanii* ATCC 13673.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

ó simultaneamente con el proceso, las cuales son incorporadas sin ningún cambio en la molécula del producto de la fermentación, y la cual generalmente incrementa la producción y ó mejora la calidad del producto.

Los precursores requeridos en ciertas fermentaciones industriales son proporcionadas por los constituyentes nutritivos del medio, tal como el agua de cocimiento de maíz (ACM) ó por adición de algunos compuestos puros ó por la adición de ambos.

De esta forma el principal criterio para emplear un precursor, es que éste llegue a ser incorporado al producto de la fermentación.

-- Experimento Control.

Se llevó a cabo este experimento con el fin de poder comparar las fermentaciones a las cuales les fué adicionado los precursores. En dicho experimento se cuantificó el crecimiento durante toda la fermentación y la vitamina B-12 a las 72, 96, 120 y 144 h de fermentación. Los resultados (figura 32) muestran un crecimiento de alrededor de 5.0 g/l, consumo total de ácido láctico dentro de las primeras 40 h de fermentación, sin consumo de ácido cítrico y con una producción de 2.8 g/l de ácido succínico. La producción de vitamina B-12 se mantuvo alrededor de los 2.8 mg/l, la producción específica osciló entre los 500 y 600 $\mu\text{g/g}$ de célula y la productividad bajó de 32 a 15 $\mu\text{g/lh}$, en los últimos 4 días de la fermentación. El microorganismo mostró una velocidad específica de crecimiento ($\mu = \text{h}^{-1}$) de 0.137 h^{-1} en las primeras 6 h de iniciada la fermentación, disminuyendo posteriormente conforme avanzaba la fermentación (figura 33), comportamiento similar al presentado ya en otras fermentaciones.

Es importante mencionar que este experimento fué realizado por triplicado; el agua de cocimiento de maíz (ACM) utilizada fué de un lote diferente al empleado en los anteriores experimentos y además le fué adicionado 7.6 ml de ácido láctico al medio de fermentación; con el fin de estandarizar el contenido de ácido láctico a una cantidad aproximada de 12 a 13 g/l, cantidad promedio aportada por el ACM en al medio de fermentación. Posiblemente por eso el crecimiento y la cantidad de vitamina B-12 producida fué diferente a la encontrada en los anteriores experimentos.

-- Experimentos con Glicina.

En Diplococcus glycinophilus, se ha encontrado que es capaz de desarrollarse empleando glicina como única fuente de energía de carbono y de nitrógeno. La glicina al reaccionar con el ácido tetrahidrofólico forma el ácido metilentetrahidrofólico, el cual al condensarse con otra

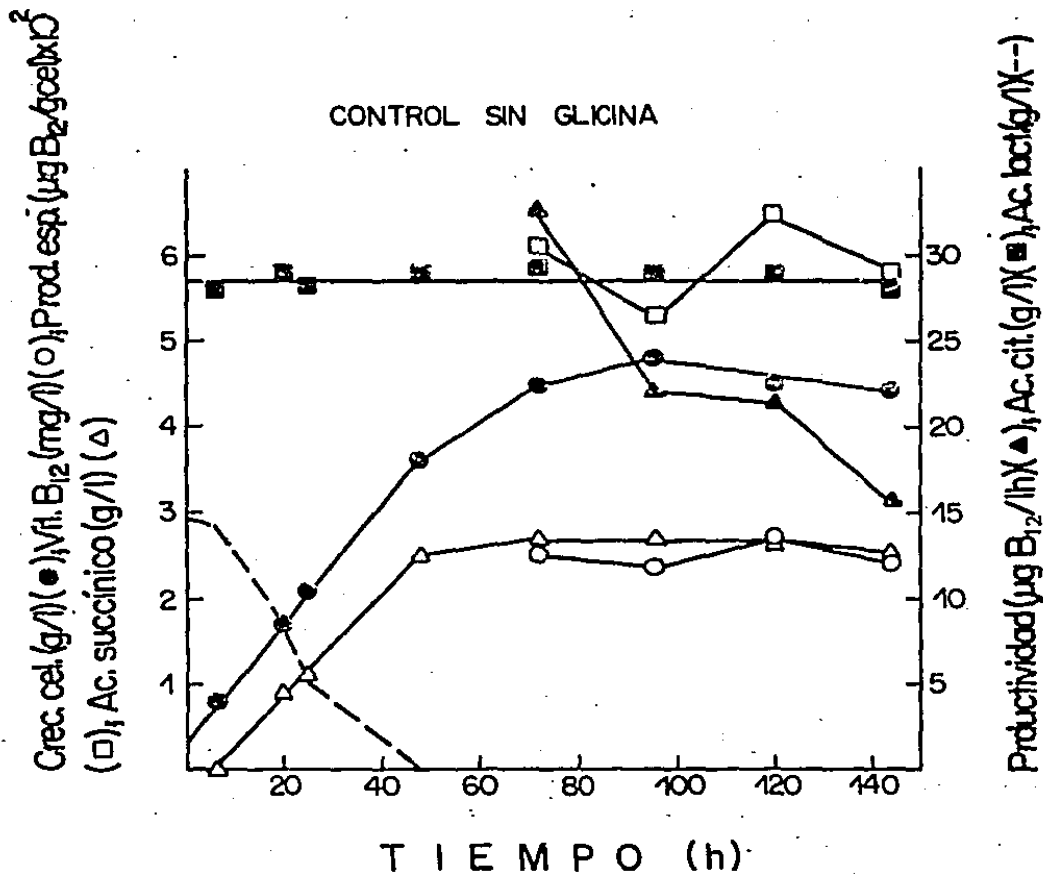


FIGURA 32. Curva, Concentración vs Tiempo en la Fermentación de 130 ml de Medio/Matraz de 250 ml en un Medio a base de JCL con *P. shermanii* ATCC 13673. Nuevo Lote de JCL y Adición Aproximada de 7.6 ml/l de Ácido Láctico. La vitamina B-12 fue analizada a las 72, 96, 120 y 144 h de fermentación.

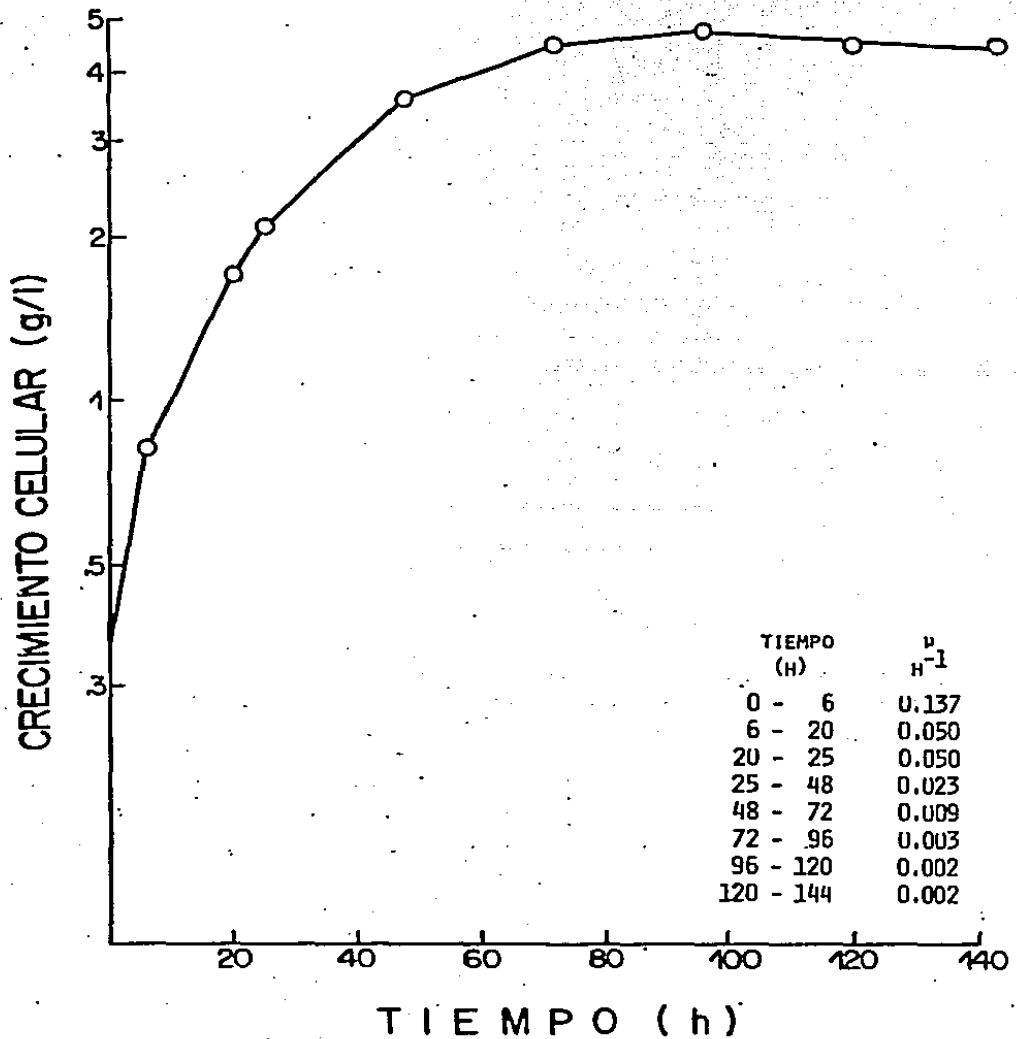


FIGURA 33. Velocidades Especificas de Crecimiento (μ) de *E. shermanii* ATCC 13673 en la Fermentación de 130 ml de Medio/Matraz de 250 ml en un Medio a base de JCL. Nuevo Lote de JCL y adición de 7.6 ml de ácido Láctico.

molécula de glicina da lugar a la formación de serina, que a su vez puede convertirse en piruvato. El piruvato puede oxidarse, a fin de producir energía o emplearse para la síntesis de constituyentes celulares (ruta general en plantas, animales y en bacterias). Además a partir de la glicina pueden formarse una gran variedad de compuestos (Metzler 1977). Una de las principales rutas del metabolismo de la glicina es la formación de porfobilinógeno y de los diversos pigmentos pirrólicos que se derivan de él.

Este sería un riesgo al emplear al precursor "glicina" con el objeto de incrementar la producción de vitamina B-12. Pero como se sabe, el succinil-CoA se condensa con la glicina en el interior de la matriz mitocondrial en las células animales y forma el ácido d-aminolevulinico, que se convierte en porfobilinógeno, precursor inmediato de las porfirinas. Ya que la vitamina B-12 es una porfirina se espera que suceda esto último y de esta forma poder incrementar la producción de vitamina B-12.

Dado que en estudios anteriores (Santana 1983), se obtuvo producción de ácido succínico, en fermentaciones empleando jugo cocido de limón como sustrato, para la producción de vitamina B-12 y teniendo el conocimiento de que esta sustancia junto con glicina son los dos precursores iniciales en la ruta biosintética (ver figura 5) de dicho metabolito; se planearon los siguientes experimentos para conocer el tiempo de adición y concentración óptimos de glicina que incremente la producción de vitamina B-12.

Dichos experimentos se planearon en base a un diseño factorial 2² con un punto central; donde los únicos dos factores a variar fueron: concentración de glicina y tiempo de adición de glicina. La matriz experimental fue la siguiente:

TIEMPO DE ADICION DE GLICINA (h)	CONCENTRACION DE GLICINA (mM)		
	10	20	30
72	==		==
96		==	
120	==		==

Las concentraciones de glicina utilizadas se seleccionaron en base a lo que reporta la bibliografía (tabla XVI) y los tiempos de adición se eligieron en base a los resultados encontrados en anteriores experimentos (Santana 1983); donde el ácido succínico comienza a acumularse a partir de las 72 h

TABLA XVI. CONCENTRACION DE GLICINA EMPLEADA PARA LA PRODUCCION DE VITAMINA B-12.

CONCENTRACION DE GLICINA (mM)	MICROORGANISMO	REFERENCIA
13 a 40	<i>E. freudenreichii</i>	Noyes (1969)
2.2	<i>Eubacterium limosum</i>	Lam (1982)
5.0	<i>Rhodospseudomonas spheroides</i>	Burton (1981)
6.7	Bacterias Metabólicas	Dumenil (1981)

de haber comenzado la fermentación. Los experimentos fueron realizados por duplicado, cuantificando crecimiento durante el curso de la fermentación y vitamina B-12 cada 24 h después de la adición del precursor. Los resultados (figura _34_) muestran un crecimiento similar entre cada uno de los experimentos y a su vez similares al experimento control. Se obtuvo 24 % más de vitamina B-12 (3 a 4 mg/l) cuando la adición de glicina fué a las 72 h en comparación a la producida cuando fué adicionado el precursor a las 120 h (2.5 a 2.7 mg/l) sin importar la concentración agregada al medio de fermentación.

Independientemente de la concentración de glicina adicionada al medio de fermentación, la producción de vitamina B-12 fué ligeramente mayor (3 a 4 mg/l) cuando fué adicionada a las 72 h en comparación a la producida cuando este mismo precursor fué adicionado a las 96 h (2 a 3 mg/l) y 120 h (2.5 a 2.7 mg/l).

De las condiciones evaluadas la mayor producción (4 mg/l), producción específica (1000 μ g/g de célula) y productividad (43.5 μ g/lh) se obtuvieron 24 h después de haber sido adicionado 10 mM de glicina a las 72 h de fermentación, disminuyendo posteriormente hasta el fin de la misma (figura _34_).

Considerando los resultados al último día de fermentación (144 h), la producción no muestra mayor diferencia cuando la glicina (10 ó 30 mM) se adiciona a las 72 h de fermentación como se obtienen cuando es adicionado a las 120 h. Dicho comportamiento lo presenta la productividad bajo las mismas condiciones. Por otro lado, la producción específica muestra mejores resultados a baja concentración y tiempo de adición de glicina (figura _35_).

Los resultados a las 144 h de fermentación fueron analizados estadísticamente obteniendo las ecuaciones (tabla A, anexo 3) que describen el comportamiento de producción y producción específica de vitamina B-12 (figuras _36_ y _37_). La primera muestra que la producción de vitamina B-12 depende solo del tiempo de adición de glicina más no de la concentración adicionada; por lo tanto, para incrementarla se tiene que disminuir el tiempo de adición del precursor. En la segunda gráfica, la producción específica depende tanto del tiempo como de la concentración del precursor adicionado señalando que para poder incrementarla se tienen que disminuir ambos factores.

Dicho análisis también indicó, que la máxima producción que se podría obtener, bajo estas condiciones sería de 3.8 mg/l (figura _36_) y no más de 800 μ g/g de célula de producción específica de vitamina B-12 (figura _37_).

-- Experimentos con cobalto.

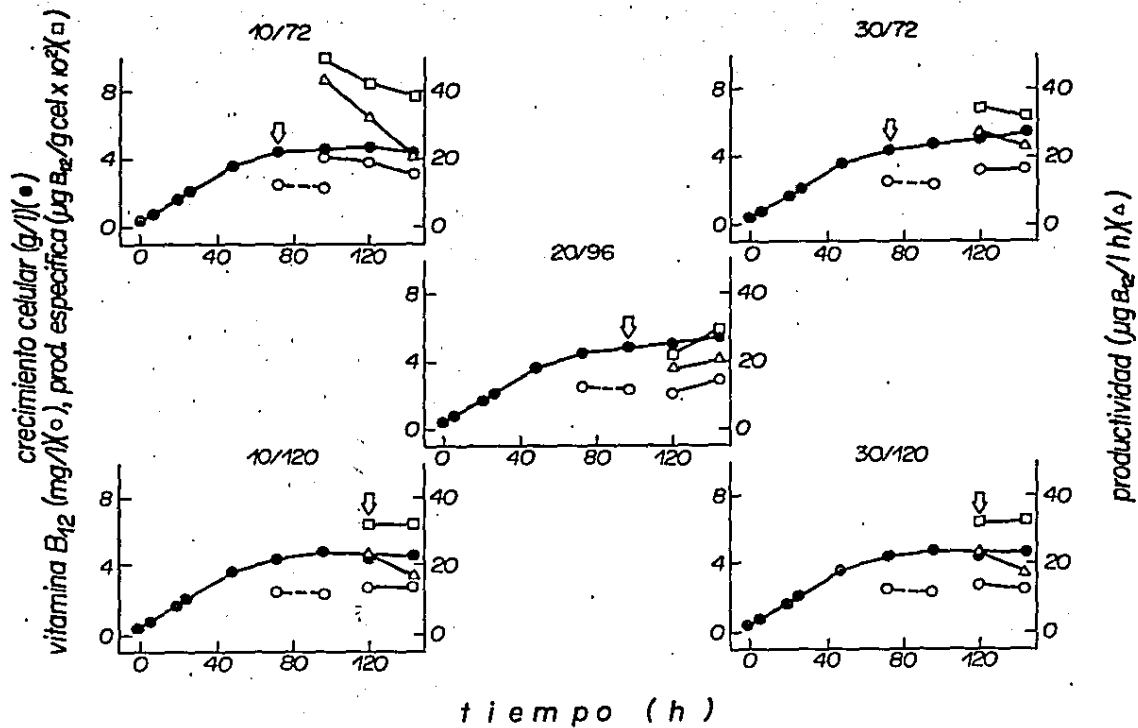


FIGURA 34. Curva, Concentración vs Tiempo en la Fermentación de 130 ml de Medio/Matraz de 250 ml en un Medio a base de JCL con *P. shermanii* ATCC 13673. Diferentes Concentraciones y Tiempos de Adición de Glicina (concentración/tiempo). Las flechas indican el momento de la adición del precursor.

Vit. B₁₂ (mg/l)(●●); Prod. esp. (μg B₁₂/g cel)(■□) × 10².

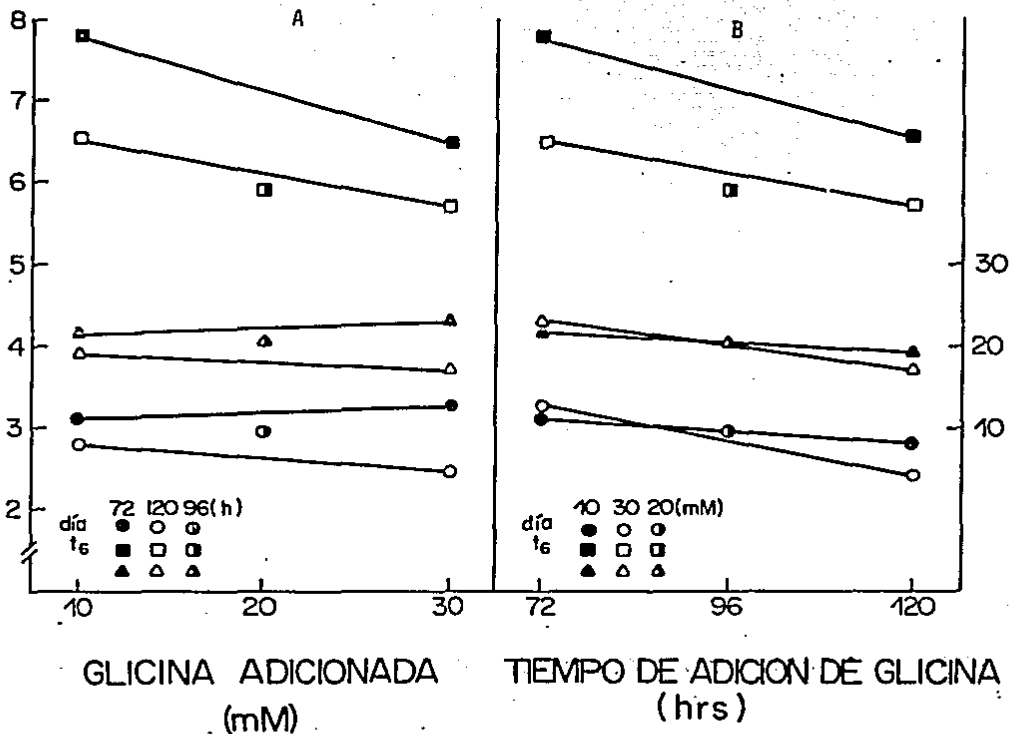


FIGURA 35. Gráfica que Relaciona a la Producción, Producción Específica y Productividad de Vitamina B-12 vs A = Glicina Adicionada y B = Tiempo de Adición de Glicina (h). Vitamina B-12 analizada a las 144 h de fermentación.

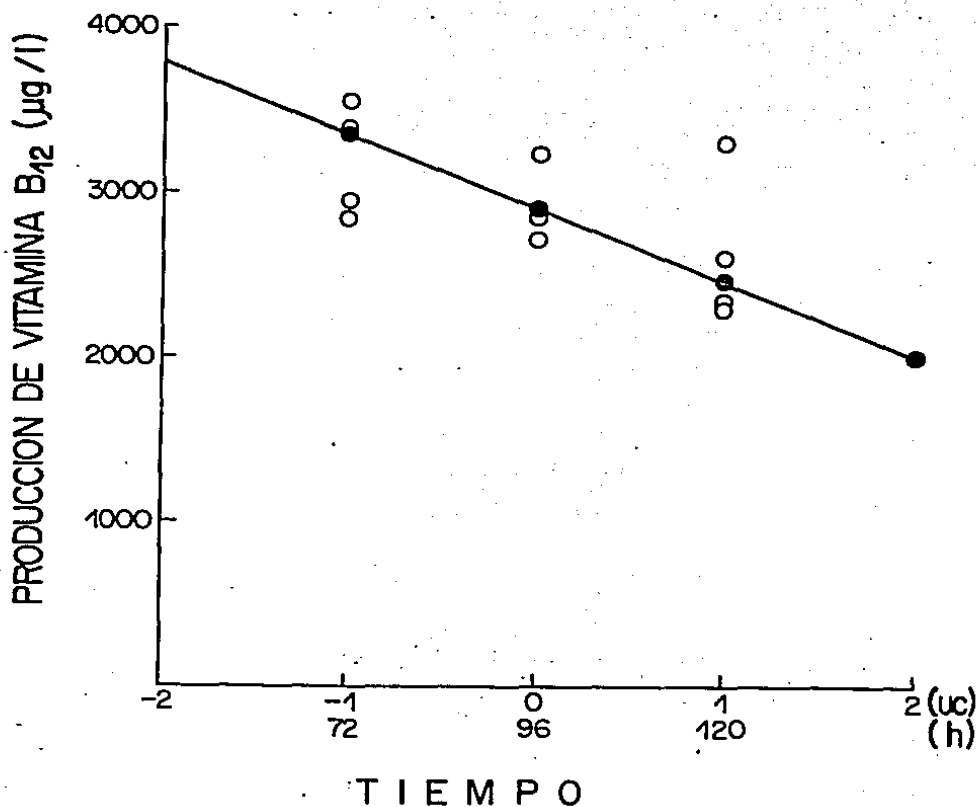


FIGURA 36. Gráfica de contorno que relaciona la producción de vitamina B-12 ($\mu\text{g/l}$) vs Tiempo (h) de adición de glicina (mM). Producción independiente de la concentración de la glicina adicionada. Vitamina B-12 analizada a las 144 h de fermentación; (o) = datos experimentales; (●) = producción teórica en base a la ecuación:

$$\hat{Y} = 2914.006364 - 442.1575 T$$

Donde: \hat{Y} = producción estimada de vitamina B-12.

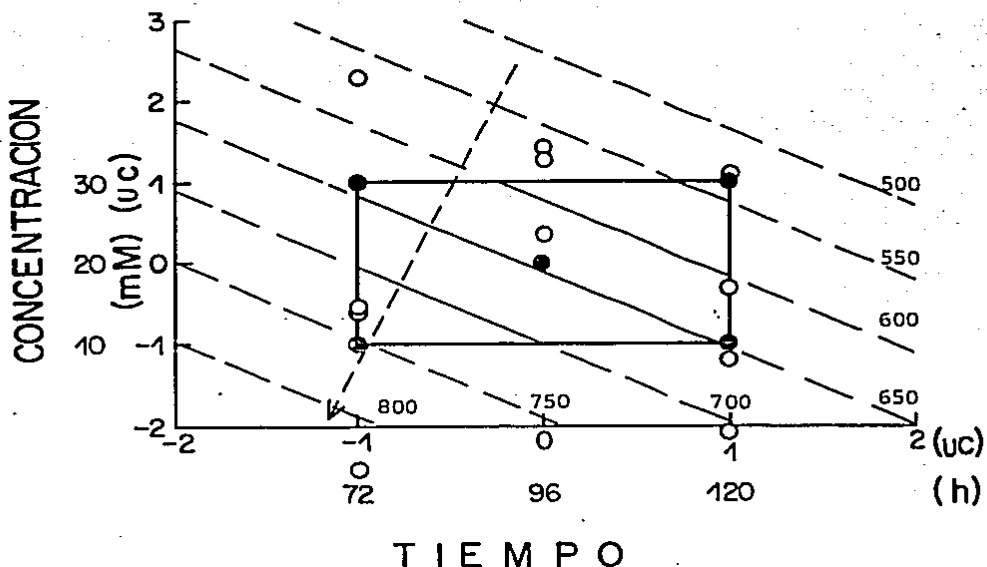


FIGURA 37. Gráfica de contorno, Concentración de glicina (nm) adicionada vs Tiempo (h) de adición de glicina en la Producción Especifica de Vitamina B-12 (ug de B-12/g de célula). (o) = zona de exploración ó experimentación; líneas continuas = comportamiento lineal de la producción especifica de la vitamina B-12 dentro de la zona de exploración; líneas discontinuas = producción especifica de vitamina B-12 fuera de la zona explorada; (•) = datos experimentales; (UC) = unidades codificadas. La ecuación encontrada que relaciona la producción especifica de vitamina B-12 con la concentración y tiempo de adición de glicina es:

$$\hat{Y} = 644.06686 - 55.25105 C - 52.34418 T .$$

Donde \hat{Y} = Producción especifica estimada de vitamina B-12. Cuantificación realizada al final de la fermentación.

El cobalto es el metal que forma el complejo cobaltocorrinoide (ácido cobirínico) al ser quelado por el tetrapirrol uropofirínógeno III (macroanillo de la vitamina B-12). Si la concentración de cobalto en el medio de cultivo es bajo, entonces su adición al medio de cultivo estimulará la síntesis de vitamina B-12; hecho que ha sido demostrado en microorganismos tales como micobacterias y en Streptomyces griseus. Se ha encontrado que 50 ppm de cobalto inhiben su síntesis y 1 ppm la limita, tanto como un 75 % del cobalto adicionado puede ser incorporado a la vitamina, aunque el grado de incorporación baja rápidamente con el incremento en la concentración de cobalto (Perlman and O'Brien 1954). Se ha encontrado también que la adición de cobalto favorece más la producción de vitamina B-12 bajo condiciones aeróbicas que anaeróbicas.

Se conoce poco sobre el mecanismo de incorporación del cobalto hacia la formación de dicha vitamina, sin embargo existen estudios en Corynebacterium tetanormorphum que aunque no produce hemo, se ha demostrado que contiene una enzima llamada cobalto porfirin sintetasa, la cual inserta al cobalto en varias porfirinas dicarboxílicas (Friedman and Cagen 1970).

Generalmente se ha aceptado que para tener un rendimiento máximo de vitamina B-12, el cobalto debe ser adicionado al medio de cultivo tomando en cuenta:

- a) La cantidad ya presente en los componentes del medio.
- b) La tolerancia del microorganismo al ión cobalto, respetando si esta se encuentra en forma de nitratos ó cloruros.

El cobalto es un factor importante para la formación de vitamina B-12 y su adición al medio de cultivo respetando concentración y tiempo de adición, favorece que su producción se incremente bajo determinadas condiciones de fermentación. Por tal motivo se estudió, el efecto que tiene dicho precursor sobre la producción de éste metabolito al variar concentración y tiempo de adición en el medio de fermentación.

Las concentraciones de cobalto con las cuales se trabajaron (10, 20 y 30 ppm) fueron seleccionados en base a lo que reporta la bibliografía para las Propionibacterias (Tabla XVII), concentraciones promedio que muestran ser más frecuentes.

Los tiempos de adición empleados fueron a los 3 primeros días de fermentación (24, 48 y 72 h) debido a las características mismas de la producción, ya que se emplea para la formación del cobaltocorrinoide, a pesar de no conocer su mecanismo de incorporación. La razón por la cual se decidió adicionar el precursor a las 24 h se hizo con el fin de que

TABLA XVII. CONCENTRACIONES DE COBALTO EMPLEADO EN PROCESOS FERMENTATIVOS PARA LA PRODUCCION DE VITAMINA B-12.

SAL	CONCENTRACION DE COBALTO (ppm)	MICROORGANISMO	REFERENCIA
CoSO ₄ · 7H ₂ O 4 2	400	<i>E. shermanii</i>	Zodrow (1963d)
CoCl ₂ 2	10	<i>E. shermanii</i> <i>E. janssenii</i>	Kramli (1964)
CoCl ₂ 2	30	<i>E. shermanii</i>	Ibragimova (1979)
CoCl ₂ 2	10	<i>E. shermanii</i>	Vorob'eva (1964)
CoSO ₄ · 7H ₂ O 4 2 +2	13	<i>E. shermanii</i>	Zodrow (1936 b)
Co	20	<i>E. shermanii</i>	Bullerman (1966 a)
CoCl ₂ 2	5 a 25	<i>E. shermanii</i>	Bullerman (1966 b)
Co(NO ₃) ₂ 3 2	10	<i>E. freudenreichii</i> <i>E. pentosaceum</i>	De Vries (1973)
Sal de cobalto	10 a 100	Propionibacterias	Florent (1979)
CoCl ₂ · 6H ₂ O 2 2	4.5	<i>E. shermanii</i> <i>E. freudenreichii</i>	Noyes (1969)
"	6.0	<i>E. shermanii</i> <i>E. freudenreichii</i>	"
CoCl ₂ · 6H ₂ O 2 2	8.0	<i>E. shermanii</i> <i>E. freudenreichii</i>	"
"	10	<i>E. shermanii</i> <i>E. freudenreichii</i>	"
CoSO ₄ · 7H ₂ O 4 2	12	<i>E. shermanii</i> <i>E. freudenreichii</i>	"

el microorganismo utilizara el cobalto proporcionado por los mismos constituyentes del medio de fermentación así como de la formación del tetrapirrol para que al momento de adicionar el cobalto este fuera utilizado para la formación del cobaltocorrinoide.

Estos experimentos se planearon en base a un diseño factorial 2^2 con un punto central, cuyos factores a variar, concentración y tiempo de adición del cobalto, quedan relacionados de la siguiente manera:

TIEMPO DE ADICION DE COBALTO (h)	CONCENTRACION DE COBALTO (ppm)		
	10	20	30
24	==		==
48		==	
72	==		==

En estos experimentos el crecimiento fué cuantificado cada 24 h y la producción de vitamina B-12 a las 96, 120 y 144 h de fermentación.

El crecimiento del microorganismo fué muy semejante en los 5 experimentos realizados, proporcionando en promedio 5.2 g/l de biomasa. La producción de vitamina B-12 alcanzó mayores niveles cuando el cobalto fué adicionado a una concentración de 10 ppm a las 24 h de fermentación, producción que fué disminuyendo poco a poco (de 4.9 a 3.8 mg/l) en los 3 últimos días de fermentación. La producción en las otras 4 condiciones tienen un comportamiento muy semejante, pero sus niveles alcanzados son diferentes entre sí; mientras que en las fermentaciones donde se adicionaron 20 y 30 ppm a las 48 y 24 h, respectivamente produjeron entre 2 a 4 mg/l del metabolito de interés. Para las fermentaciones donde se adicionaron 10 y 30 ppm a las 72 h, las producciones fueron aún más bajas, en el orden de 1 a 2 mg/l (figura 38).

En todos los experimentos realizados, la producción específica y la productividad guardan una similitud en comportamiento. Tanto el primero como el segundo parámetro, van disminuyendo en función del tiempo de adición, independientemente de la concentración de cobalto adicionado. Se presentan mejores resultados cuando el precursor se añade a las 24 h de haber comenzado la fermentación, 600 a 900 $\mu\text{g/g}$ de célula y 20 a 50 $\mu\text{g/lh}$, para producción específica y productividad, respectivamente (figura 38).

En general, la producción de vitamina B-12 fué mayor a

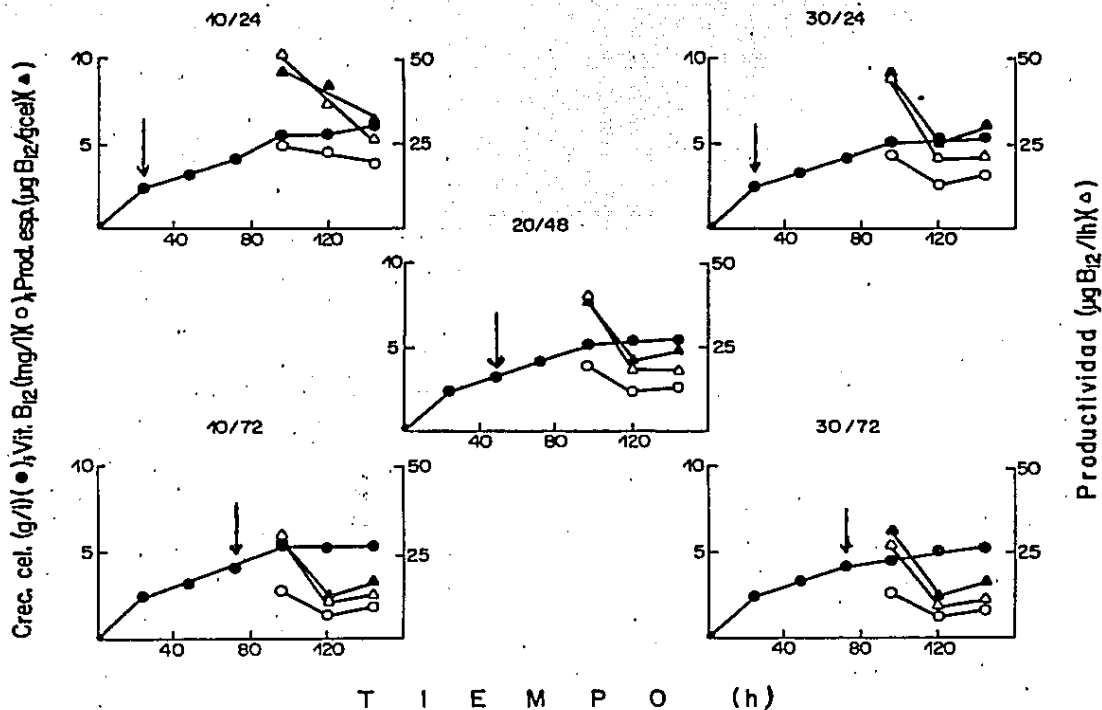


FIGURA 38. Curva, Concentración vs Tiempo en la Fermentación de 130 ml de Medio/Matraz de 250 ml en un Medio a base de JCL con *E. shermanii* ATCC 13673. Diferentes Concentraciones y Tiempos de Adición de Cobalto (concentración/tiempo de adición). Vitamina B-12 analizada a las 96, 120 y 144 h de fermentación. Las flechas indican el momento de la adición del precursor.

niveles bajos de los factores empleados y a las 96 h de fermentación (figura _39_), ya que al quinto día disminuye su síntesis, aparentemente sin alguna causa en especial a no ser de que se degrade de alguna forma ó que el microorganismo la degrade por alguna causa desconocida ya que este efecto no se observa en el crecimiento.

La mayor producción específica de vitamina B-12 se obtuvo cuando el cobalto fué adicionado a las 24 h de iniciada la fermentación, sin importar la concentración de cobalto presente (10 ó 30 ppm) en el medio de cultivo y a las 96 h de incubación. La adición de cobalto a las 48 y/o 72 h baja la producción específica (figura _40_) y si se continúa la fermentación después de las 96 h, la eficiencia de la fermentación también disminuye.

Al igual que los dos parámetros anteriores, la productividad es mayor cuando se trabaja con los niveles bajos de concentración y tiempo de adición de cobalto así como el suspender la fermentación a las 96 h ya que después de este tiempo, la productividad disminuye (figura _41_) dando como resultado una pérdida de tiempo y un aumento en el costo del proceso.

Como conclusión diremos que todos los parámetros determinados proporcionaron mejores resultados a niveles bajos de concentración y tiempo de adición de cobalto y a las 96 h de fermentación.

La producción y producción específica cuantificadas a los tres últimos días de fermentación (tabla _XVIII_) fueron analizadas estadísticamente (Anexo _3_) de acuerdo al diseño factorial propuesto. Las ecuaciones así obtenidas describen el comportamiento de dichas variables de respuesta en cada uno de los tiempos en que fueron descritos (Tabla _XIX_), ver anexo _3_).

El comportamiento encontrado para la producción de vitamina B-12 fué diferente dependiendo del día en que fué cuantificado. La producción de este metabolito a las 96 h de fermentación dependió de la concentración y tiempo de adición de cobalto. La teoría del ascenso rápido (establece estrategias experimentales para optimizar Box 1978) indicó que se deben disminuir ambos factores para poder incrementar la producción de vitamina B-12. La ecuación obtenida en este caso pronostica una máxima producción de 5.5 mg/l de este metabolito (figura _42_), (ver anexo _3_) al disminuir la concentración de esos factores.

A las 96 h la producción específica solo depende del tiempo de adición del precursor, y éste debe ser disminuido hasta su límite inferior, pronosticando un máximo de 1070 μ g de B-12/g de células (figura _43_), (ver anexo _3_).

A las 120 h de fermentación tanto la producción como la

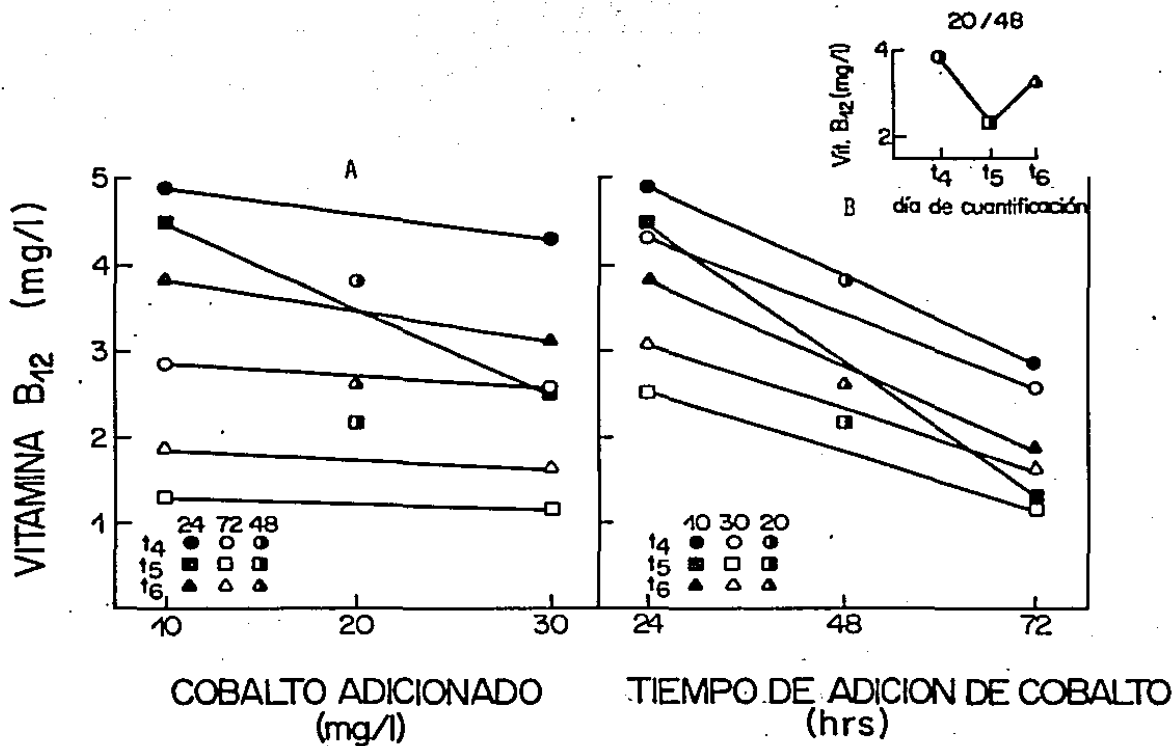


FIGURA 39. Gráfica que Relaciona la Producción de Vitamina B-12 vs A = Cobalto (ppm) adicionado y B = Tiempo (h) de adición de Cobalto y C = Día de cuantificación de vitamina B-12 cuando se adicionó 20 mg/l de cobalto a las 48 h de fermentación. Vitamina B-12 analizada a las 96, 120 y 144 h de fermentación (tiempo 4, 5 y 6 respectivamente).

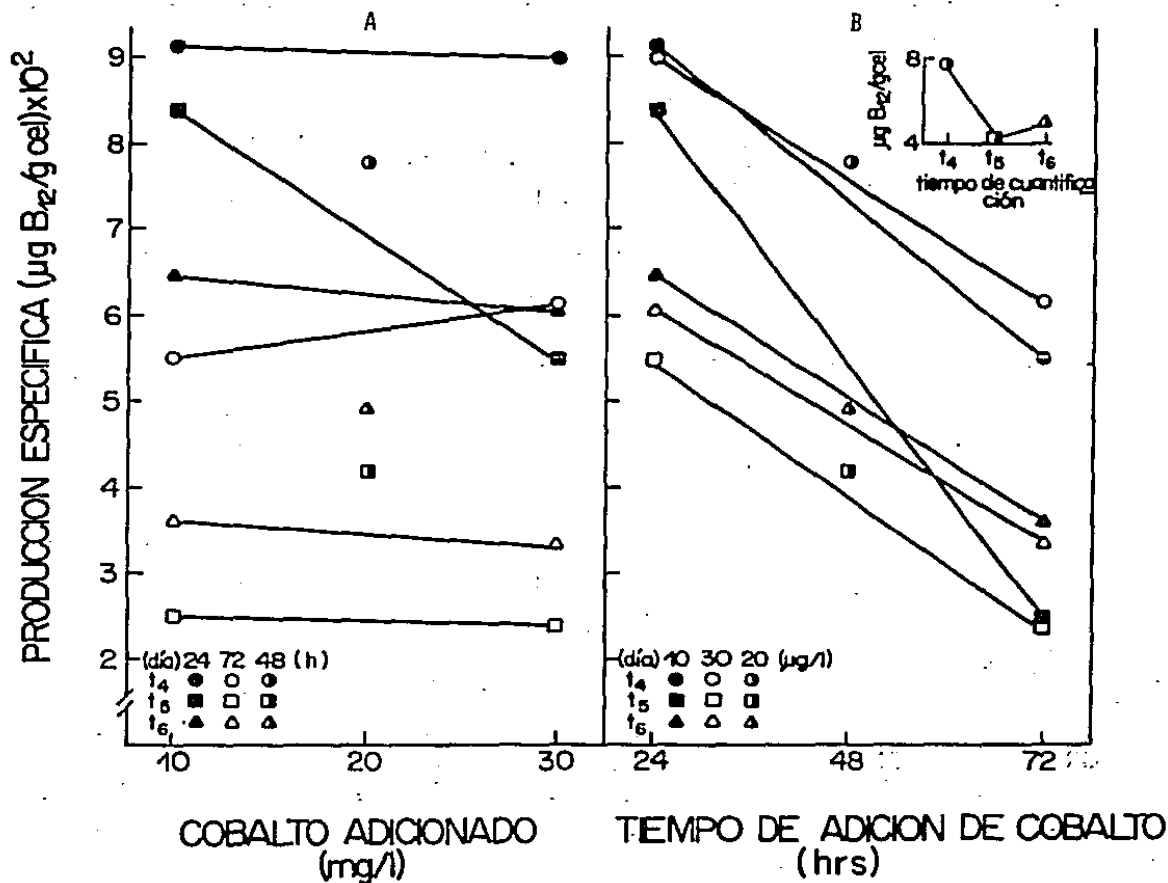


FIGURA 40. Gráfica que Relaciona la Producción Específica de Vitamina B-12 vs A = Cobalto (ppm) adicionado y B = Tiempo (h) de adición de Cobalto y C = Día de cuantificación de vitamina B-12 cuando se adicionó 20 mg/l de cobalto a las 48 h de fermentación. Vitamina B-12 analizada a las 96, 120 y 144 h de fermentación (tiempos 4, 5 y 6 respectivamente).

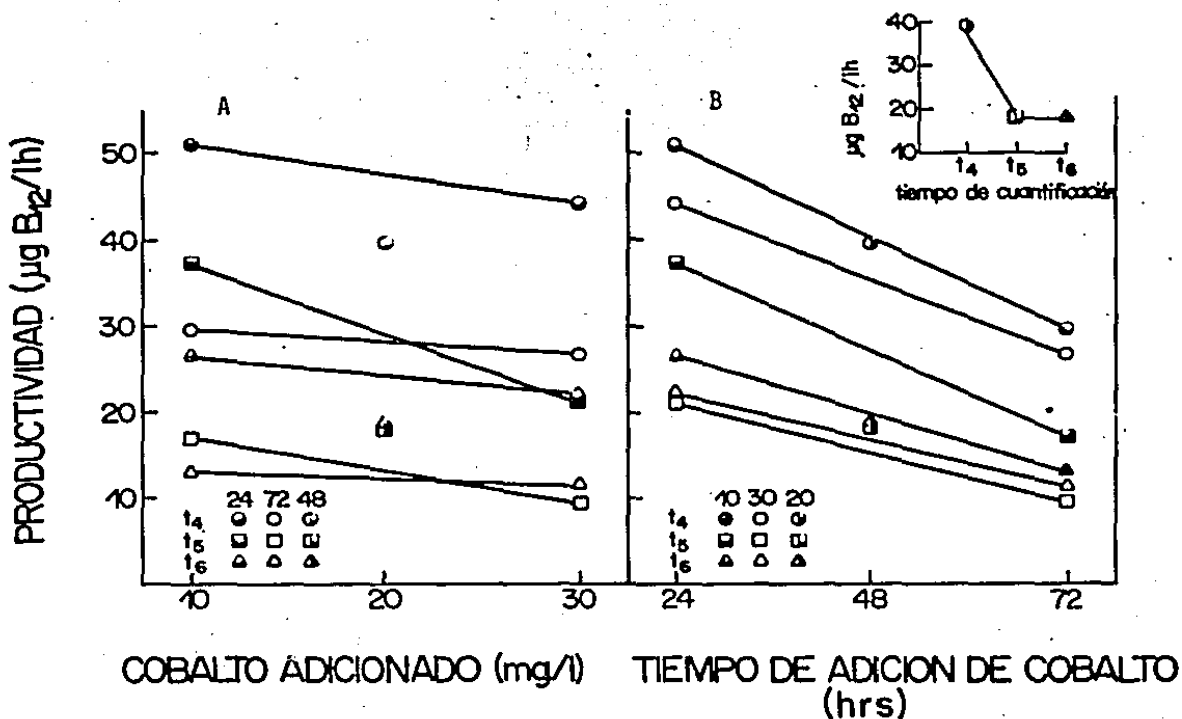


FIGURA 41. Gráfica que Relaciona la Productividad de Vitamina B-12 vs A = Cobalto (ppm) adicionado y B = Tiempo (h) de adición de Cobalto y C = Día de cuantificación de vitamina B-12 cuando fueron adicionados 20 mg/l de cobalto a las 48 h de fermentación. Vitamina B-12 analizada a las 96, 120 y 144 h de fermentación (tiempos 4, 5 y 6 respectivamente).

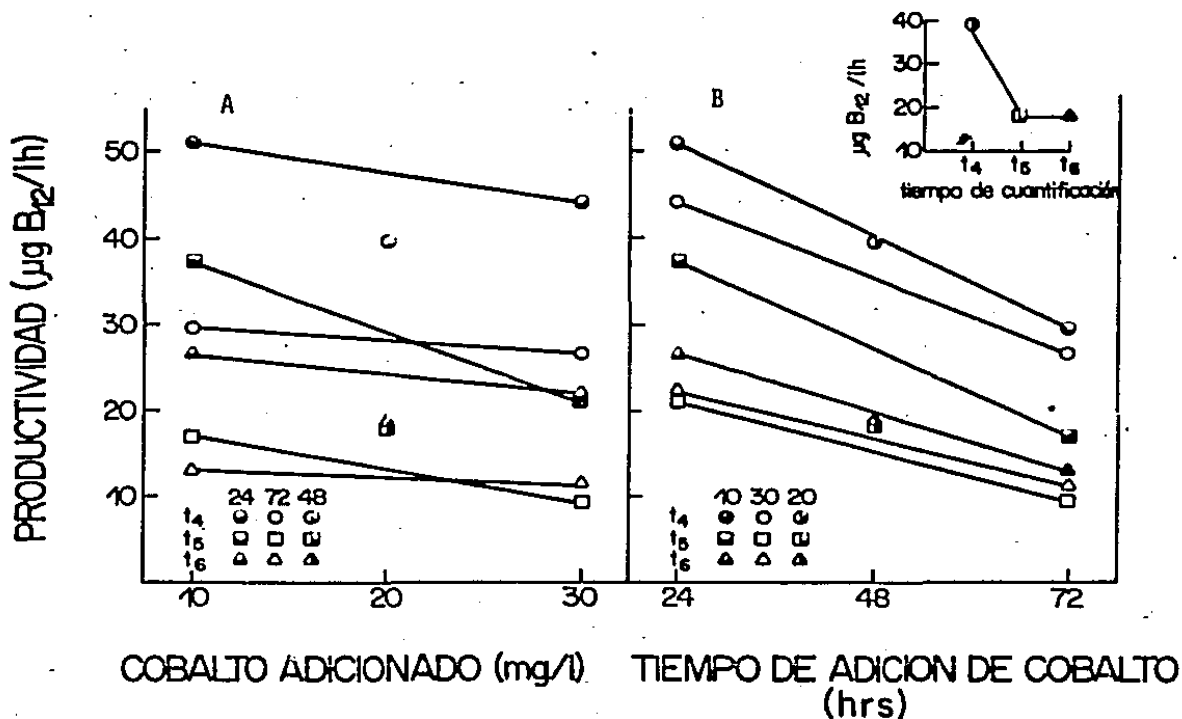


FIGURA 41. Gráfica que Relaciona la Productividad de Vitamina B-12 vs A = Cobalto (ppm) adicionado y B = Tiempo (h) de adición de Cobalto y C = Día de cuantificación de vitamina B-12 cuando fueron adicionados 20 mg/l de cobalto a las 48 h de fermentación. Vitamina B-12 analizada a las 96, 120 y 144 h de fermentación (tiempos 4, 5 y 6 respectivamente).

TABLA XVIII. RESULTADOS OBTENIDOS EN LA FERMENTACION DONDE FUE ADICIONADO EL COBALTO COMO PRECURSOR DE VITAMINA B-12 EMPLEANDO UN DISEÑO FACTORIAL 2^2 CON UN PUNTO CENTRAL.

		PRODUCCION DE VITAMINA B-12 ($\mu\text{g/l}$)			PRODUCCION ESPECIFICA DE VITAMINA B-12 ($\mu\text{g/g cel}$)			
		T I E M P O D E A D I C I O N D E C O B A L T O						
		24	48	72	24	48	72	
C O N C E N T R A C I O N D E C O B A L T O A D I C I O N A D O	10	4988.67		2963.33	949.81		596.31	
		4791.11		2730.00	883.93		510.52	
	20		3738.00				755.82	
			3840.67				791.36	
	30	4498.67		2674.00	888.74		646.45	
		3999.33		2440.67	813.83		586.86	
	10	4295.01		1110.67	789.14		227.73	
		4680.67		1451.33	895.23		278.23	
	20		2310.00				456.35	
			2006.67				392.63	
	30	2345.89		1008.00	483.36		214.82	
		2716.00		1292.67	539.10		268.91	
10	3397.80		2109.33	577.36		410.92		
	4237.89		1582.00	711.14		308.23		
20		2772.00				511.55		
		2416.67				479.40		
30	3495.33		1642.67	667.41		329.07		
	2720.67		1638.00	532.48		325.13		

NOTA: Cada bloque representa los resultados obtenidos a las 96, 120 y 144 h, respectivamente.

TABLA XIX. ECUACIONES ESTIMADAS PARA PRODUCCION Y PRODUCCION ESPECIFICA DE VITAMINA B-12 A LOS TRES ULTIMOS DIAS DE FERMENTACION AL EMPLEAR UN DISEÑO FACTORIAL 2² CON UN PUNTO CENTRAL.

TIEMPO DE CUANTIFICACION (DIAS)	PRODUCCION DE VITAMINA B-12 ($\mu\text{g/l}$)	PRODUCCION ESPECIFICA DE VITAMINA B-12 ($\mu\text{g/g de cel}$)
40.	$\hat{Y} = 3666.31 - 232.64C - 933.81T$ $r^2 = 0.961$	$\hat{Y} = 752.06 - 162.397T$ $r^2 = 0.938$
50.	$\hat{Y} = 2321.96 - 521.89C - 1146.86T$ $+ 456.56CT$ $r^2 = 0.967$	$\hat{Y} = 454.61 - 85.6C - 214.56T + 79.88CT$ $r^2 = 0.971$
60.	$\hat{Y} = 2602.24 - 859.96T$ $r^2 = 0.81$	$\hat{Y} = 486.27 - 140.63T$ $r^2 = 0.85$

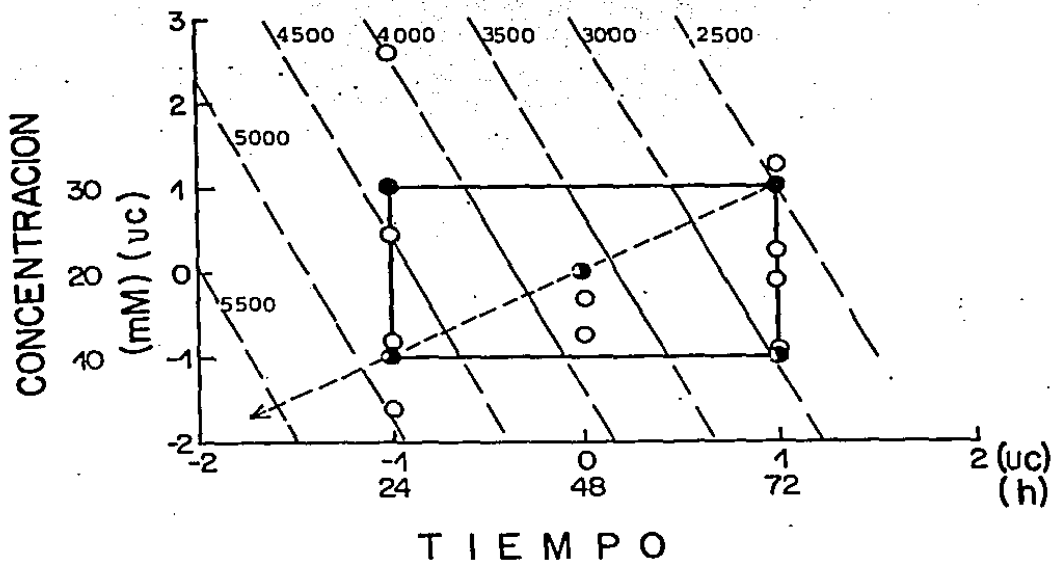


FIGURA 42. Gráfica de contorno, Concentración de Cobalto (mg/l) adicionado vs Tiempo (h) de adición de Cobalto en la Producción de Vitamina B-12 cuantificado a las 96 h de Fermentación. (o) = zona de exploración ó de experimentación; líneas continuas = comportamiento lineal de la vitamina B-12 dentro de la zona de exploración; líneas discontinuas = producción de vitamina B-12 fuera de la zona explorada; (o) = datos experimentales; (UC) = unidades codificadas. La ecuación encontrada que gobierna este comportamiento es:

$$Y = 3666.3114 - 232.63925 C - 933.806 T.$$

Donde Y = producción estimada de vitamina B-12.

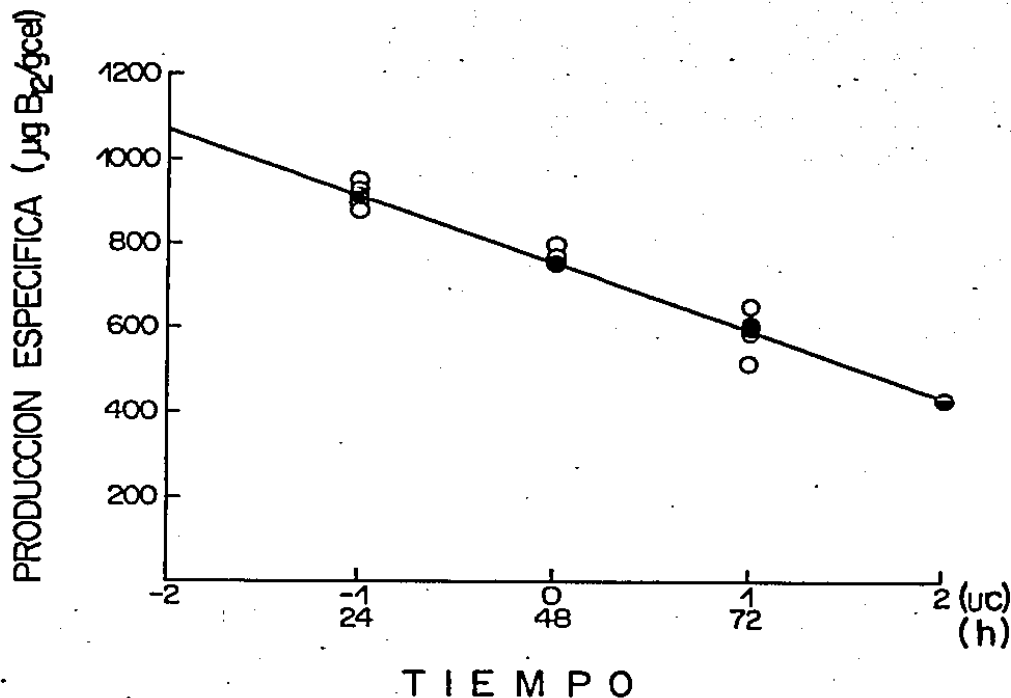


FIGURA 43. Gráfica de contorno que relaciona la Producción Específica de Vitamina B-12 vs Tiempo (h) de Adición de Cobalto a las 96 h de Fermentación. Producción independiente de la concentración de cobalto adicionado. (o) = Producción estimada en base a la ecuación:

$$\hat{Y} = 752.06183 - 162.39764 T. \text{ Donde } \hat{Y} = \text{producción específica de vitamina B-12 estimada.}$$

producción específica dependen de la concentración, tiempo de adición y de la interacción de ambos factores, por lo tanto la predicción de dichas variables de respuestas presentan un comportamiento parabólico señalando que si se desea incrementar ambos parámetros, también se deben disminuir la concentración y tiempo de adición del cobalto para obtener cantidades máximas de 7 mg de B-12/1 y aproximadamente 1200 μ g de B-12/g de célula (figuras _44_ y _45_), (ver anexo _3_).

La fermentación a las 144 h mostró que la producción y producción específica dependieron solo del tiempo de adición del precursor empleado. Teóricamente disminuir a su máximo este factor daría como resultado una producción y producción específica máximas de 4.3 mg de B-12/1 y 760 μ g de B-12/g de célula, respectivamente (Figura _46_ y _47_), (ver anexo _3_).

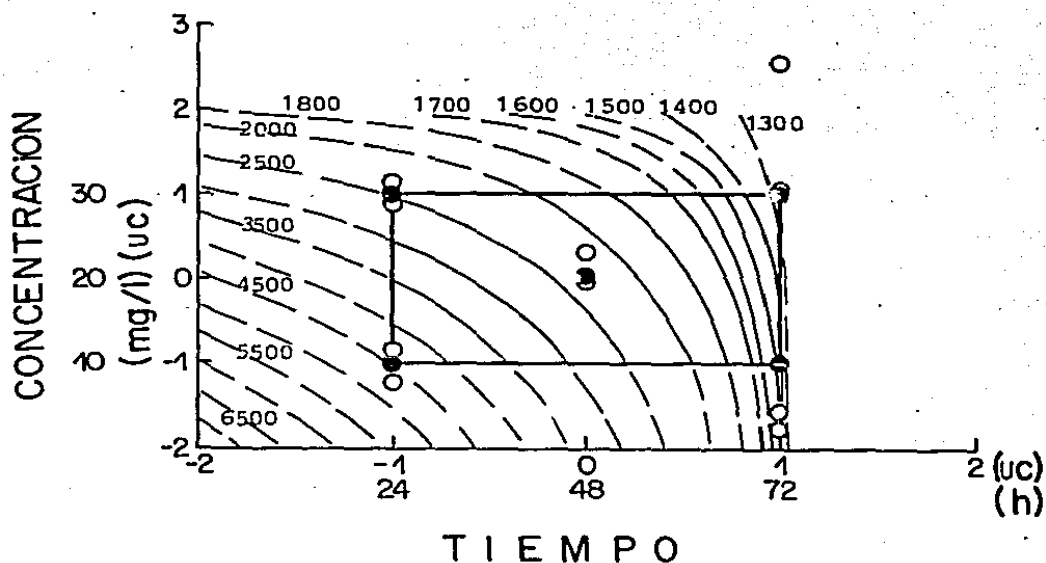


FIGURA 44. Gráfica de contorno, Concentración de Cobalto (mg/l) adicionado vs Tiempo (h) de adición de Cobalto en la Producción de Vitamina B-12 a las 120 h de Fermentación. (o) = zona de exploración ó de experimentación; líneas continuas = comportamiento parabólico de la producción de la vitamina B-12 dentro y fuera de la zona de exploración; (□) = datos experimentales; (UC) = unidades codificadas. La ecuación que gobierna a este comportamiento es:

$$Y = 2321.6904 - 521.890375 C - 1146.86287 T + 456.557125 CT.$$

Donde Y = producción estimada de vitamina B-12.

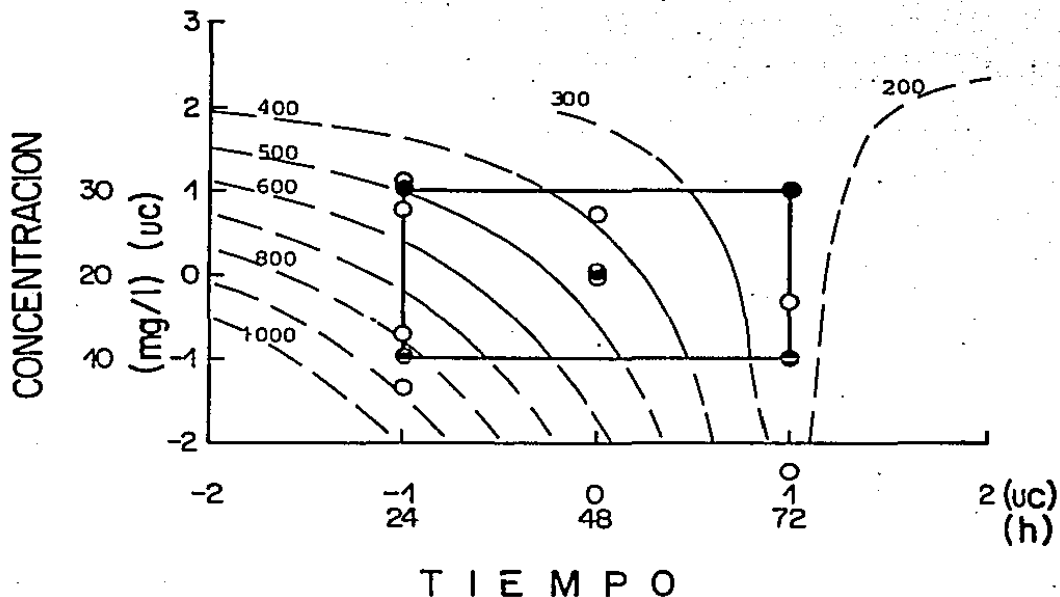


FIGURA 45. Gráfica de contorno, Concentración de Cobalto (mg/l) adicionado vs Tiempo (h) de adición de Cobalto en la Producción Específica de Vitamina B-12 a las 120 h de Fermentación. (o) = zona de exploración ó de experimentación; líneas continuas = comportamiento parabólico de la vitamina B-12 dentro y fuera de la zona de exploración; (o) = datos experimentales; (UC) = unidades codificadas. La ecuación que gobierna a este comportamiento es:

$$\hat{Y} = 454.6127 - 85.5951 C - 214.5637 T + 79.8817 CT.$$

Donde \hat{Y} = producción específica estimada de vitamina B-12.

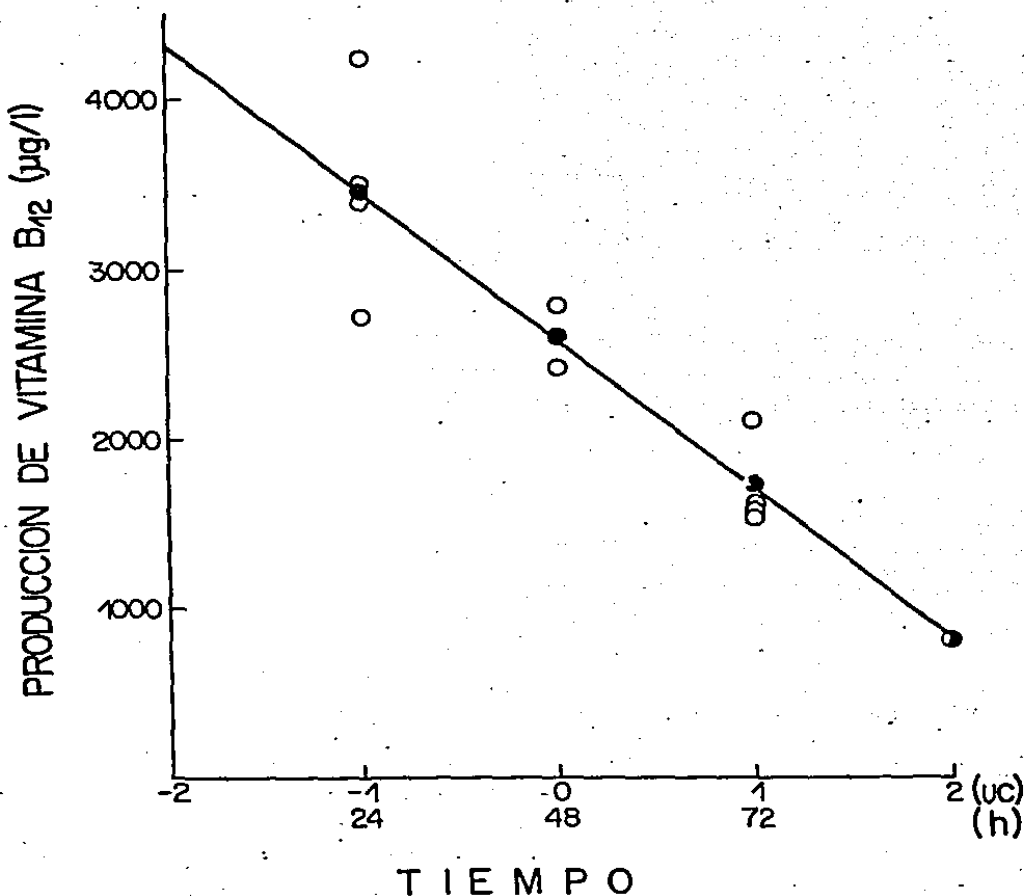


FIGURA 46. Gráfica de contorno que relaciona la Producción de Vitamina B-12 vs Tiempo (h) de adición de Cobalto a las 144 h de Fermentación. Producción independiente de la concentración de cobalto adicionado. (o) = datos experimentales; (o) = producción estimada en base a la ecuación:
 $\hat{Y} = 2602.236 - 859.9617 T$. Donde \hat{Y} = producción estimada de vitamina B-12.

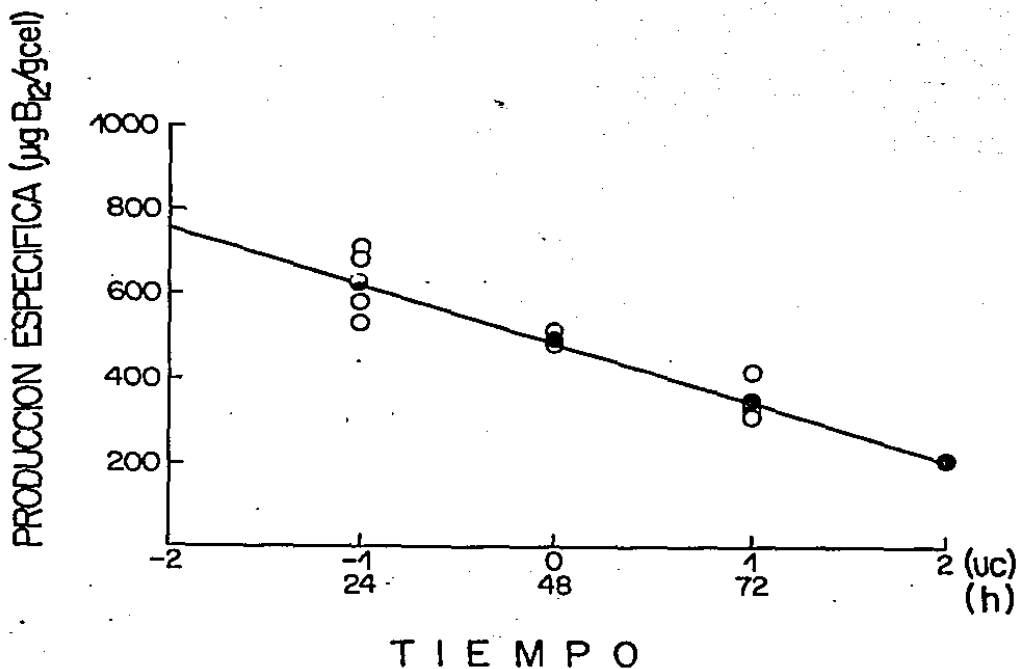


FIGURA 47. Gráfica de contorno que relaciona la Producción Específica de Vitamina B-12 vs Tiempo (h) de adición de Cobalto a las 144 h de Fermentación. Producción independiente de la concentración de cobalto adicionado. (o) = datos experimentales; (o) = producción estimada en base a la ecuación: $\hat{Y} = 486.2673 - 140.6318 T$. Donde \hat{Y} = producción específica estimada de vitamina B-12.

Viii. FERMENTACIONES A BASE DE CITRATO DE SODIO COMO FUENTE DE CARBONO.

En virtud de que el consumo de citrico contenido en el medio de fermentación a base de "jugo cocido de limón" (JCL) no fué muy claro, se planearon experimentos empleando medios de fermentación a base de citrato de sodio con el fin de corroborar el comportamiento real de *P. Shermanii* ATCC 13673 frente al consumo de esta fuente de carbono.

La preparación del inóculo no fué posible obtenerlo de un medio de cultivo constituido por citrato de sodio ya que el microorganismo no pudo crecer en él. Por lo tanto, éstos experimentos tuvieron que partir de inóculos crecidos en un medio a base de jugo cocido de limón, bajo las mismas condiciones utilizadas en los anteriores experimentos.

Los medios de fermentación que a continuación se enlistan, fueron inoculados a una densidad óptica (D.O.) de 1.0.

Medios de Fermentación:

Constituyentes del medio (Cantidades por litro)	Medio			
	A	B	C	
Glucosa	8.0 g	-	+	-
Citrato de sodio . . .	32.25 g	-	+	+
Nitrógeno (ACM) . . .	3.15 g	+	+	+
Cloruro de cobalto . .	5.0 ppm	+	+	+

NOTA: Las cantidades de glucosa y de citrato son equivalentes a las cantidades de azúcares reductores disponibles y de citrico, respectivamente en el medio de JCL (Santana 1983).

Los resultados a los que se llegaron (figura 48) muestra un crecimiento muy similar en los medios de fermentación empleados, con una producción máxima de biomasa de 3.15 a 3.25 g/l entre las 80 y 100 h de fermentación para los medios A y B, y de 2.5 a 2.9 g/l entre las 72 y 100 h de la misma en el medio C. En éste último medio, el crecimiento presentado fué ligeramente menor al observado en las otras dos fermentaciones. Sin embargo entre los medios B y C, las velocidades específicas de crecimiento a las 8 primeras horas de iniciada la fermentación es prácticamente la misma y menores al presentado en el medio A, mostrando que después de ese tiempo, las velocidades específicas de crecimiento son prácticamente iguales en los tres medios utilizados, disminuyendo posteriormente poco a poco conforme avanzaba la

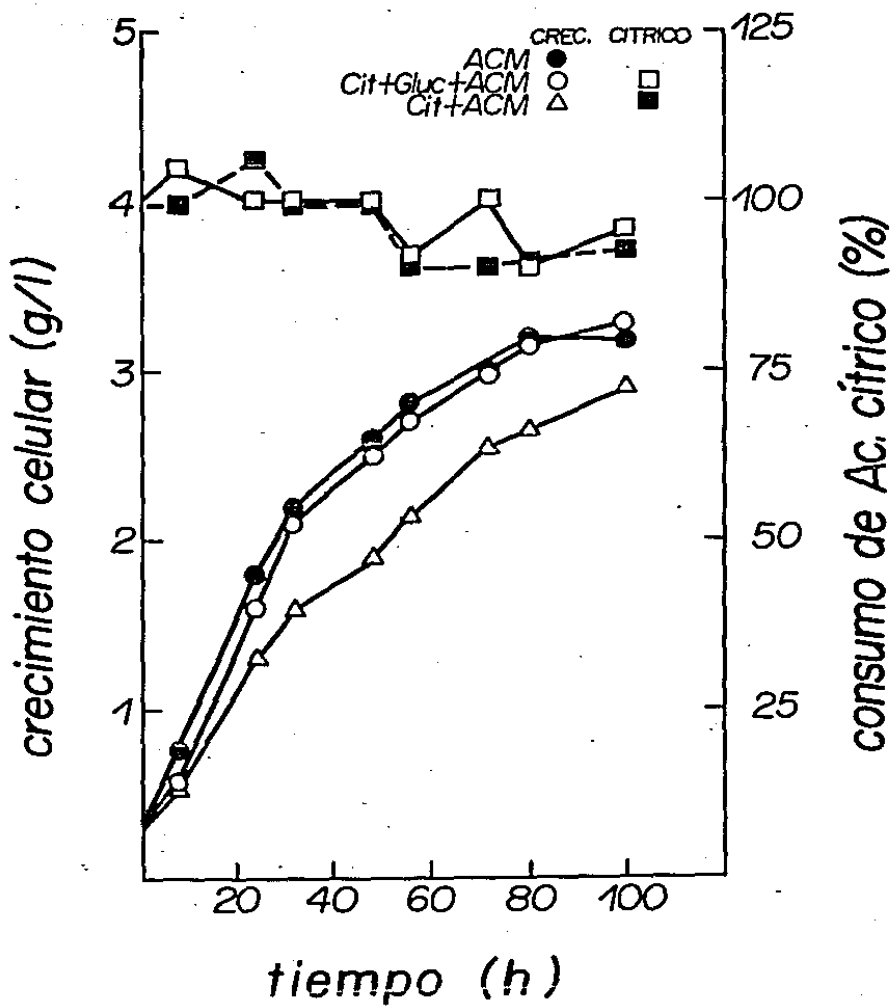


FIGURA 48. Curva, Concentración vs Tiempo en Fermentaciones de 130 ml de Medio/Matriz de 250 ml en Medios de Cultivo a base de Citrato de Sodio como Fuente de Carbono con *P. shermanii* ATCC 13673. (●) = crecimiento en el medio A, (○) = crecimiento en el medio B y (△) = crecimiento en el medio C. (□) = consumo de cítrico en el medio B y (■) = consumo de cítrico en el medio C.

fermentación (figura 49).

Aparentemente el factor importante, en el crecimiento de *P. shermanii* es el ACM, ó mejor dicho, algún(os) constituyente(s) del mismo; ya que el crecimiento durante toda la fermentación, en los tres medios presentó el mismo comportamiento como si solamente estuviera alimentado básicamente por éste constituyente del medio.

A pesar de que aparentemente el crecimiento es el mismo, el microorganismo en el medio A presenta a las primeras 8 h de iniciada la fermentación una velocidad específica mayor (0.1123 h^{-1}) a las encontradas en los otros dos medios (0.0766 y 0.0662 h^{-1} , respectivamente). Esta diferencia posiblemente se deba a que el cítrico presente en éstos dos últimos medios ejerza algún efecto negativo sobre la utilización del ácido láctico proporcionado por el ACM; ya que es la primera fuente de carbono que utiliza el microorganismo.

Se ha comprobado, en experimentos separados (realizados por otras personas del mismo laboratorio) que esas altas velocidades específicas de crecimiento (~ 0.11 a 0.15 h^{-1}) se obtienen también cuando *P. shermanii* crece en un medio a base de lactato de sodio y extracto de levadura.

Después de las 8 h de fermentación, en el medio C el crecimiento del microorganismo es menor en comparación al crecimiento que presenta en el medio B, seguramente porque en este último el efecto inhibitorio del cítrico sobre el ACM es amortiguado por la presencia de glucosa en el medio de cultivo, independientemente de la aportación que haga esta última para el crecimiento de *P. shermanii*. Porque si no fuera así, el microorganismo en el medio C presentaría una curva de crecimiento con producción de biomasa similares a los otros dos medios de cultivo.

El comportamiento oscilante del ácido cítrico apoya más a la suposición de que *P. shermanii* solo está creciendo con ayuda del ACM, ya que éste no presenta un consumo gradual sino también una cierta producción del mismo ácido. Dicho comportamiento es muy semejante al encontrado en fermentaciones a base de JCL bajo las mismas condiciones de fermentación. Esto puede deberse a que la cantidad producida de ácido cítrico se oxide a alfa-cetoglutarato tal y como se encontró en extractos libres de células de *P. pentosaceum* (Delwiche 1953); y no necesariamente porque el microorganismo lo esté consumiendo.

Tanto la producción de biomasa como las velocidades específicas de crecimiento encontradas en estos experimentos son muy semejantes a las obtenidas en fermentaciones a base de JCL.

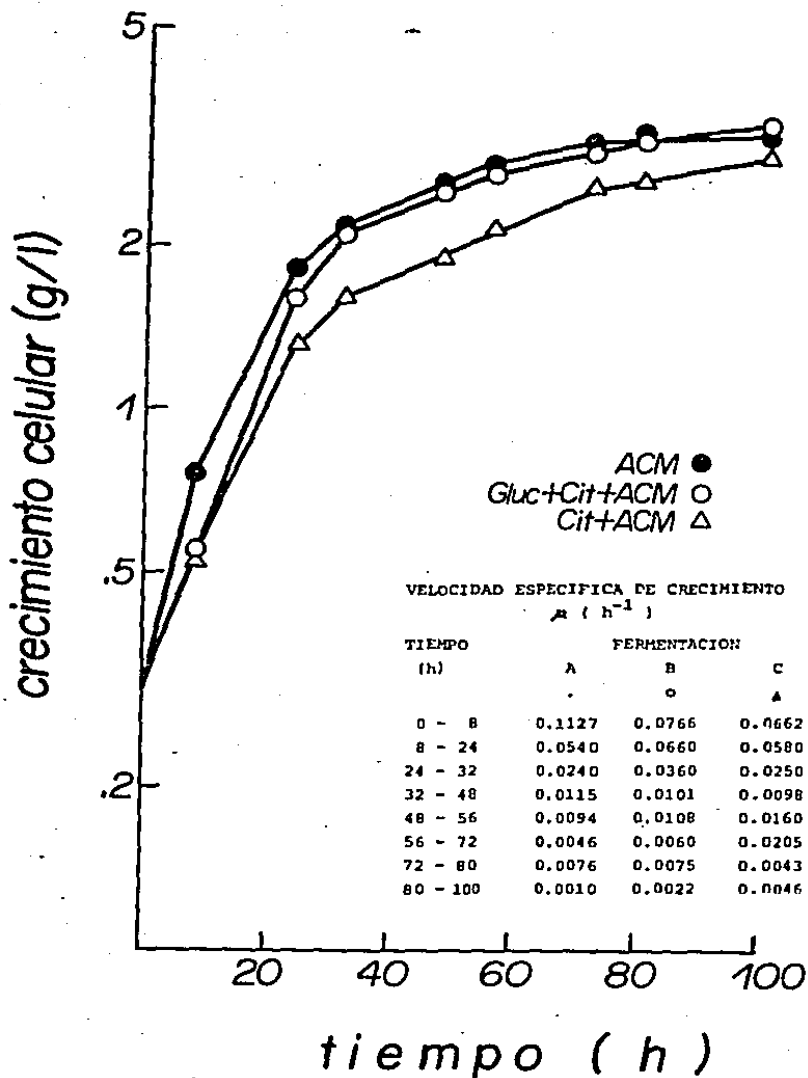


FIGURA 49. Velocidades Especificas de Crecimiento de *E. shermanii* ATCC 13673 en la Fermentación de 130 ml de Medio/Matraz de 250 ml en Medios de Cultivo a base de Citrato de Sodio como Fuente de Carbono.

Viv. PRODUCCION DE VITAMINA B-12 EN UN MEDIO A BASE DE GLUCOSA.

En virtud de no poder incrementar más de 3.8 y 7.0 mg/l la producción de vitamina B-12 al adicionar glicina y cobalto, (en experimentos por separado) a un medio a base de jugo cocido de limón y de haber comprobado que el ácido cítrico presente en dicho medio de fermentación no es utilizado por Propionibacterium shermanii ATCC 13673, se planearon una serie de experimentos, con el fin de encontrar los precursores y/o sustancias que incrementen la producción de vitamina B-12, empleando al mismo microorganismo en un medio a base de glucosa como fuente de carbono y bajo las mismas condiciones de fermentación hasta ahora utilizadas.

Esta serie de experimentos se realizarón a base de glucosa ya que es la fuente de carbono convencionalmente empleada a nivel industrial para la producción de ésta vitamina. Además, actualmente se tiene un proyecto a nivel laboratorio con fines de escalamiento para la producción de vitamina B-12, empleando un medio de fermentación a base de glucosa como fuente de carbono. Dicho proyecto es un desarrollo tecnológico entre la UNAM y un grupo de Industriales interesados.

Los experimentos en esta sección fueron realizados con un mismo lote de agua de cocimiento de maíz. El motivo por el cual se procedió a hacer esta consideración fué: primero por tratarse de una materia prima muy compleja que ha dado bastantes problemas en cuanto a reproducibilidad en la producción de vitamina B-12 en experimentos realizados por otras personas del mismo proyecto y segundo, por tratarse de estudios de optimización donde se requiere controlar dicha fuente de variación, ya que estos estudios así lo requieren.

Todo cambio que se pretenda hacer en un medio de fermentación, debe ser comparado con un experimento el cual se ha mantenido como base de comparación y al cual se desee mejorar para que proporcione resultados aún más satisfactorios. Por tal razón, todos los resultados aquí presentados se compararán contra un medio base.

Viva. FERMENTACION CONTROL

Es importante señalar que en todas las fermentaciones a base de glucosa como fuente de carbono, el pH fué ajustado alrededor de 7.0 aproximadamente cada 12 horas, ya que este parámetro es importante para obtener un crecimiento adecuado

del microorganismo. Se ha reportado en la bibliografía (Akira Nanba et al. 1983) que el crecimiento de *Eropiugibacterium shermanii* es inhibido por sus productos principales, ácido acético y ácido propiónico principalmente en sus formas no ionizadas, por lo que es recomendable ajustar el pH.

La fermentación fué llevada a cabo a una sola etapa de aeración, empleando 130 ml y 150 ml de volumen de trabajo/matraz de 250 ml. El crecimiento fué cuantificado durante toda la fermentación y la producción de vitamina B-12 en los 3 últimos días de la misma. Los resultados se muestran en la figura 50; el crecimiento de *E. shermanii* a los dos niveles de aeración se comportan de igual forma, produciéndose ligeramente mayor biomasa (6.6 a 6.9 g/l) en la fermentación de mayor aeración (130/250) en comparación a la biomasa producida (6.0 a 6.6 g/l) en la fermentación de menor aeración (150/250); comportamiento lógico ya que al tener mayor oxígeno disuelto en el medio, el microorganismo utiliza más eficientemente los sustratos para producir sus constituyentes celulares. Las velocidades específicas de crecimiento (μ -1), son muy semejantes para los dos niveles de aeración, alcanzando su máxima velocidad en las primeras horas de fermentación y disminuyendo hasta las 48 h cuando entran a la fase estacionaria (figura 51).

La diferencia entre la producción, producción específica y productividad obtenidas en ambas condiciones de aeración, son pequeñas por lo que se pueden considerar que ocasionan el mismo efecto sobre estos parámetros (tabla XX). Así mismo se puede observar que el pH se ajustó cada 12 h para que la acidez del medio no modificara sustancialmente el crecimiento del microorganismo.

Vivb. DISEÑO EXPERIMENTAL PLACKETT- BURMAN

Este tipo de diseño reduce el tiempo de experimentación y aporta información para efectuar predicciones del comportamiento del sistema. Este método consiste en realizar una serie de tratamientos que tiene como base una matriz diseñada mediante análisis combinatorio y algebraico de una serie de números. Estos tratamientos se selecciona en base al número de variables que se van a evaluar; en este caso se trata de una matriz de 7 variables (tabla XXI).

Para esta primera fase de la optimización, dicho diseño permite evaluar el efecto que tienen los factores sobre las variables de respuesta: crecimiento, producción y producción específica de vitamina B-12; para seleccionar aquel o aquellos factores que presentan efecto significativo.

Los parámetros y niveles seleccionados (tabla XXI) se hicieron en base a la bibliografía y/o a resultados obtenidos con anterioridad.

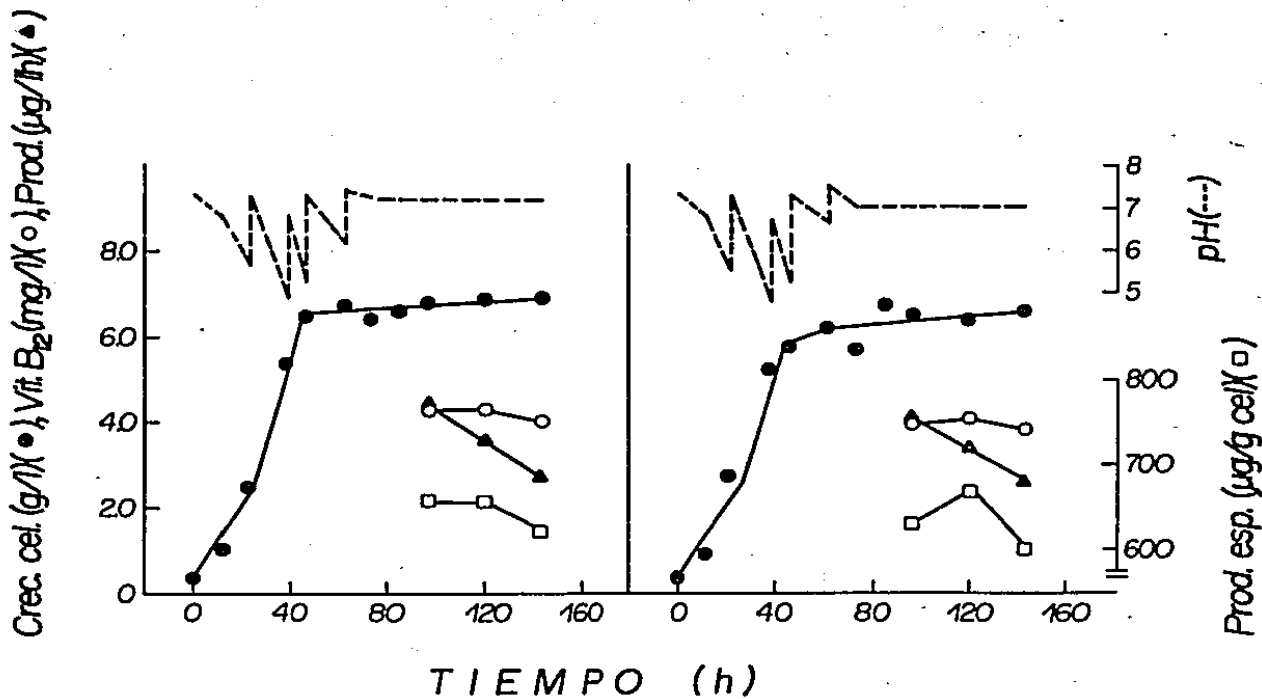


FIGURA 50. Gráfica que Muestra la Fermentación de 130 ml de Medio/Matriz de 250 ml (A) y la Fermentación de 150 ml de Medio/Matriz de 250 ml (B) en un Medio a base de Glucosa con *P. shermanii* ATCC 13673.

FERMENTACION CONTROL		
TIEMPO (h)	μ (h^{-1})	
	CONDICION 130/250	CONDICION 150/250
0-12	0.094	0.093
12-22	0.093	0.102
22-38	0.047	0.041
38-46	0.023	0.012
46-62	0.003	0.005
62-143	0.0002	0.0008

FERMENTACION PLACKETT-BURMAN		
TIEMPO (h)	μ (h^{-1})	
	CONDICION 130/250	CONDICION 150/250
0-16	0.107	0.104
16-28	0.043	0.043
28-40	0.042	0.041
40-65	0.015	0.014
65-145	-0.0003	-0.00024

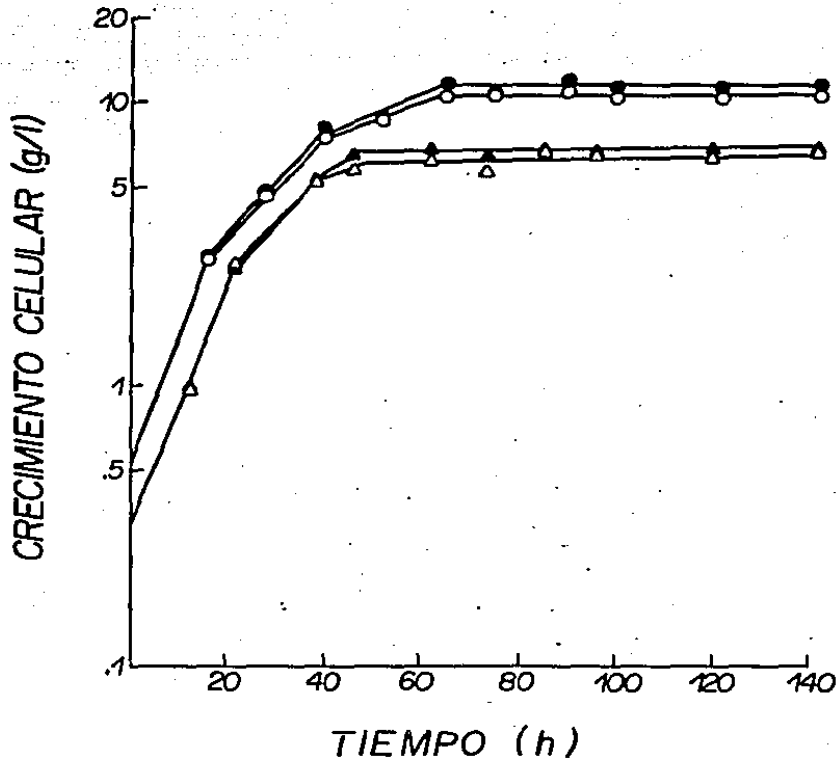


FIGURA 51. Velocidades Especificas de Crecimiento Promedio (h^{-1}) de *P. shermanii* ASTCC 13673 en Fermentaciones del Diseño Experimental Plackett-Burman (O,O) y Experimento Control (). O, Fermentaciones en 130 ml de Medio/Matriz de 250 ml y O Fermentaciones en 150 ml de Medio/Matriz de 250 ml.

TABLA xx. RESULTADOS EN EL EXPERIMENTO CONTROL EMPLEANDO GLUCOSA COMO FUENTE DE CARBONO.

TIEMPO (h)	CRECIMIENTO (g/l)		PRODUCCION ($\mu\text{gB}_{12}/\text{l}$)		PRODUCCION ESPECIFICA ($\mu\text{gB}_{12}/\text{g}_{\text{cel}}$)		PRODUCTIVIDAD ($\mu\text{gB}_{12}/\text{lh}$)	
	130	150	130	150	130	150	130	150
96	6.80	6.55	4267.67	3917.67	659.60	629.88	44.46	40.81
120	6.88	6.42	4313.33	4062.33	658.66	667.00	35.94	33.85
143	6.89	6.64	3950.00	3775.33	601.82	598.18	27.62	26.40

*Volumen de medio contenidos en matraces de 250 ml.

TABLA XXI. MATRIZ DE TRATAMIENTOS EN EL DISEÑO EXPERIMENTAL PLACKETT - BURMAN.

TRATAMIENTO	VARIABLES						
	A	B	C	D	E	F	G
1	8 +	8 +	+	-	+	-	130 -
2	8 +	8 +	-	+	-	-	150 +
3	8 +	4 -	+	-	-	+	150 +
4	4 -	8 +	-	-	+	+	150 +
5	8 +	4 -	-	+	+	+	130 -
6	4 -	4 -	+	+	+	-	150 +
7	4 -	8 +	+	+	-	+	130 -
8	4 -	4 -	-	-	-	-	130 -

+ = Nivel alto.

- = Nivel bajo.

VARIABLES:

A = Concentración de glicina (4 (-) y 8 (+) mM) adicionado al tiempo cero de la fermentación.

B = Concentración de cobalto (4 (-) y 8 (+) ppm) adicionado al tiempo cero de la fermentación.

C = Concentración de 1,4-Diethyl,2,4,6-trimethylpiridine-3,5-dicarboxylate (DDC), presente (+) y ausente (-) adicionado al cuarto día de iniciada la fermentación.

D = Dummy (temperatura constante, 29 °C).

E = Propanol-cianurado (1 mM de KCN), presente (+) y ausente (-) adicionado al cuarto día de iniciada la fermentación.

F = Tween-80 a una concentración de 0.5 g/l, presente (+) y ausente (-) adicionado al cuarto día de iniciada la fermentación.

G = Volumen de medio de trabajo (130 Y 150 ML) contenidos en matraz de 250 ml.

Los precursores para tratar de incrementar la producción de vitamina B-12 empleados en esta parte del trabajo experimental fueron: la glicina, el cobalto y el 1,4-Diethyl-2,4,6-trimethylpyridine-3,5-dicarboxilate (DDC). Para los dos primeros ya se mencionaron algunas de sus características.

Debido a que las fermentaciones se llevaron a cabo en una sola fase de aeración (fase aeróbica), 130 ó 150 ml/matraz de 250 ml (ml de medio de fermentación/matraz de 250 ml), se decidió emplear al precursor "DDC", sustancia que se ha encontrado que induce la formación de succinil-CoA sintetasa incrementando la formación de la d-Aminolevulinato (Labbe 1965). Este efecto fué probado en ratones de 30 g de peso a los que se administró 10 mg de la sustancia, encontrando un incremento del precursor d-Aminolevulinato en el hígado. Además esta sustancia inhibe la quelación in vivo del fierro por la protoporfirina (Ganick 1963), metal que puede desviar la síntesis de la vitamina B-12 a la producción de otras porfirinas al impedir la formación del cobaltocorrinoide.

La cantidad adicionada de DDC en cada medio fué de 5 mg/l, considerando que la masa celular al tiempo de añadirlo era equivalente a la cantidad empleada en los ratones (Labbe et al. 1965). El tiempo en que se adicionó este precursor fué a las 96 h de iniciada la fermentación, ya que al ser un activador de la síntesis del ácido d-Aminolevulinico como el allylisopropylacetamida (Labbe 1965, Harvey 1966), posiblemente este sea también inhibido por carbohidratos (Harvey 1966, Tschudy 1964). A ese tiempo de fermentación los azúcares presentes ya han sido consumidos por completo en el medio de fermentación (Santana 1983).

Se emplearon los surfactantes, propanol-cianurado y tween 60 con el fin de permeabilizar la membrana, para que de esta forma permita la excreción de la vitamina B-12 al caldo de fermentación; evitando que al momento de llegar a ser incrementada no inhiba su propia síntesis y permita aumentar más su producción.

La adición de los surfactantes fué realizada a las 96 h de iniciada la fermentación, debido a que en este tiempo ya hay considerable cantidad de vitamina B-12 así como un crecimiento adecuado del microorganismo.

El propanol se adicionó combinado con cianuro (KCN 1 mM), cantidad que según reportes, en *E. shermanii* no causa inhibición en el transporte de electrones de la cadena respiratoria (Pritchard 1980). Además se ha reportado que el cianuro adicionado en forma iónica ó como un complejo (ferricianuro) incrementa la producción de vitamina B-12 en *Streptomices*.

La finalidad de adicionar el cianuro junto con el propanol, es formar la cianocobalamina a partir de la coenzima B-12; forma estable fuera de la célula.

El tween 80 se adicionó a una concentración de 0.5 g/l cantidad promedio para favorecer el crecimiento de P. shermanii (Akira Nanba 1983) (0.1 g/l de tween 80) y el utilizado para incrementar la producción de vitamina B-12 (Yongsmith, 1983) (1.0 g/l de tween 80).

En estos medios de fermentación el crecimiento del microorganismo se determinó durante el curso de la fermentación, ajustando el pH aproximadamente cada 12 h y cuantificando la vitamina B-12 en los últimos 3 días de la fermentación (figuras_52A_ y _52B_).

El crecimiento del microorganismo es el mismo en los 8 fermentaciones realizadas, con la única diferencia de que la producción de biomasa estuvo en el orden de 10 a 11 g/l para las fermentaciones con 150 ml de volumen de trabajo y de 11 a 12 g/l en 130 ml de volumen de trabajo. Las velocidades específicas de crecimiento (μ -1) fueron muy similares en los 8 diferentes tratamientos, presentando su máxima velocidad específica en las primeras 12 h y disminuyendo paulatinamente hasta las 62 h para después entrar a la fase estacionaria. La acidificación del medio se presentó durante las primeras 90 h en todos los medios ajustados a un pH alrededor de 7.0.

El comportamiento en términos generales es el mismo, lo cual hace pensar que los sustratos fueron aparentemente empleados de igual forma sin importar los factores adicionados en cada uno de los medios.

La producción de vitamina B-12 presenta comportamientos diferentes: permanece constante (tratamientos E1 y E2) su producción es de alrededor de 6.5 a 6.8 mg/l, muestra cierto incremento de las 96 a las 144 h en los tratamientos E2, E3, E7 y E8 en el orden de 7.5 a 8.5, 7.0 a 8.0, 7.0 a 8.2 y de 6.7 a 8.3 mg/l, respectivamente; y el de aumentar manteniendo constante su producción 5.5 a 7.0 mg/l, figuras_52A_ y _52B_) hasta el fin de la fermentación.

Al comparar la producción, producción específica y productividad; se observa que las dos primeras se comportan de manera semejante mientras que la tercera siempre tiende a disminuir. Al comparar la producción con la producción específica de vitamina B-12 se corrobora una vez más que la producción va a la par con el crecimiento del microorganismo, quizá hasta cierto punto bajo las condiciones hasta ahora utilizadas (figuras_53A_ y _53B_). Este comportamiento ya ha sido reportado (Periman 1978) y se tomará en cuenta hasta que otros experimentos indiquen lo contrario. En cuanto a la productividad es lógico que muestre esta disminución, ya que la producción no muestra incrementos tan grandes en los tres últimos días de la fermentación que ayuden a que este parámetro se mantenga constante ya que la productividad, como se sabe se obtiene al dividir la producción alcanzada entre las horas en que ha transcurrido la fermentación.

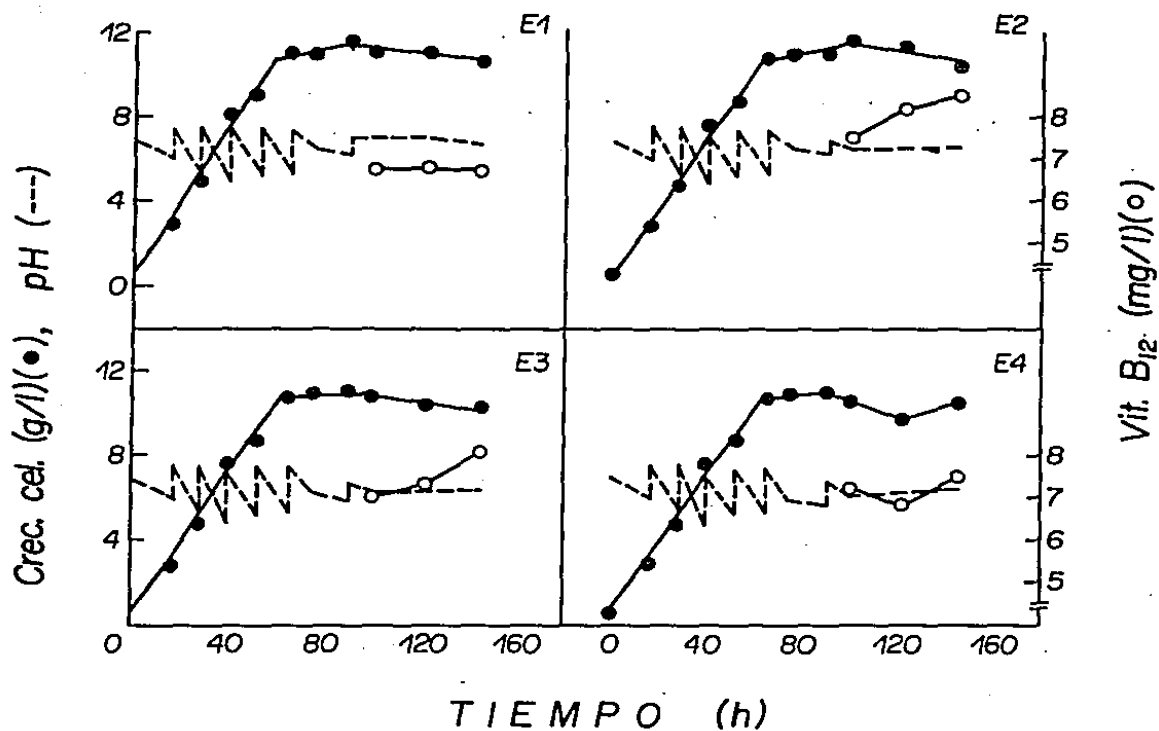


FIGURA 52A. Grafica que Muestra los Experimentos E1 al E4 del Diseño Experimental Plackett-Burman en Fermentaciones a base de Glucosa con *E. shermanii* ATCC 13673.

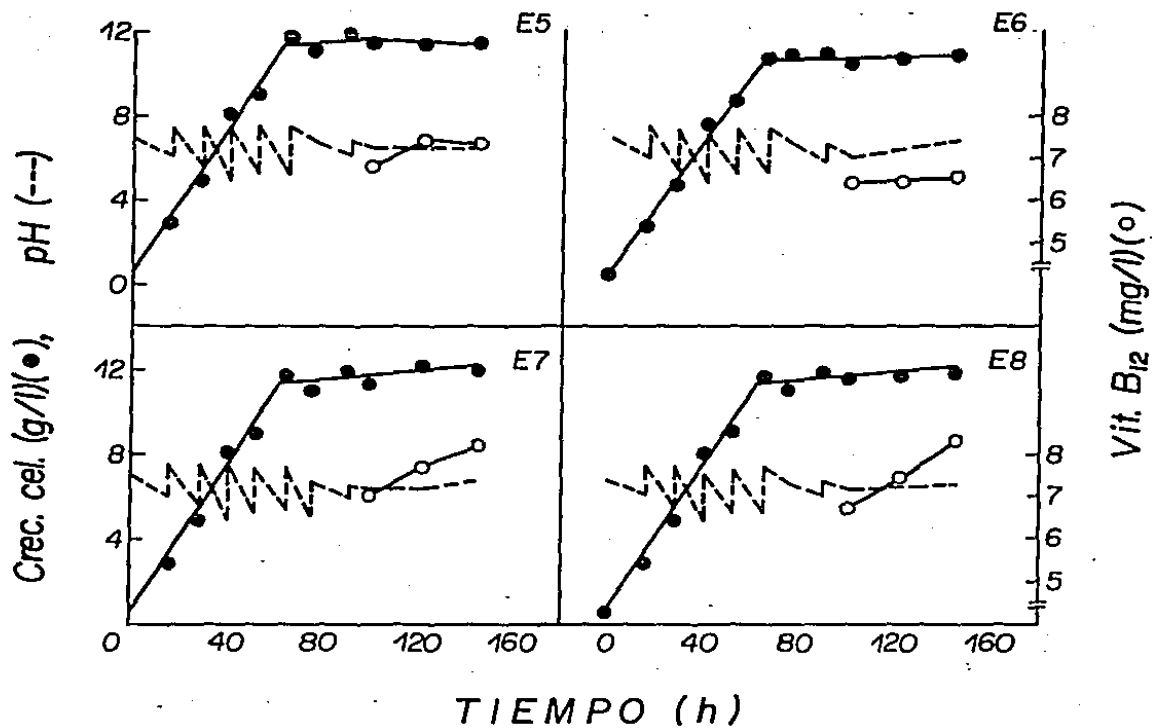


FIGURA 52B. Gráfica que Muestra los Experimentos E5 al E8 del Diseño Experimental Plackett-Burman en Fermentaciones a base de Glucosa con *E. shermanii* ATCC 13673.

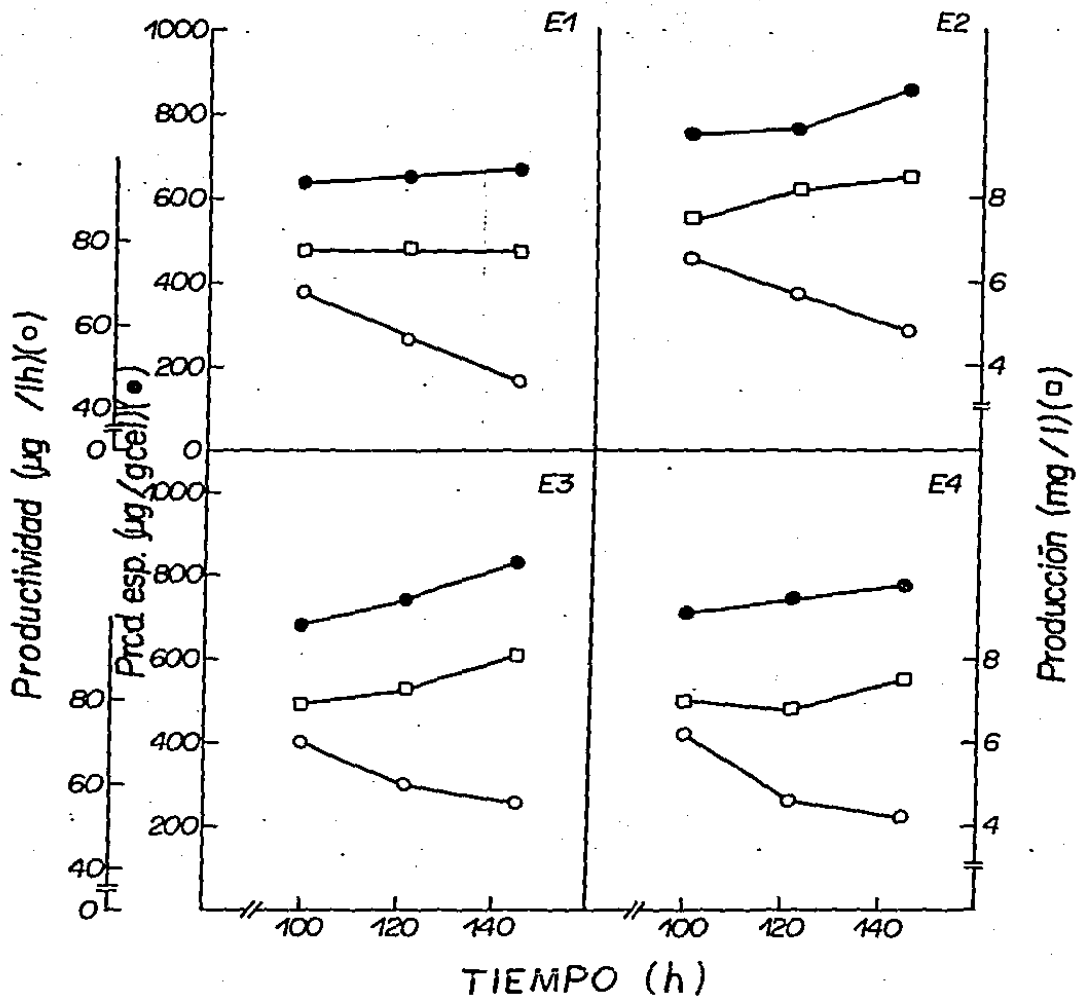


FIGURA 53A. Gráfica que Muestra la Producción, Producción Específica y Productividad de Vitamina B-12 al 40., 50. y 60. día de las Fermentaciones a base de Glucosa con *P. shermanii* ATCC 13673 en los Experimentos E1 al E4 del Diseño Experimental Plackett-Burman.

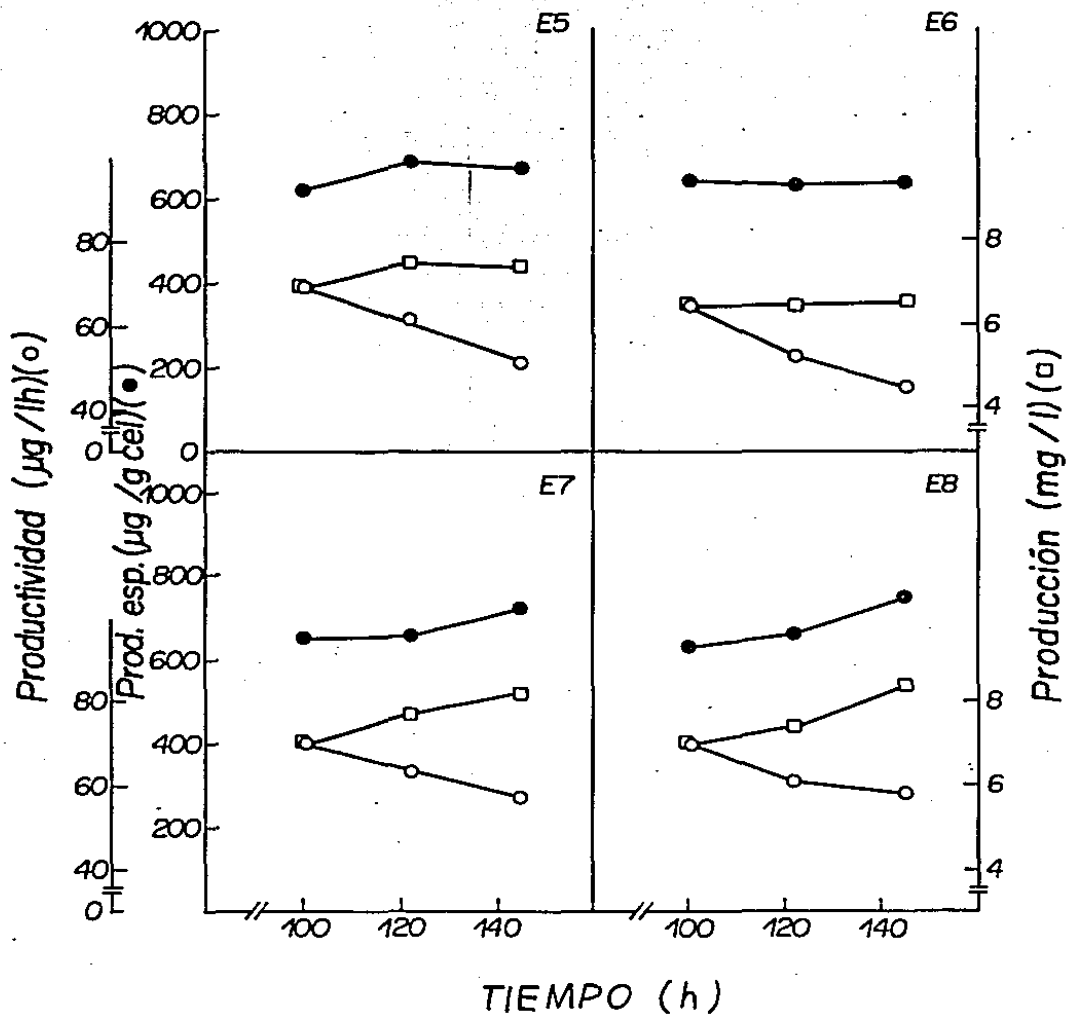


FIGURA 53B. Gráfica que Muestra la Producción, Producción Específica y Productividad de Vitamina B-12 al 40., 50. y 60. día de las Fermentaciones a base de Glucosa con *P. shermanii* ATCC 13673 en los Experimentos E5 al E8 del Diseño Experimental Plackett-Burman.

De los 8 tratamientos realizados, el que aportó los mejores resultados en los últimos tres días de la fermentación fué el tratamiento 2, cuyo medio está constituido por 32.8 g/l de glucosa, 3.15 g/l de nitrógeno (proporcionado por el agua de cocimiento de maíz), 8.0 mg/l de cloruro de cobalto, 8.0 mM de glicina en ausencia de los tensoactivos empleados y a un volumen de 150 ml/matraz de 250 ml (tabla_XXII_), el tratamiento que aportó el resultado más pequeño fué el 6.

El parámetro "producción de vitamina B-12" como el más importante para evaluar el efecto de los factores empleados en las fermentaciones, ya que es el más indicativo para decir que medio de fermentación proporciona mejores resultados ya que no está siendo afectado por ningún otro parámetro más que por el medio y las condiciones de fermentación a diferencia de la producción específica y productividad que están directamente relacionadas al crecimiento y al tiempo de fermentación, respectivamente.

Analizando estadísticamente los resultados, se encuentra que ningún factor de los empleados presentan efecto significativo (tabla_XXIII_), (ver anexo_4_) sobre nuestro parámetro principal "producción" en ninguno de los 3 días en que se evaluó ésta; sin embargo la concentración del DDC y del propanol presentaron efecto negativo en los dos últimos días de la fermentación.

En la producción específica, los factores concentración de cobalto a las 100 h y volumen de medio a las 100 y 145 h presentaron efecto significativo de una manera positiva y el factor propanol-cianurado a las 145 h efecto significativo pero de forma negativa sobre la variable de respuesta. Lo cual indica nuevamente que es importante el tiempo en que se evalúen cada uno de los parámetros que se deseen determinar. En cuanto al crecimiento de P. shermanii, los factores temperatura y propanol-cianurado a las 122 h de fermentación causan un efecto negativo al igual que el factor volumen a las 100, 122 y 145 h de realizada la fermentación, efecto que es muy importante tanto en crecimiento como en producción ya que el nivel de oxígeno disuelto en el medio es muy importante en el desarrollo del metabolismo del microorganismo.

Como se puede observar, el efecto que presenta el factor volumen sobre la producción específica de vitamina B-12 es a consecuencia del efecto que tiene sobre el crecimiento del microorganismo (tabla_XXIV_), (ver anexo_4_).

TABLA XXII. RESULTADOS EN EL DISEÑO EXPERIMENTAL PLACKETT-BURMAN EMPLEANDO GLUCOSA
COMO FUENTE DE CARBONO.

EXPERIMENTO No.	CRECIMIENTO			PRODUCCION			PRODUCCION ESPECIFICA			PRODUCTIVIDAD		
	(g/l)			(µg _{B12} /l)			(µg _{B12} /g cel)			(µg _{B12} /lh)		
	TIEMPO (h)	100	122	145	100	122	145	100	122	145	100	122
1	11.133	11.054	10.608	6745.667	6818.000	6692.000	636.124	649.147	664.089	67.45	55.89	46.15
2	10.568	11.304	10.413	7532.000	8204.000	8498.000	749.252	762.445	859.0735	75.32	67.25	58.61
3	10.790	10.353	10.275	6976.667	7296.333	8064.000	679.491	741.034	827.273	69.76	59.81	55.61
4	10.625	9.726	10.451	7186.667	6806.333	7528.222	709.822	744.312	774.274	71.86	55.79	51.92
5	11.533	11.359	11.404	6785.333	7378.000	7287.000	615.139	681.047	670.040	67.85	60.48	50.26
6	10.491	10.688	10.892	6395.667	6395.667	6547.333	642.021	629.344	636.700	63.95	52.42	45.15
7	11.318	12.156	11.942	7023.333	7669.667	8215.667	649.415	659.842	722.567	70.28	62.87	56.66
8	11.553	11.676	11.760	6969.667	7426.207	8400.000	633.194	660.785	747.575	69.69	60.87	57.93

TABLA XXIII. SIGNIFICANCIA DE CADA FACTOR EN EL EXPERIMENTO PLACKETT-BURMAN

F cal

FACTOR TIEMPO (h)	CRECIMIENTO			PRODUCCION			PRODUCCION ESPECIFICA		
	100	122	145	100	122	145	100	122	145
A	$2.88 \cdot 10^{-3}$	$1.05 \cdot 10^{-1}$	3.66	$2.08 \cdot 10^{-1}$	4.37	$5.27 \cdot 10^{-2}$	$5.01 \cdot 10^{-1}$	1.47	1.85
B	$7.21 \cdot 10^{-1}$	$5.48 \cdot 10^{-3}$	$9.67 \cdot 10^{-1}$	1.78	2.25	$5.50 \cdot 10^{-4}$	6.98*	$8.14 \cdot 10^{-1}$	1.83
C	$4.64 \cdot 10^{-1}$	$2.58 \cdot 10^{-2}$	$1.16 \cdot 10^{-2}$	1.71	5.98* (-)	11.25* (-)	2.37	2.17	3.83
D	$1.55 \cdot 10^{-2}$	12.07**	2.41	$1.95 \cdot 10^{-2}$	3.78	$4.33 \cdot 10^{-2}$	$3.34 \cdot 10^{-3}$	$2.99 \cdot 10^{-1}$	1.49
E	$2.99 \cdot 10^{-1}$	13.83** (-)	1.19	1.86	22.88** (-)	61.31** (-)	2.66	1.10	16.06** (-)
F	$5.80 \cdot 10^{-1}$	2.57	$3.47 \cdot 10^{-2}$	$1.04 \cdot 10^{-1}$	$2.10 \cdot 10^{-1}$	4.30	$1.38 \cdot 10^{-2}$	1.18	$7.18 \cdot 10^{-1}$
G	14.95** (-)	32.39** (-)	11.83** (-)	$3.10 \cdot 10^{-1}$	$7.77 \cdot 10^{-1}$	$4.30 \cdot 10^{-3}$	14.18*	3.89	8.20*

* Significativo

$F_{\alpha} = 0.05; 1,8 = 5.38$

** Altamente Significativo

$F_{\alpha} = 0.01; 1,8 = 11.26$

(-) Efecto Negativo

TABLA XXIV. COMPARACION DE LOS RESULTADOS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL PLACKETT-BURMAN CON LOS RESULTADOS DEL EXPERIMENTO CONTROL.

TRATAMIENTO TIEMPO (h)	t_D								
	CRECIMIENTO			PRODUCCION			PRODUCCION ESPECIFICA		
	100	122	145	100	122	145	100	122	145
1	12.83**	13.66**	7.88**	6.02**	10.50**	9.99**	0.30	0.28	1.45
2	11.20**	14.43**	7.48**	7.80**	16.02**	16.36**	3.67*	2.00	5.85**
3	11.84**	11.49**	7.20**	6.54**	12.40**	14.83**	1.22	1.57	5.13**
4	11.37**	9.54**	7.56**	7.02**	10.44**	12.94**	2.29	1.64	3.93*
5	13.98**	14.60**	9.52**	6.11**	12.62**	12.09**	1.04	0.37	1.58
6	10.98**	12.52**	8.46**	5.22**	8.80**	9.48**	0.10	0.67	0.83
7	13.36**	17.07**	10.62**	6.65**	13.89**	15.36**	0.13	0.06	2.77
8	14.03**	15.59**	10.25**	6.52**	12.91**	16.02**	0.41	0.04	3.33

* Significativo

$t_D \alpha = 0.05; 1,8 = 3.60$

** Altamente Significativo

$t_D \alpha = 0.01; 1,8 = 4.81$

Vivc. COMPARACION DE LOS RESULTADOS DEL DISEÑO PLACKETT-BURMAN CON RESPECTO AL CONTROL.

Haciendo uso del método de Dunnet (Gill, J.L. 1978) se compararon los resultados obtenidos en el diseño Plackett-Burman (tabla _XXII_) con respecto a los encontrados en el tratamiento control (tabla _XX_). Como se puede observar, los diferentes medios de fermentación probados tuvieron efecto sobre el crecimiento de *P. shermanii* y sobre la producción de vitamina B-12 en los tres días en que se hizo la cuantificación (tabla _XXIV_), (ver anexo _5_), mientras que en producción específica de vitamina B-12, los medios 2, 3 y 4 fueron los que presentaron efecto significativo a las 100 y 145 h para el primero y a las 145 h para los otros dos medios de fermentación.

Como se puede observar, tanto el crecimiento como la producción de vitamina B-12 en el diseño Plackett-Burman fueron mayores a los obtenidos con el tratamiento control, posiblemente como una consecuencia de comenzar con inóculos mayores (figura _51_) ó porque de alguna forma algún constituyente del medio que no contenía el medio control ocasionaron mejores resultados. Resultados que en un principio dificultó poder señalar el mejor medio productor de vitamina B-12 si nos basáramos solamente en este parámetro; sin embargo, otro parámetro del cual podemos hacer uso, es la producción específica de esta vitamina, la cual como se sabe se obtiene al dividir la producción de este metabolito entre el crecimiento del microorganismo alcanzado. De esta forma se cuenta en este caso con un mejor patrón de comparación y por consiguiente se puede seleccionar el ó los mejores medios de producción que realmente proporcionan los mayores resultados sin tener la duda de si el inóculo está o nó afectando nuestros resultados.

Tomando en cuenta lo anterior, se encuentra que solo los tratamientos 2, 3 y 4 presentan efecto significativo sobre la producción específica, de los cuales se puede descartar el tercer medio y tomar en cuenta aquellos que fueron altamente significativos. Los tratamientos 2 y 3 tienen como característica el llevarse a cabo a un volumen de 150 ml de medio de fermentación sin importar la presencia de tween 80 y de propano-cianurado, tener presente en el medio nivel alto ó bajo de cobalto y de DDC además de tener como característica común el nivel alto de glicina en el medio. Tal parece que de todos estos factores, el de mayor importancia es la glicina a su nivel alto en los dos tratamientos de mayor significancia (tabla _XXIV_), (ver anexo _5_).

Vivd. COMPARACION DEL FACTOR GLICINA CON LOS DEMAS FACTORES
FRENTE A LAS VARIABLES DE RESPUESTA:

Glicina vs nivel de oxigeno disuelto.

El efecto que tiene la glicina en combinación con el oxigeno disuelto sobre el crecimiento a un tiempo dado, parece ser importante ya que al cuarto día de fermentación le es más favorable un volumen de 130 ml de volumen de trabajo sin importar si tiene un nivel alto o bajo de glicina; mientras que a un volumen de 150 ml de medio a un nivel bajo de glicina le es desfavorable. Al quinto día de fermentación al cambiar de un nivel bajo a un nivel alto de glicina, el crecimiento se ve favorecido cuando la fermentación se realiza a un nivel de 150 ml y lo desfavorece a un nivel de 130 ml de medio de cultivo, produciendose una clara interacción entre estos dos factores. Al sexto día de fermentación, se observa un efecto diferente al cambiar de un nivel bajo a un nivel alto tanto de glicina como de volumen de medio, ocasionando que el crecimiento del microorganismo disminuya siendo más notorio a los niveles altos de ambos factores, por lo que presentan un efecto sinérgico (figura _54A_). El comportamiento del crecimiento en base a estos dos factores depende mucho del tiempo de cuantificación, posiblemente debido a la interacción de algunos metabolitos que se producen durante la fermentación ya que se trata de un sistema biológico.

En producción de vitamina B-12, estos mismos factores, glicina y volumen de medio presentan interacción en los tres últimos días de fermentación, siendo más favorable un nivel alto de glicina y de volumen de medio al cuarto y quinto día de fermentación y una combinación ya sea de niveles altos ó niveles bajos de ambos factores al sexto día del proceso (figura _54A_).

En producción específica, también presentan interacción estos mismos factores a los tres últimos días de fermentación, siendo más favorable niveles altos tanto de glicina como de volumen de medio y alcanzando mejores resultados al sexto día de la fermentación (figura _54A_).

Glicina vs DDC.

El crecimiento de P. shermanii es el mismo al cuarto día de fermentación cuando aún no se ha adicionado el DDC. Al quinto y sexto día de fermentación, los factores glicina y DDC muestran interacción, presentandose mejor crecimiento en ausencia de DDC y nivel alto de glicina al quinto día, mientras que al sexto día el crecimiento se ve favorecido cuando la glicina se encuentra a su nivel bajo y no influye en el crecimiento cuando la glicina se encuentra a su nivel alto (figura _54B_).

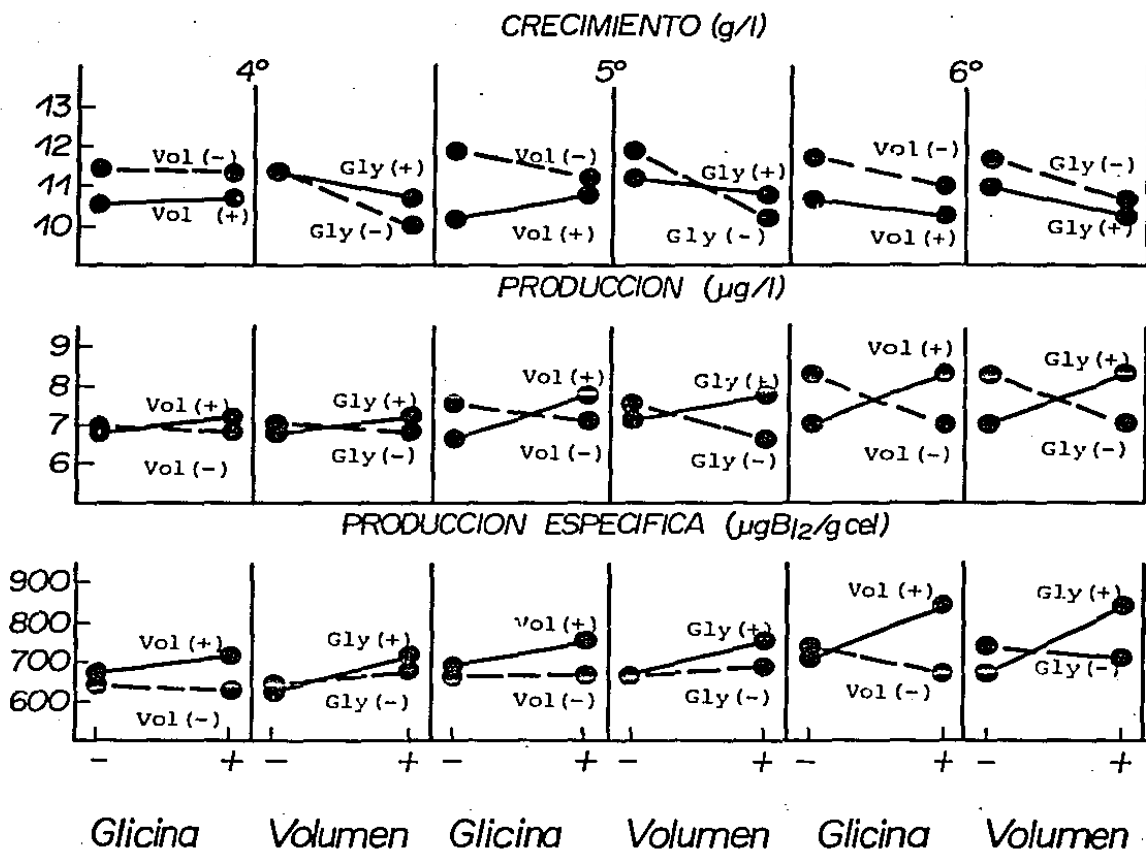


FIGURA 54. Gráficas que Muestran el Efecto e Interacción de los Factores: 54A Glicina-Volumen de Medio de Fermentación, 54B Glicina-DDC, 54C Glicina-Tween 80, 54D Glicina-Propanol CN y 54E Glicina-Cobalto Sobre el Crecimiento de *P. shermanii* ATCC 13673, Producción y Producción Específica de Vitamina B-12 a los Tres Últimos Días de Fermentación.

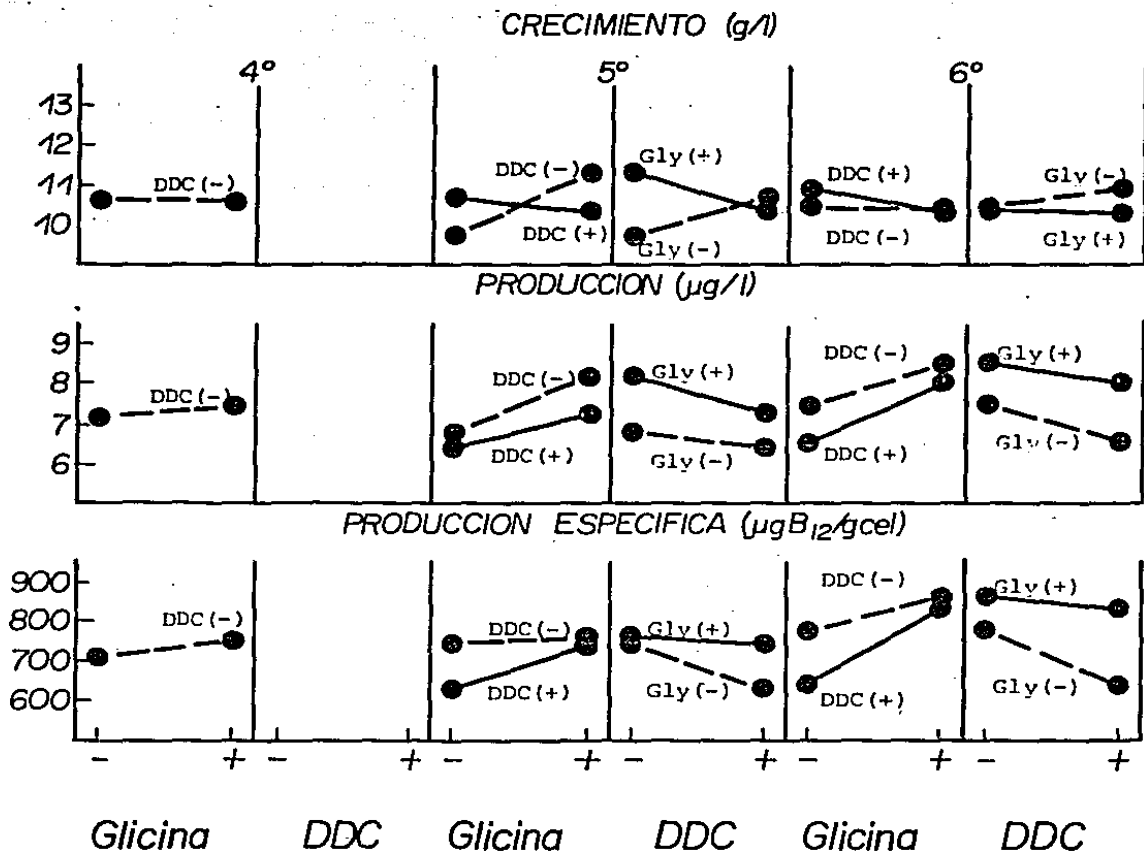


FIGURA 54 B

En producción de vitamina B-12, la glicina a su nivel alto la favorece ya sea en ausencia o en presencia del DDC, siendo más notorio en ausencia de este último factor y afectándolo más cuando la glicina se encuentra a su nivel bajo (figura _54B_).

En producción específica de vitamina B-12, esta se ve favorecida cuando la glicina se encuentra a su nivel alto y en ausencia de DDC, mientras que a bajo nivel de glicina, el DDC presenta un efecto con pendiente negativa (figura _54B_).

Glicina vs Tween 80.

El tween 80 y la glicina presentan un efecto sinérgico; es decir, tanto los niveles bajos como los altos de glicina, el crecimiento de *P. shermanii* disminuye en presencia de tween 80; presentándose al quinto día mayor crecimiento del microorganismo en ausencia del surfactante y a nivel alto de glicina, mientras que al sexto día de fermentación a nivel bajo de glicina y en ausencia de tween 80 el crecimiento ligeramente es mayor, manteniéndose constante a los niveles altos de los factores sin importar que el nivel del precursor cambie (figura_54C_).

En producción de vitamina B-12, los factores tween 80 y glicina presentan interacción, así como un incremento de este metabolito tanto en presencia como en ausencia del surfactante, siendo mayor el incremento cuando el tween 80 no está presente en el medio a lo largo de los últimos tres días de fermentación (figura _54C_).

Tween 80 y glicina presentan también interacción en la producción específica de vitamina B-12; mostrando un considerable incremento al pasar del nivel bajo al alto de glicina cuando no está presente el tween 80 en el transcurso de los últimos tres días de fermentación, manteniéndose prácticamente constante este parámetro a los niveles altos de los dos factores sin importar que cualquiera de los dos varíe (figura _54C_).

Glicina vs Propanol-cianurado.

Los factores glicina y propanol-cianurado presentan interacción sobre el crecimiento microniano. A niveles altos de glicina, al cambiar de ausencia a presencia de este surfactante se incrementa el crecimiento; mientras que a niveles bajos de glicina sucede lo contrario (figura _54D_), comportamiento un tanto raro ya que se esperaba que sucediera alrevés.

Estas mismas variables presentan un comportamiento casi sinérgico al quinto día y completamente sinérgico al sexto día de la fermentación, sobre la producción de vitamina B-12; presentando mejores resultados cuando hay ausencia de propanol-cianurado sin importar el nivel de glicina que tenga

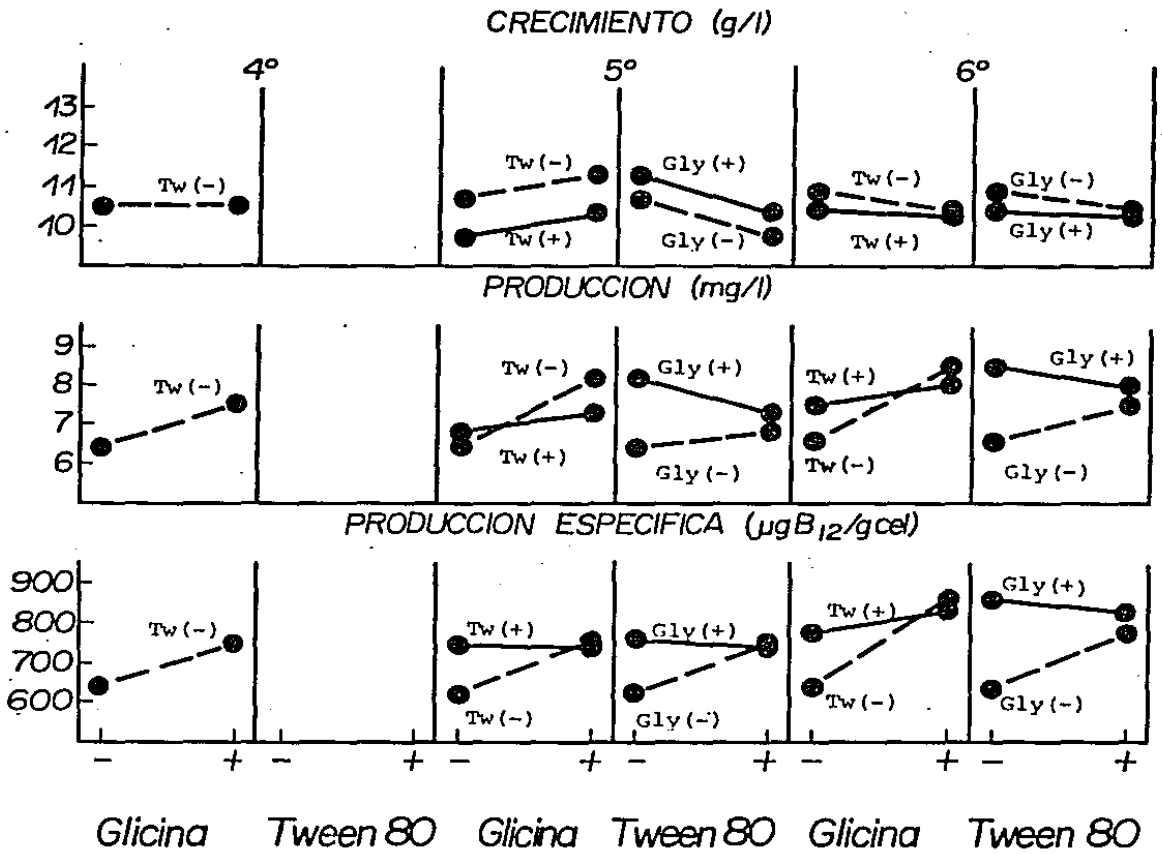


FIGURA 54 C

el medio de fermentación (figura _54D_).

La glicina y el propanol-cianurado presentan interacción sobre la producción específica de vitamina B-12. En ausencia del surfactante se observa un incremento de dicha variable de respuesta al cambiar del nivel bajo al nivel alto de glicina y presentando una disminución de dicho parámetro al nivel alto de glicina cuando se adiciona propanol-cianurado al medio de fermentación (figura _54D_).

Glicina vs Cobalto.

La glicina y el cobalto muestran interacción sobre el crecimiento de *P. shermanii*. Al cuarto y sexto día de fermentación la variación de cualquiera de estos dos factores casi no modifica el crecimiento; pero al quinto día los niveles altos de ambos precursores se ve reflejado en un mayor crecimiento del microorganismo (figura _54E_).

Niveles altos tanto de cobalto como de glicina proporcionan mayor producción de vitamina B-12 en los tres últimos días de la fermentación (figura _54E_).

A pesar de que la mayor producción específica de vitamina B-12 se encuentra a los niveles altos de glicina y cobalto, su incremento al pasar de un nivel bajo a uno alto de cualquiera de los dos factores manteniendo a uno de ellos a su nivel alto no es tan notorio como lo es cuando cualquiera de las dos variables se mantiene a su nivel bajo al variar el otro factor (figura _54E_).

Con esto corroboramos realmente que en el nivel alto de glicina junto con el nivel alto de cobalto y a un volumen de 150 ml de medio de fermentación predominan los mejores resultados de los parámetros determinados en este bloque de experimentos.

Vive. DISEÑO FACTORIAL 2^3 .

En base a los resultados obtenidos en el diseño experimental Plackett-Burman, los cuales indicaron que el factor glicina a una concentración de 8 mM (nivel alto) fué la única sustancia que pudo intervenir de alguna forma al incremento de la producción de vitamina B-12.

El medio de fermentación del cual se partió en este diseño del experimento, estuvo constituido por: 32.8 g/l de glucosa, 3.15 g/l de nitrógeno (proporcionado por el agua de cocimiento de maíz), 8.0 ppm de cloruro de cobalto, 8.0 mM de glicina y las fermentaciones se llevaron a cabo en volúmenes de 150 ml de volumen de trabajo contenidos en matraces de 250

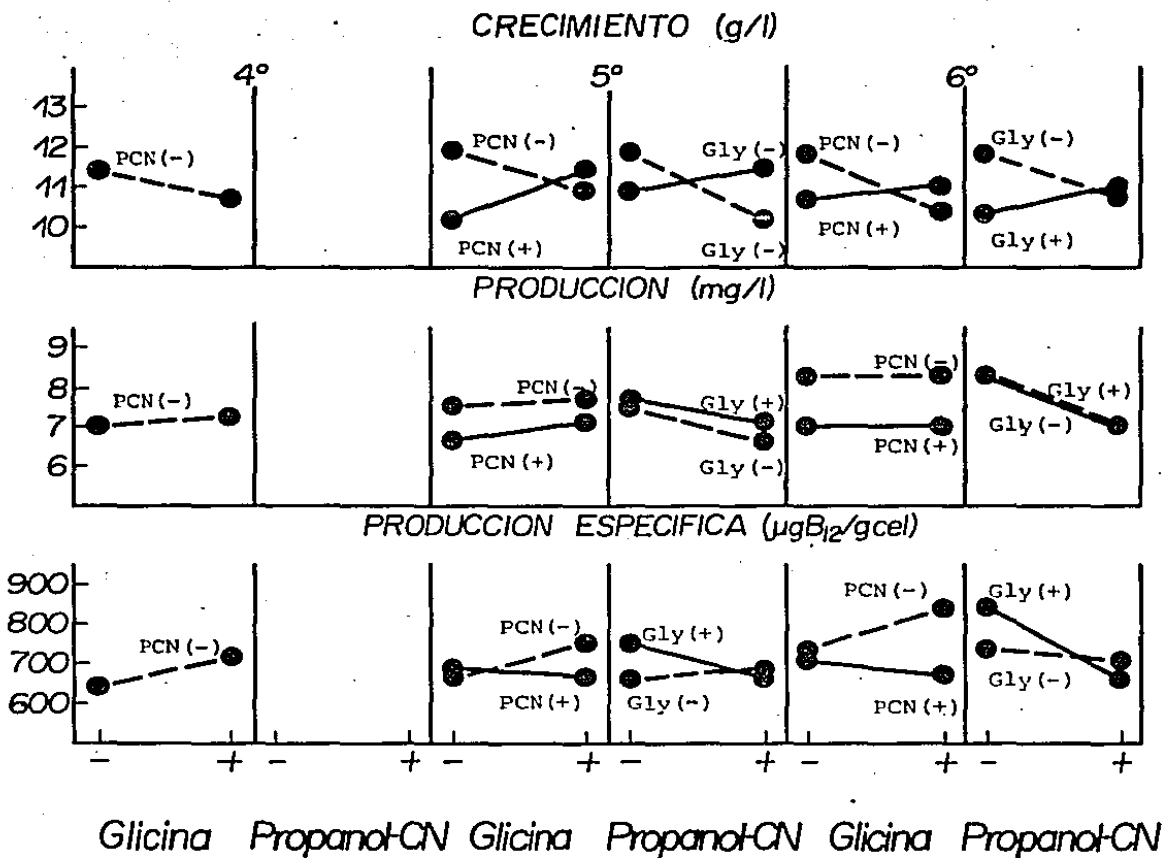


FIGURA 54 D

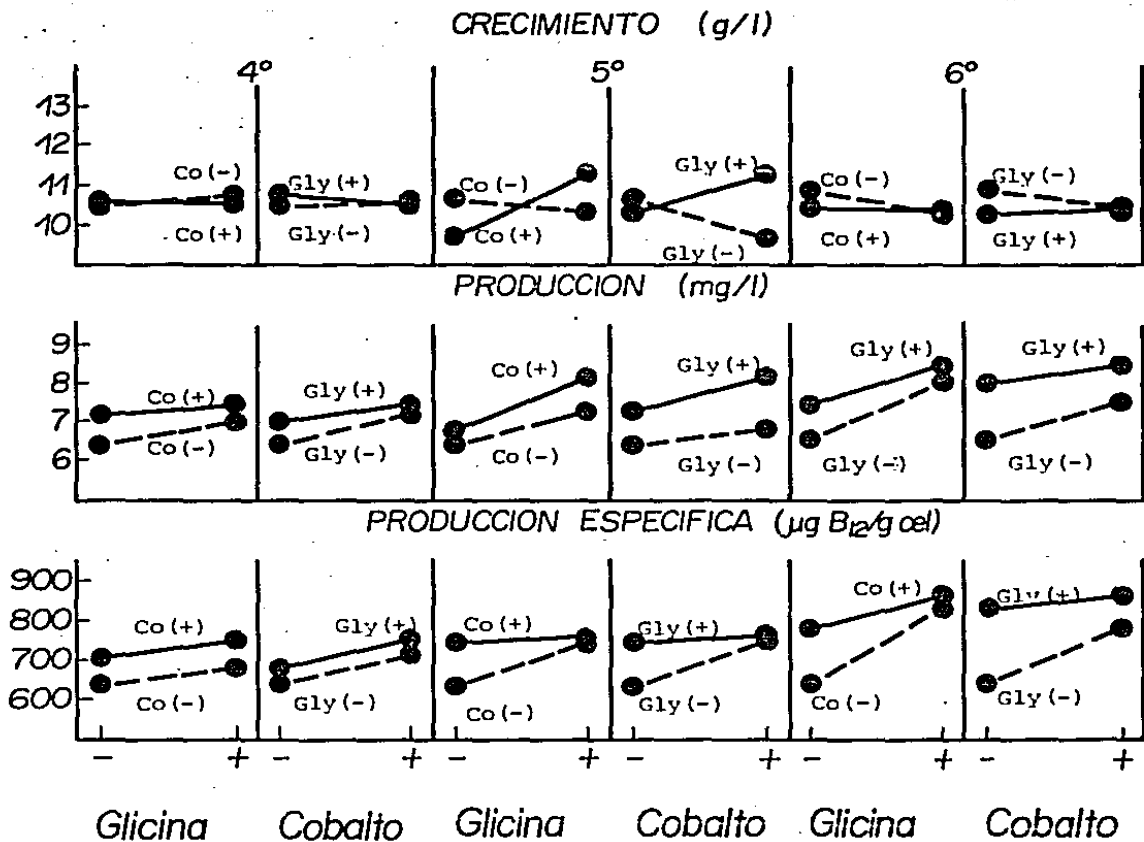


FIGURA 54 E

ml.

En virtud de que el objetivo principal en este trabajo es el de seguir incrementando la producción de vitamina B-12, se planteó un diseño experimental tipo factorial 2^3 ; donde se manejaron dos concentraciones iniciales (nivel bajo y nivel alto) de cada uno de los factores glucosa, nitrógeno y glicina, concentraciones propuestas en base a las utilizadas en el experimento 2 del anterior diseño experimental, en la cual se obtuvieron los mejores resultados. La matriz de tratamientos se muestra en la tabla _XXV_.

El crecimiento del microorganismo fué cuantificado durante el curso de las fermentaciones determinando y ajustando el pH cada 12 h durante el transcurso de la misma.

En las fermentaciones donde la glucosa estuvo a su nivel alto, el crecimiento del microorganismo fué mayor de 12 a 13 g/l (experimentos 1 al 4) a las 72 h de haber iniciado la fermentación (figura _55A_ y _55B_) con unas velocidades específicas de crecimiento (h^{-1}) que fueron disminuyendo paulatinamente hasta ese tiempo (figuras _56A_ y _56B_), a partir del cual comienza la fase estacionaria.

En las fermentaciones donde la glucosa estuvo en su nivel bajo, el crecimiento fué de 10 a 11 g/l (experimentos 5 al 8) a las 48 h de haber comenzado la fermentación, presentando un comportamiento algo diferente al que se observó en los experimentos 1 al 4 ya que la velocidad específica de crecimiento (h^{-1}) una vez que fué disminuyendo poco a poco llega a su fase estacionaria a partir de las 48 h (figuras _56A_ y _56B_).

En los experimentos 1 y 2 el pH se controló hasta el fin de la fermentación ya que este fué disminuyendo durante toda la fermentación indicando que hasta ese tiempo todavía había suficiente fuente de carbono en el medio; hecho que no se presenta en los experimentos 3 y 4 donde el pH se mantiene constante a partir de las 96 h de la fermentación. Estos dos diferentes comportamientos no pueden deberse a la glucosa presente en el medio ya que los cuatro tratamientos tienen la misma cantidad lo que hace pensar que puede deberse a la concentración de nitrógeno ó de glicina en cada uno de los medios de fermentación.

En Los experimentos 5 y 6 a partir de las 72 h, el pH se mantiene prácticamente constante mientras que en los experimentos 7 y 8 entre las 72 y 96 h se mantiene constante alcalinizándose posteriormente.

En las 8 fermentaciones realizadas, las velocidades específicas de crecimiento (h^{-1}) fueron muy similares durante las primeras 48 h de haber iniciado la fermentación, momento en que entraron en fase estacionaria aquellos microorganismos cuyos medios de cultivo contenían baja concentración de

TABLA XXV. MATRIZ DE TRATAMIENTOS EN EL DISEÑO FACTORIAL 2^3 .

TRATAMIENTO	VARIABLES		
	A	B	C
	(g/l)	(g/l)	(mM)
1	43.0 (+)	4.15 (+)	12.0 (+)
2	43.0 (+)	4.15 (+)	4.0 (-)
3	43.0 (+)	2.15 (-)	12.0 (+)
4	43.0 (+)	2.15 (-)	4.0 (-)
5	23.0 (-)	4.15 (+)	12.0 (+)
6	23.0 (-)	4.15 (+)	4.0 (-)
7	23.0 (-)	2.15 (-)	12.0 (+)
8	23.0 (-)	2.15 (-)	4.0 (-)

CONCENTRACIONES O NIVELES DE CADA FACTOR EN ESTE DISEÑO:

FACTOR	NIVEL ORIGINAL	UNIDADES DE VARIACION
A	33.0 g/l	10 g/l
B	3.15 g/l	1 g/l
C	8.0 mM	4 mM

+ = Nivel alto.

- = Nivel bajo.

El Cloruro de cobalto se mantuvo a una concentración de 6 ppm y el pH entre 6.5 - 7.5.

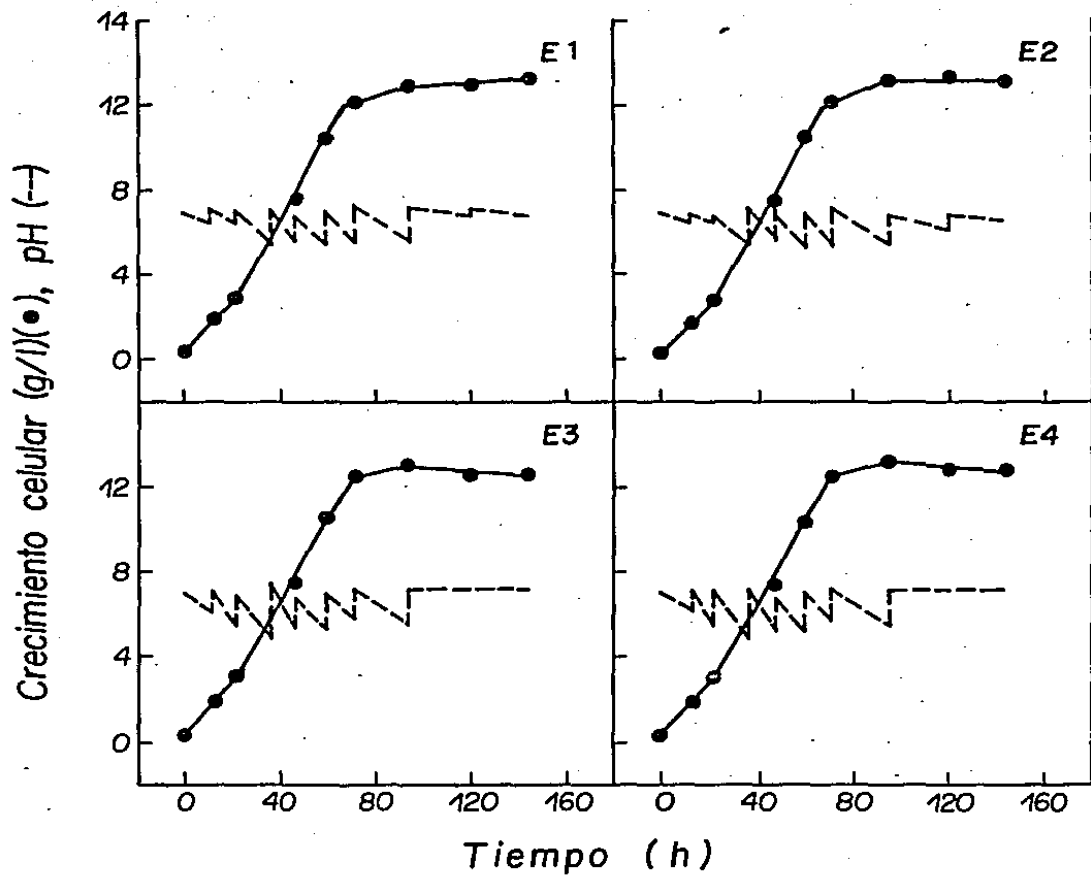


FIGURA 55A. Grafica que Relaciona el Crecimiento de *Pa. shermanii* ATCC y el pH en los Experimentos E1 al E4 del Diseño Factorial 2^3 en Fermentaciones a base de Glucosa.

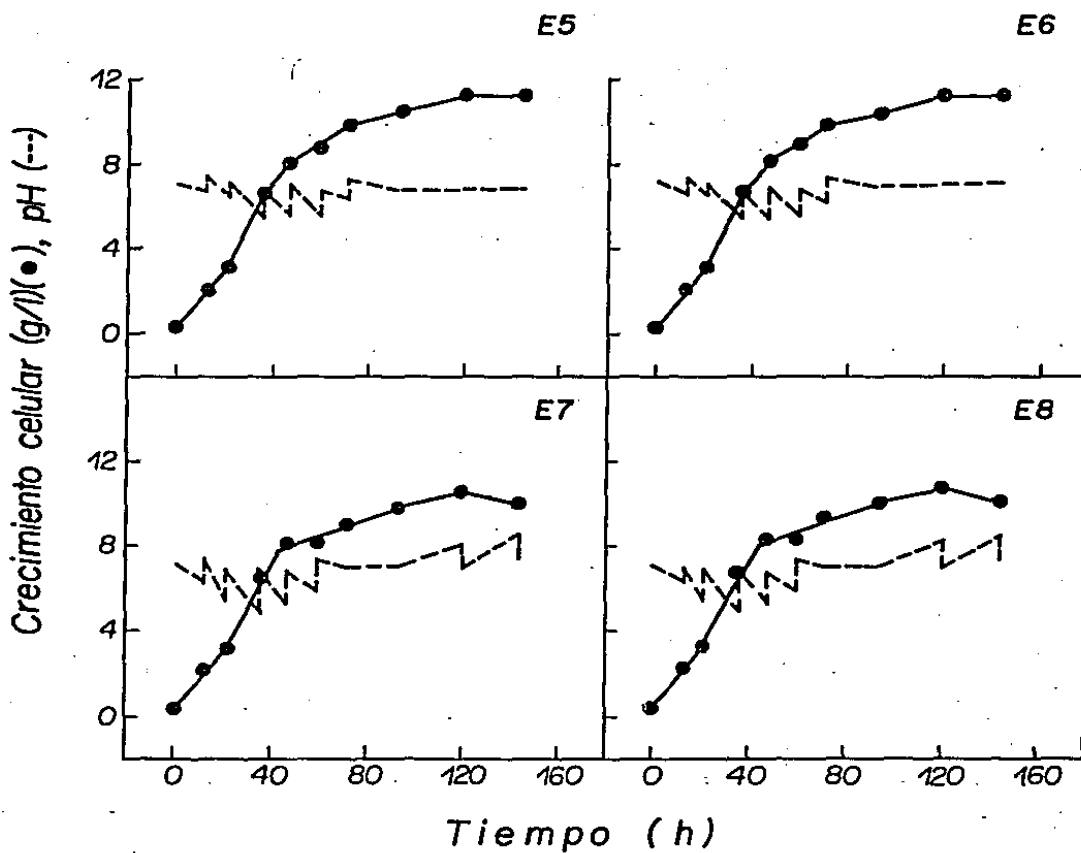


FIGURA 55B. Grafica que Relaciona el Crecimiento de *P. shermanii* ATCC 13473 y el pH en los Experimentos E5 al E8 del Diseño Factorial 2^3 en Fermentaciones a base de Glucosa.

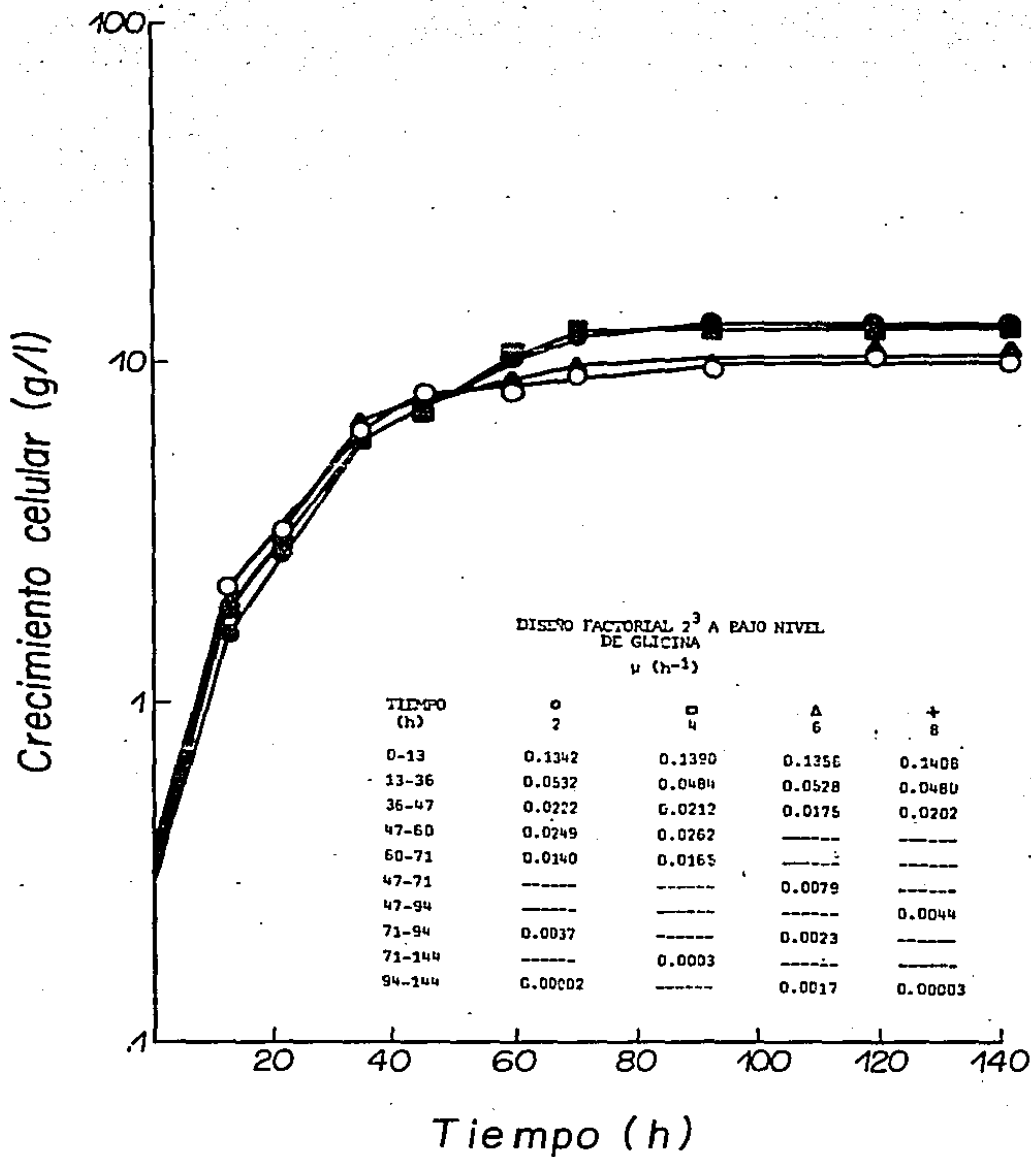


FIGURA 56A. Velocidades Especificas de Crecimiento de *E. shermanii* ATCC 13673 en Fermentaciones de 150 ml de Medio/Matraz de 250 ml empleando un Diseño Factorial 2^3 en un Medio a base de Glucosa como Fuente de Carbono. Experimentos 2, 4, 6 y 8.

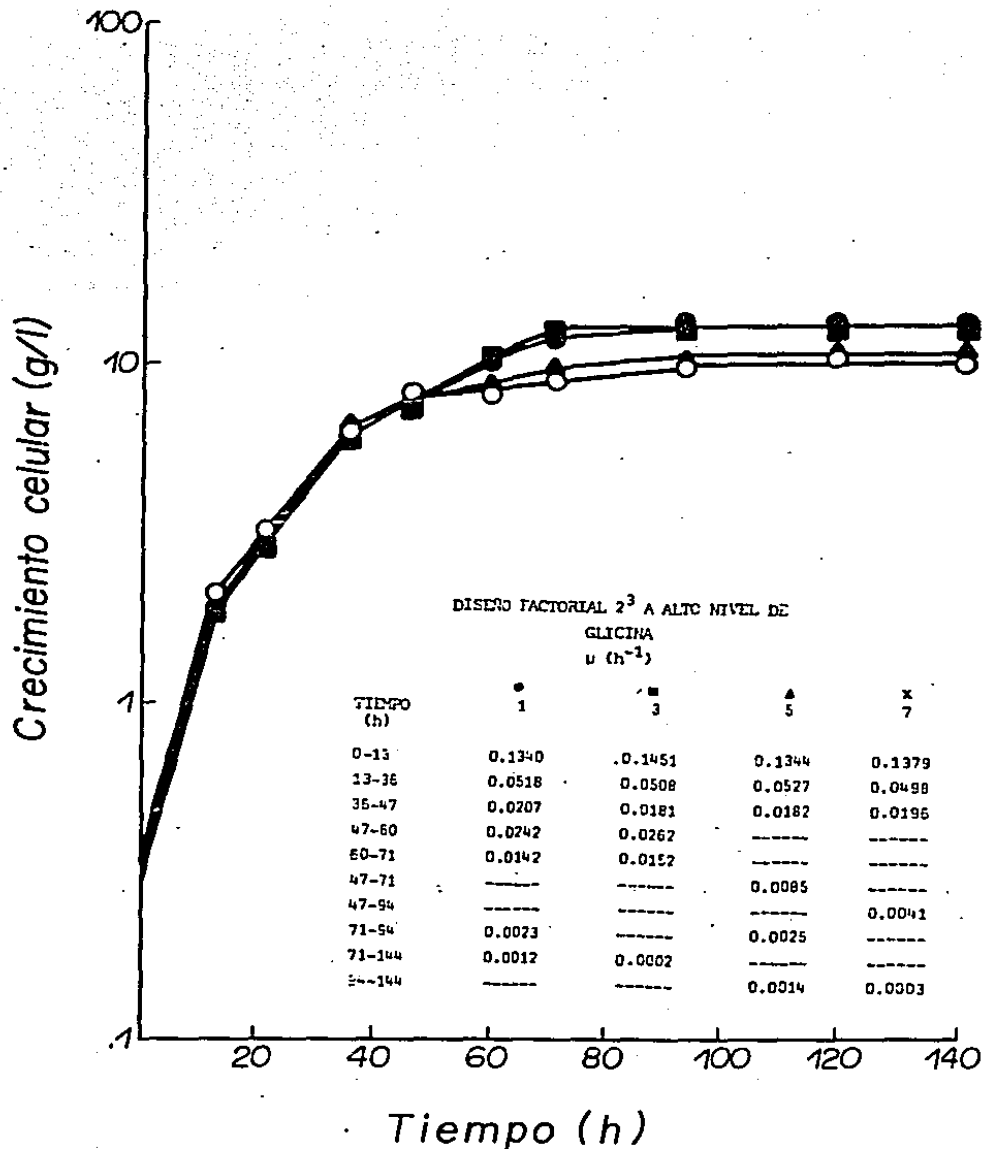


FIGURA 56B. Velocidades Especificas de Crecimiento de *P. shermanii* ATCC 13673 en Fermentaciones de 150 ml de Medio/Matriz de 250 ml Empleando un Diseño Factorial 2³ en un Medio a base de Glucosa como Fuente de Carbono. Experimentos 1, 3, 5 y 7.

glucosa y 24 h después aquellos microorganismos cuyos medios contenían el nivel alto de glucosa (figura _56A_ y _56B_).

De los experimentos realizados en este diseño factorial (tabla _XXVI_) solo uno de los tratamientos proporcionó los mejores resultados: 9.83 mg/l en producción, 68.27 μ g/lh en productividad y 790.59 μ g/g de célula en producción específica; incrementos que representan el 15, 14 y el 0 % respectivamente con respecto a los resultados obtenidos en el experimento 2 del diseño experimental Plackett-Burman. Dicho medio de fermentación estuvo constituido por: 43.0 g/l de glucosa, 2.15 g/l de nitrógeno, 4.0 mM de glicina y 8.0 ppm de cloruro de cobalto (tabla _XV_).

Los demás resultados obtenidos haciendo uso de este diseño factorial estuvieron en el rango de los obtenidos en el diseño Plackett-Burman.

El análisis estadístico de los resultados (tabla _XXVII_), (ver anexo _6_) indicaron que tanto la glucosa como el nitrógeno (proporcionado por el agua de cocimiento de maíz) presentaron efecto altamente significativo, así como la interacción de ambos factores (figura _57_) sobre el crecimiento del microorganismo. Dicho efecto claramente se observa en los resultados de la tabla _XXVII_. Cuando la glucosa y el nitrógeno se encuentran a su alta concentración independientemente de la concentración de glicina (experimento 1 y 2), los crecimientos son mayores a los presentados en los experimentos 3 y 4 donde a pesar de que la concentración de la glucosa es alta el nitrógeno se encuentra a su nivel bajo. Lo mismo sucede cuando se tiene en el medio de cultivo bajo nivel de glucosa y alto nivel de nitrógeno, el crecimiento es mayor en los experimentos 5 y 6 en comparación al presentado en los experimentos 7 y 8 donde las concentraciones de ambos factores se encuentran a sus niveles bajos. Dicho comportamiento parece indicar que el agua de cocimiento de maíz además de proporcionar nitrógeno aportan algún otro factor que favorecen el crecimiento del microorganismo, sustancias tales como pantotenato y/o biotina, los cuales han sido demostradas a ser buenos factores de crecimiento en las Propionibacterias (Delwich 1949), ya que no se le puede responsabilizar a los aminoácidos que pudieran estar libres en el medio ya que se ha encontrado que aunque las propionibacterias crecen en presencia de ellos no son esenciales para su crecimiento (Wood 1938).

Gráficamente (figura _57_) se muestra que niveles altos de glucosa y de nitrógeno proporcionan un buen crecimiento, lo cual es lógico ya que al haber suficiente fuente de carbono y de nitrógeno en el medio; además de los factores de crecimiento que le proporcione el agua de cocimiento de maíz, el microorganismo responderá creciendo más dentro de niveles que no sean inhibitorios.

TABLA XXVI. RESULTADOS EN EL DISEÑO FACTORIAL 2^3 EMPLEANDO GLUCOSA COMO FUENTE DE CARBONO

EXPERIMENTO	CRECIMIENTO (g/l)	PRODUCCION ($\mu\text{gB}_{12}/\text{l}$)	PRODUCCION ESPECIFICA ($\mu\text{gB}_{12}/\text{g}_{\text{cel}}$)	PRODUCTIVIDAD ($\mu\text{gB}_{12}/\text{lh}$)
1	13.0121	8323.778	639.824	57.80
2	12.8870	7868.000	610.606	54.64
3	12.3390	8505.778	689.318	59.07
4	12.4530	9831.111	790.592	68.27
5	10.8570	7731.333	712.342	53.88
6	10.8990	7770.888	714.082	53.96
7	9.5920	6506.888	678.195	45.19
8	9.7120	6983.333	719.278	48.49

Cuantificado al 6° día de fermentación.

TABLA XXVII. SIGNIFICANCIA DE CADA FACTOR(ES) EN EL DISEÑO FACTORIAL 2³.

Fca1			
FACTOR(ES)	a CRECIMIENTO	b PRODUCCION DE VIT. B-12	a PRODUCCION ESPECIFICA DE VIT. B-12
A	549.81 **	34.294 **	1.0
B	75.12 **	0.02	4.59 *
C		2.14	
AB	10.78 **	19.34 **	7.63 *
AC		0.139	
BC		5.5 *	
ABC		2.02	

a : por análisis factorial 2², F_{1,20} = 4.35, α = 0.05

F_{1,20} = 8.10, α = 0.01

b : por análisis factorial 2³, F_{1,16} = 4.49, α = 0.05

F_{1,16} = 8.53, α = 0.01

* Significativo.
** Altamente significativo.

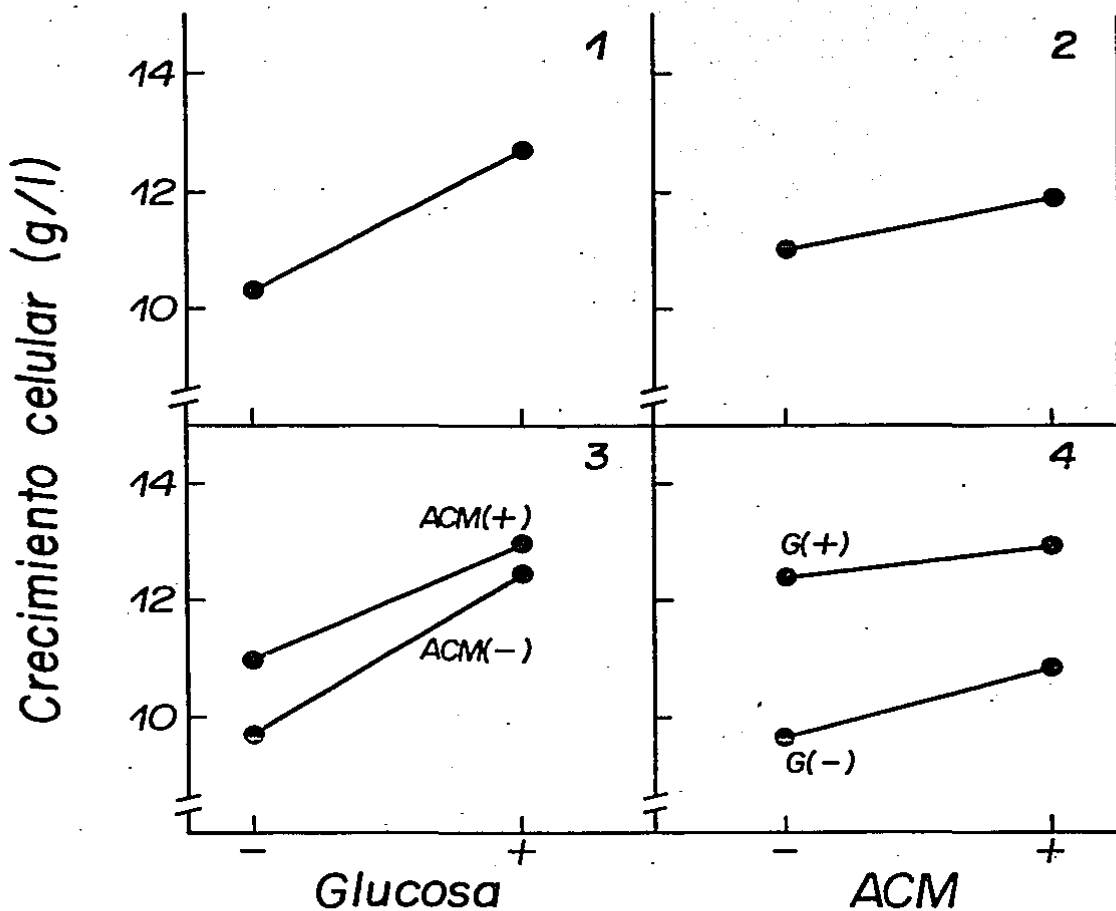


FIGURA 57. Gráfica que Muestra el Efecto de los Factores Glucosa y Nitrogeno (Agua de Cocimiento de Maíz, ACM) al Variar sus Niveles (-,+) Sobre el Crecimiento de *E. shermanii* ATCC 13673 en la Fermentación de 150 ml de Medio/Matriz de 250 ml en un Medio a base de Glucosa. 1 = efecto de glucosa; 2 = efecto de ACM; 3 y 4 = interacción glucosa-ACM. G (-) = glucosa a su nivel bajo, G (+) = glucosa a su nivel alto; ACM (-) = ACM a su nivel bajo, ACM (+) = ACM a su nivel alto.

El análisis estadístico de los resultados sobre la producción de vitamina B-12 (tabla XXVII), (ver anexo 6), indican que existe efecto altamente significativo por la glucosa, interacción entre glucosa y agua de cocimiento de maíz y efecto significativo entre la interacción de los factores agua de cocimiento de maíz y glicina (figura 58).

Analizando primero las producciones obtenidas a nivel alto de glucosa se encuentran que son mayores a las obtenidas cuando este mismo factor se encuentra a su baja concentración (figura 58). Lo que hace pensar que al tener mayor cantidad de sustrato, éste vaya además de formar material celular a la producción de mayor cantidad de ácidos (ver ajuste de pH durante el crecimiento del microorganismo, figura 55_A y 55_B) orgánicos como el acético y el propiónico ocasionando de esta forma que se produzca más vitamina B-12, ya que esta interviene como cofactor en la ruta biosintética de la producción de estos ácidos (ver figura 4, correspondiente a la ruta metabólica de las propionibacterias).

En la interacción entre la glucosa y el agua de cocimiento de maíz, vemos que a nivel alto de glucosa y bajo de nitrógeno, los resultados son mayores a los encontrados cuando ambos factores se encuentran a sus niveles altos; presentándose lo contrario cuando los niveles de glucosa son bajos (tabla XXV); es decir, a nivel bajo de la fuente de carbono y alta de nitrógeno, se obtienen mejores resultados a los obtenidos cuando ambos se encuentran a sus concentraciones bajas. En otras palabras, se puede decir que estando la glucosa a su nivel alto favorece la producción de la vitamina B-12 manteniendo en el medio de fermentación nivel bajo de nitrógeno. Lo contrario se encuentra cuando en el medio de cultivo el nivel de glucosa es bajo ya que favorece la producción de esta vitamina manteniendo el nivel alto de nitrógeno. En estos dos casos los niveles de producción no son los mismos (figura 58), predominando el medio de cultivo donde el nivel de glucosa y el de nitrógeno son alto y bajo, respectivamente (tabla XXVI).

La interacción presentada por los factores agua de cocimiento de maíz y glicina sobre la producción de vitamina B-12 (tabla XXVII), indica que no es recomendable el variar de un nivel bajo al nivel alto, la concentración de cualquiera de los dos factores si estos mismos se encuentran a sus niveles bajos ya que la producción de este metabolito disminuye (figura 59), hecho que no ocurre cuando estos mismos factores se encuentran a su nivel alto y se desea pasar de la concentración baja a la concentración alta de cualquiera de estos mismos factores (tabla XXV y figura 59).

En producción específica de vitamina B-12, el agua de cocimiento de maíz, y de la interacción de agua de cocimiento de maíz y glucosa presentaron efecto significativo (tabla XXVII), (ver anexo 6), señala que a nivel bajo de nitrógeno (proporcionado por el agua de cocimiento de maíz)

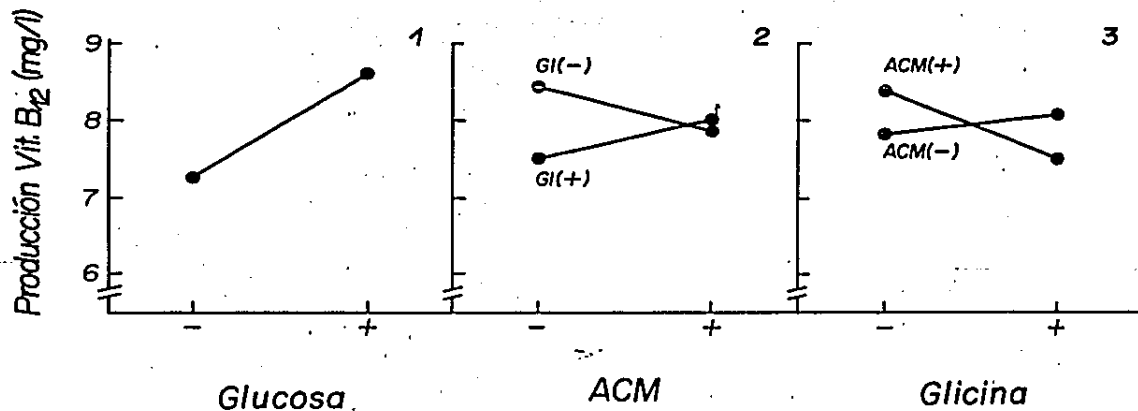


FIGURA 58. Gráfica que Muestra el Efecto de los Factores, Glucosa, Nitrógeno (ACM) y Glicina al Variar sus Niveles (-,+) Sobre la Producción de Vitamina B-12 en la Fermentación de 150 ml de Medio/Matriz de 250 ml en un Medio a base de Glucosa. 1 = efecto de glucosa; 2 y 3 = interacción ACM - glicina (GI). ACM (-) y GI (-) = niveles bajos de ACM y GI; ACM (+) y GI (+) = niveles altos de ACM y GI, respectivamente.

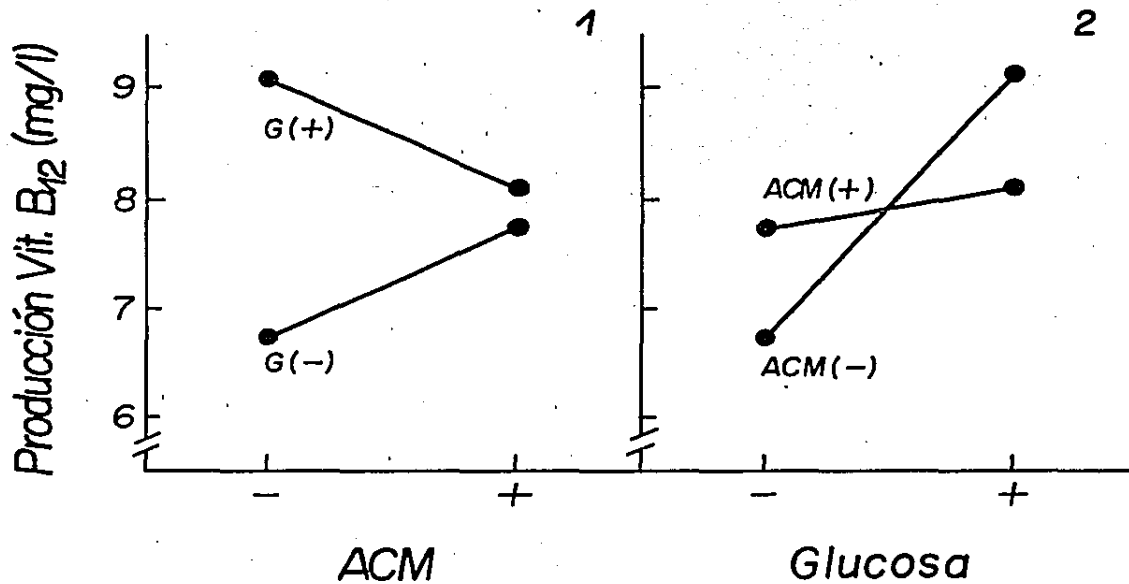


FIGURA 59. Gráfica que Muestra el Efecto de Glucosa y Nitrógeno (ACM) al Variar sus Niveles (-,+) Sobre la Producción de Vitamina B-12 en la Fermentación de 150 ml de Medio/Matraz de 250 ml en un Medio a base de Glucosa. 1 y 2 = interacción glucosa-ACM. G (-) y ACM (-) = niveles bajos de glucosa y ACM; G (+) y ACM (+) = niveles altos de glucosa y ACM.

los resultados son mejores que a alta concentración de este factor. Por otro lado, manteniendo el nivel bajo de ambos factores, este parámetro se ve afectado al variar el nivel del otro factor conjugado como sucede a sus niveles altos de estos mismos factores cuando se cambia del nivel bajo al nivel alto de su factor conjugado (figura _60_ y tabla _XXV_).

El análisis estadístico de estos mismos resultados (anexo_6_ y _7_) proporcionó un panorama mediante el cual se pudo determinar el comportamiento de cada uno de los factores sobre las variables de respuesta, así como proponer otros factores que permitieran incrementar los resultados. De dicho análisis estadístico se obtuvieron expresiones matemáticas para cada una de las variables de respuesta y con ella su representación gráfica, conocidas como "gráficas de contorno".

La primera gráfica (figura _61_), (ver anexo _7_) de este tipo, le corresponde al crecimiento microbiano, la cual indica que se deben de conjuntar las concentraciones de glucosa y de nitrógeno de tal forma que se obtenga el crecimiento deseado. Por ejemplo, si se desea un crecimiento de 11.0 g/l la concentración de glucosa debe ser de 20.5 a 33.0 g/l y el nitrógeno de 2.15 a 4.15 g/l).

La siguiente gráfica (figura _62_), (ver anexo _7_) señala de que forma está siendo afectada o favorecida la producción de la vitamina B-12 por los factores glucosa y por la glicina a diferentes concentraciones de nitrógeno (ACM); ya que estos tres factores presentaron efecto significativo, solos ó por interacción sobre la producción de este metabolito. Los primeros dos factores se ven relacionados de forma lineal observándose que cada vez va siendo mayor la producción de vitamina conforme la concentración de glucosa se incrementa a una determinada concentración de glicina y de nitrógeno. A su vez, éste último factor ocasionó que los niveles de producción disminuyan con el incremento en su concentración (figura _62_), (ver anexo _7_). En general las gráficas señalan que para incrementar la producción de este metabolito, la glucosa debe ser aumentada mientras que la glicina y el nitrógeno ser disminuidos.

La gráfica de contorno que corresponde a la producción específica de vitamina B-12 (figura _63_), (ver anexo _7_) fué afectada significativamente por la fuente de carbono y de nitrógeno, así como de la interacción de ambas; relacionadas por un comportamiento hiperbólico dentro de ciertas concentraciones.

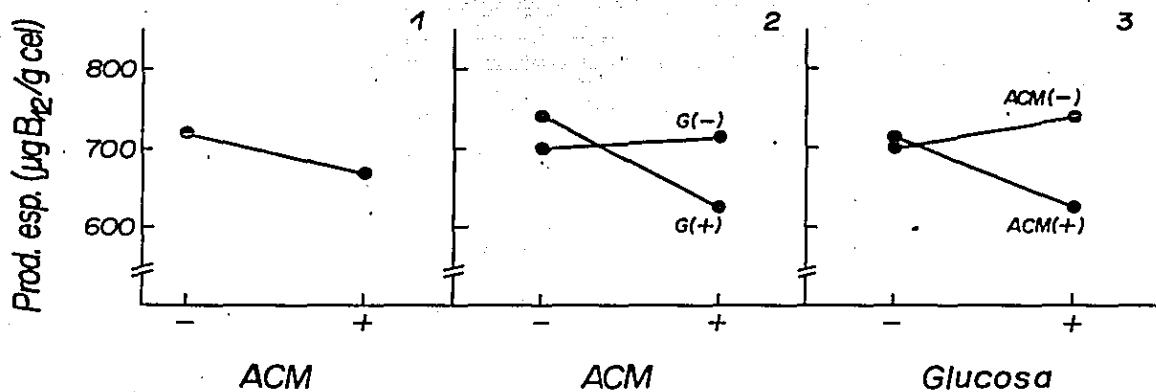


FIGURA 60. Gráfica que Muestra el Efecto de los Factores Glucosa y Nitrógeno (ACM) al Variar sus Niveles (-,+) Sobre la Producción Específica de Vitamina B-12 en la Fermentación de 150 ml de Medio/Matraz de 250 ml en un Medio a base de Glucosa con *E. shermanii* ATCC 13673. 1 = efecto de ACM; 2 y 3 interacción glucosa-ACM; G (-) = glucosa a su nivel bajo, G (+) = glucosa a su nivel alto; ACM (-) = ACM a su nivel bajo, ACM (+) = ACM a su nivel alto.

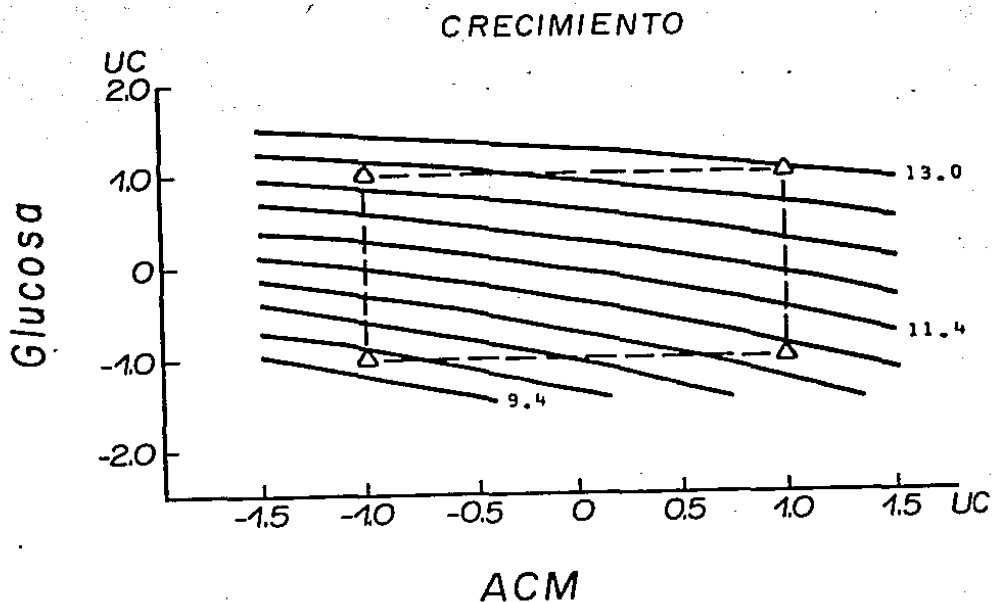


FIGURA 61. Gráfica de contorno, Concentración de Glucosa (g/l) vs Concentración de Agua de Cocimiento de Malz (ACM, g/l) en el Crecimiento (g/l) de *P. shermanii* ATCC 13673. Zona rectangular = zona de exploración. Líneas continuas = comportamiento del crecimiento. Δ = resultados experimentales. UC = unidades codificadas. La ecuación que gobierna este comportamiento es:

$$\hat{Y} = 11.4689 + 1.2037 A + 0.445 B - 0.1685 AB.$$

Donde \hat{Y} = crecimiento estimado de *P. shermanii*.

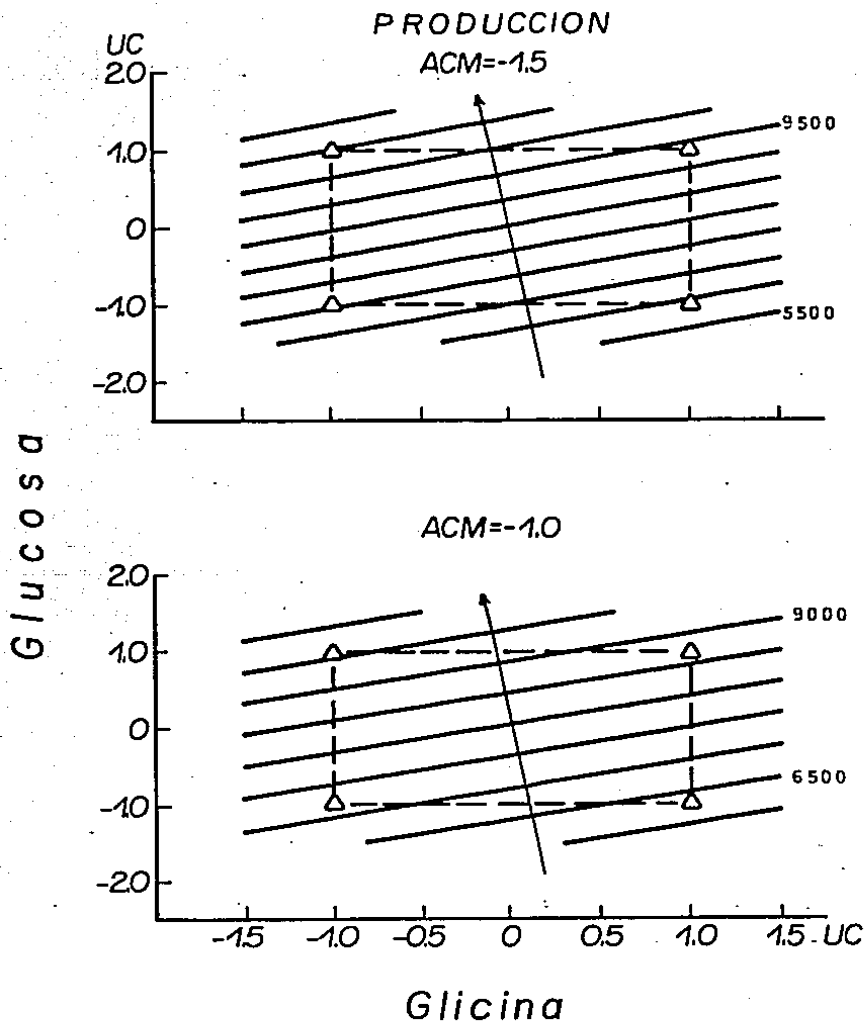
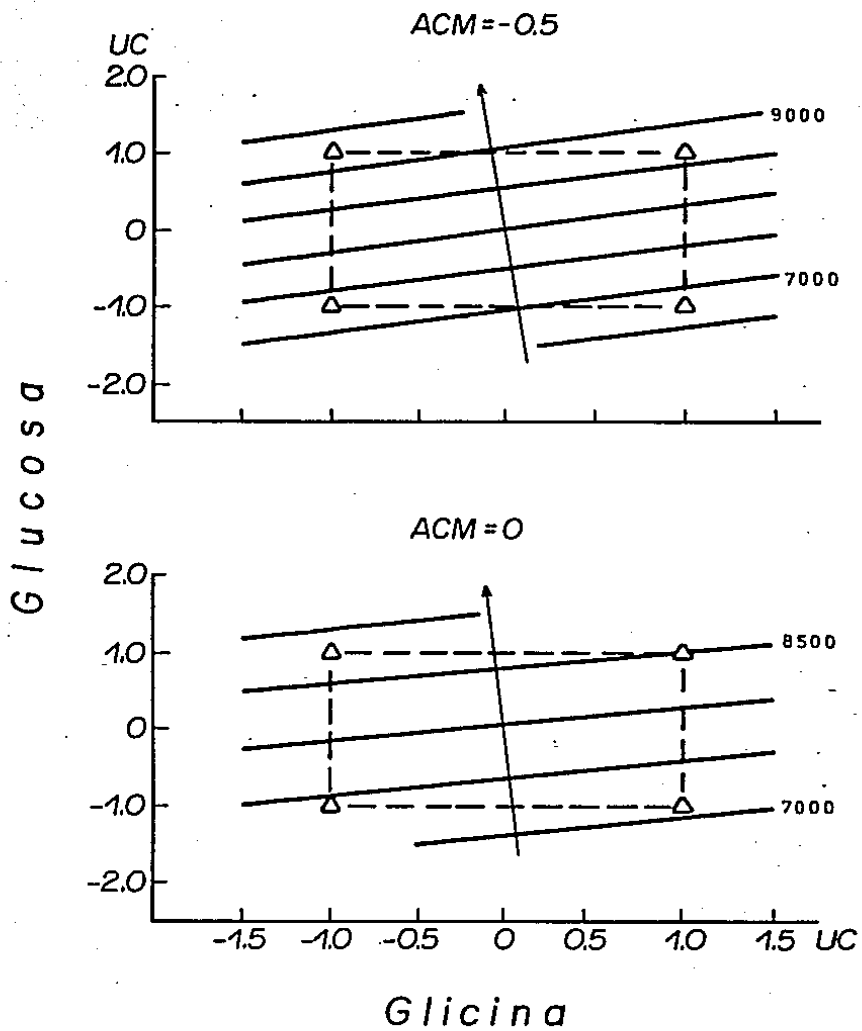


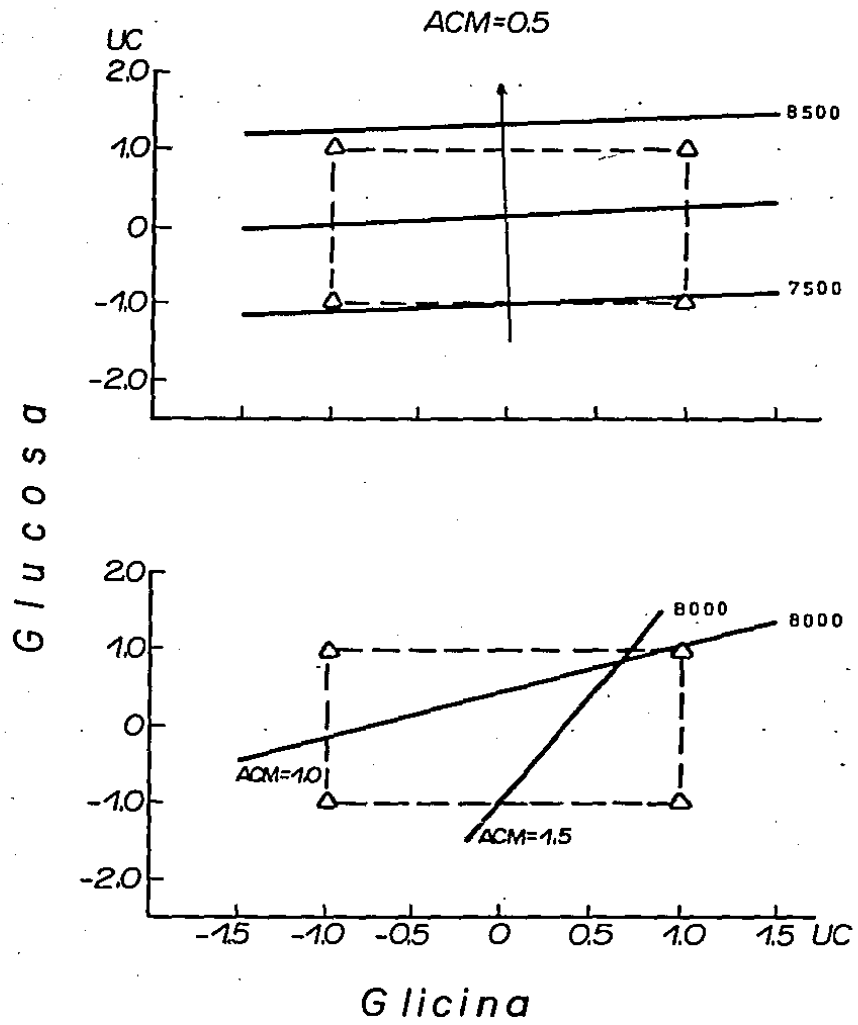
FIGURA 62. Gráfica de contorno, Concentración de Glucosa (g/l) vs Concentración de glicina (mM) a diferentes niveles de ACM (g/l) en la Producción de Vitamina B-12 (mg/l). Zona rectangular = zona de exploración; líneas rectas = comportamiento de la variable de respuesta; Δ = resultados experimentales; UC = unidades codificadas. La ecuación que gobierna a este comportamiento es:

$$\hat{Y} = 7940.1385 + 692.028 A - 16.6389 B - 173.1944 C - 519.639 AB + 277.25 BC.$$

Donde \hat{Y} = producción estimada de vitamina B-12.



CONTINUACION DE LA FIGURA 62



CONTINUACION DE LA FIGURA 62

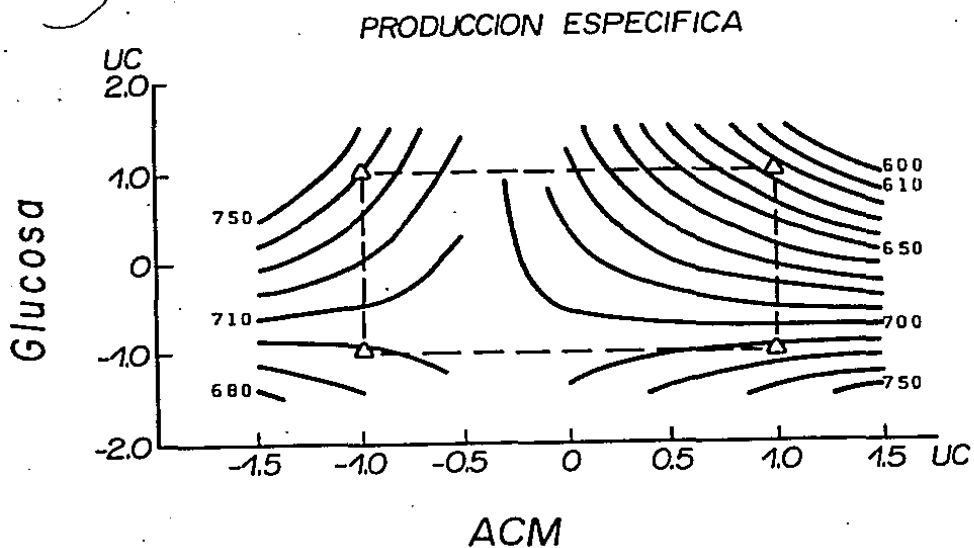


FIGURA 63. Gráfica de contorno, Concentración de Glucosa (g/l) vs Concentración de ACM (g/l) en la Producción Específica de Vitamina B-12. Zona rectangular = zona de exploración; líneas hiperbólicas = comportamiento de esta variable de respuesta. = resultados experimentales. UC = unidades codificadas. La ecuación que gobierna a este comportamiento es:

$$\hat{Y} = 694.2796 - 11.6947 A - 25.0664 B - 32.3073 AB.$$

Donde \hat{Y} = producción específica estimada de vitamina B-12.

Vivf. COMPARACION DE LOS RESULTADOS DEL DISEÑO FACTORIAL 2³ CON EL MEJOR EXPERIMENTO DEL DISEÑO PLACKETT--BURMAN.

Los resultados de este diseño factorial al ser comparada con el mejor resultado del anterior diseño experimental mediante el uso del método de Dunnet (tabla XXVIII, (ver anexo 5), señaló que solamente el incremento en el crecimiento fué significativo, mientras que en la producción el incremento obtenido en algunos de los medios de fermentación no fué significativo (ni el obtenido en el experimento 4) ni mucho menos en producción específica, donde fué afectada debido al alto crecimiento alcanzado; y las producciones de vitamina B-12 que estuvieron en el rango alcanzado en el experimento del Plackett-Burman. El incremento de 1.3 mg/l de vitamina B-12 alcanzados en el experimento 4 del diseño factorial se consiguió empleando 10.0 g/l más de glucosa, 1.0 g/l menos de nitrógeno y 4.0 mM de glicina; cantidades que se relacionaron de tal forma que permitió ese incremento, pero que no fué significativo desde el punto de vista estadístico. Sin embargo, si se viera desde el punto de vista económico se justificaría el aumento en el costo de producción por materia prima ya que con esto se aumenta en un 15 % más de vitamina B-12, cuyo precio es más elevado.

Vivg. EXPERIMENTOS PROPUESTOS POR LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL DISEÑO FACTORIAL 2³.

Con el análisis anterior se obtuvieron expresiones matemáticas para cada uno de los parámetros determinados. Como la principal variable de respuesta, en el presente estudio es la producción de vitamina B-12; a partir de la expresión matemática encontrada empleando los resultados de los anteriores experimentos, se calcularon las concentraciones de los componentes del medio (anexo 8) con el fin de incrementar la producción de este metabolito.

Los medios de fermentación propuestos fueron 9, cuyas composiciones se muestran en la tabla XXIX, al igual que el medio control. Las fermentaciones se realizaron al mismo tiempo.

La determinación del crecimiento del microorganismo así como el ajuste del pH se realizó durante los 6 días que duró la fermentación. El comportamiento del crecimiento de P. shermanii en los nueve medios de fermentación, presentó mayor biomasa en aquellos donde el nitrógeno proporcionado por el agua de cocimiento de maíz se mantuvo a una concentración mayor (2.15 g/l, en los experimentos M1, M2 y M3; y disminuye en función de la concentración de nitrógeno

TABLA XXVIII.COMPARACION DE LOS RESULTADOS DEL DISEÑO FACTORIAL 2^3 CON LOS RESULTADOS DEL EXPERIMENTO CONTROL (E2 DEL DISEÑO PLACKETT-BURMAN).

TRATAMIENTO	CRECIMIENTO	PRODUCCION	PRODUCCION ESPECIFICA
1	(+) 11.96 **	0.33	(-) 4.46 *
2	(+) 11.46 **	1.19	(-) 5.05 **
3	(+) 9.25 **	0.01	(-) 3.45 *
4	(+) 9.71 **	2.52	1.39
5	(+) 3.28 *	1.45	2.98
6	(+) 3.45 *	1.38	2.95
7	1.82	(-) 3.77 *	(-) 3.68 *
8	1.33	2.87	(-) 2.84

* Significativo

** Altamente significativo

$t_D \alpha 0.05; 8,4 = 3.02$

$t_D \alpha 0.01; 8,4 = 4.17$

TABLA XXIX. COMPOSICION DE LOS MEDIOS DE FERMENTACION PROPUESTOS EN BASE A LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL DISEÑO FACTORIAL 2^3 .

CONSTITUYENTES DEL MEDIO (g/l)*	GLUCOSA (g/l)	NITROGENO (ACM) (g/l)	GLICINA (mM)	CoCl ₂ (ppm)
TRATAMIENTO				
1	48	2.15	3.2	8.0
2	53	2.15	2.5	8.0
3	58	2.15	1.7	8.0
4	48	1.65	3.2	8.0
5	53	1.65	2.4	8.0
6	58	1.65	1.7	8.0
7	48	1.15	3.2	8.0
8	53	1.15	2.4	8.0
9	58	1.15	1.7	8.0
CONTROL	43	2.15	4.0	8.0

* A 1.0 litro con agua de la llave.

(figura 64A, 64B y 64C) . El crecimiento en todos los medios propuestos es semejante al control (figura 64C). El pH en los medios de fermentación se acidificó durante los 6 días, debido lógicamente a la alta concentración de glucosa presente en ellos; sin embargo esa cantidad de fuente de carbono no se vió reflejado en la producción de biomasa, así como tampoco se ve reflejado indirectamente en producción de vitamina B-12. Este efecto se debió posiblemente a que los ácidos, acético y propiónico producidos inhibieron el crecimiento del microorganismo. Decimos que no se ve reflejado en producción de vitamina ya que ésta fué cuantificada en el paquete celular (como se indica en materiales y métodos) que como se sabe la producción de este metabolito va en función al crecimiento del mismo (Florent and Ninent 1979).

Las velocidades específicas de crecimiento (μ) son muy semejantes a todos los medios (tomando en cuenta al control); con la única salvedad de que entran en fase estacionaria en forma desfasada en bloques de tres, como si el agua de cocimiento de maíz estuviera rigiendo dicho comportamiento. Es decir, las tres primeras fermentaciones van muy a la par con el experimento control, entrando en fase estacionaria alrededor de las 96 h de haber iniciado la fermentación (figura 65A); mientras que las demás entran alrededor de las 48 h (figura 65B, 65C). A pesar de que entran en fase estacionaria, esta nunca llega a tener una " μ " máxima cercana a cero, indicando una vez más que éste microorganismo presenta velocidades específicas de crecimiento que van disminuyendo conforme transcurre la fermentación, característico al crecimiento que presentan los microorganismos que se encuentran en medios complejos (Wang 1979, Cooney 1981, Monod 1949, Stanier 1969).

La vitamina B-12 fué cuantificada a los 2 últimos días de la fermentación (tabla XXX). Los niveles de producción al quinto día del proceso fueron de 6.3 a 7.77 mg/l, siendo éste último valor el más alto, y muy semejante al obtenido con el medio control (7.65 mg/l); mientras que los producidos al sexto día de la misma, fueron del orden de 6.7 a 8.77 mg/l, siendo esta último, la producción más alta y semejante con la producida en el experimento control (8.43 mg/l).

El medio que proporcionó la producción más alta de vitamina B-12 fué el tratamiento 3, el mismo que tuvo una productividad más alta (60.2 μ g/lh) aunque su producción específica (633.74 μ g/g de célula) no halla sido la mejor debido a que el crecimiento a este tiempo fué el más alto (13.85 g/l). Dicho medio estuvo constituido por 58.0 g/l de glucosa, 2.15 g/l de nitrógeno, 1.7 mM de glicina y 8.0 ppm de cloruro de cobalto.

Las predicciones hechas con los datos del anterior experimento se cumplieron tanto para la glucosa como para la glicina; los cuales indicaban aumentar la concentración de la

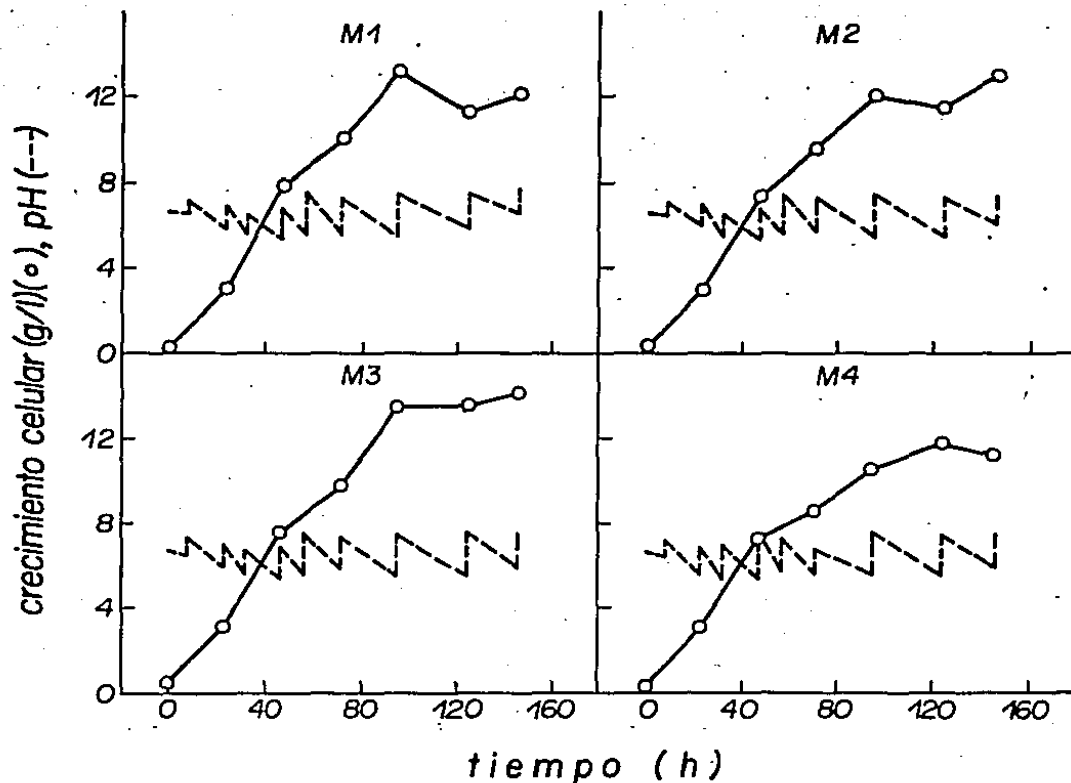


FIGURA 64A. Gráfica que Relaciona el Crecimiento de *P. shermanii* ATCC 13673, el pH durante todo el Curso de la Fermentación y la Producción de Vitamina B-12 a los 2 últimos Días de la Misma en un Medio a base de Glucosa. Experimentos del M1 al M4 Propuestos por los Resultados del Factorial 2³.

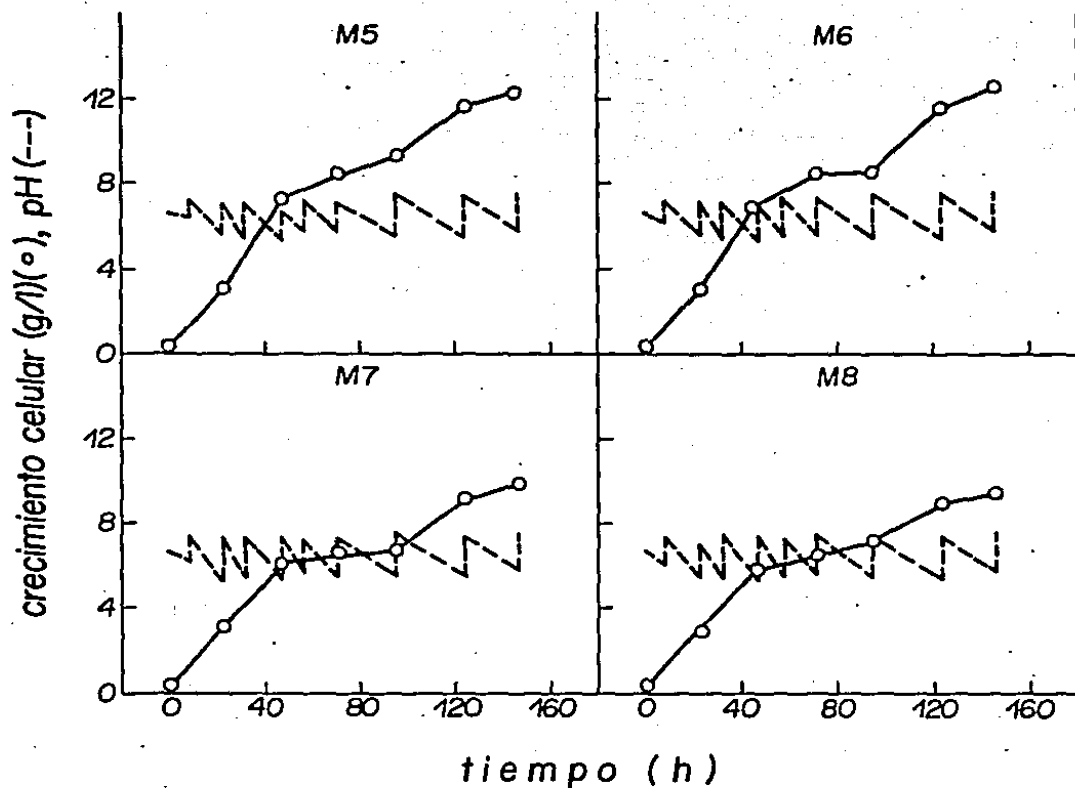


FIGURA 64B. Gráfica que Relaciona el Crecimiento de *E. shermanii* ATCC 13673, el pH durante todo el Curso de la Fermentación y la Producción de Vitamina B-12 a los 2 últimos Días de la Misma en un Medio a base de Glucosa. Experimentos del M5 al M8 Propuestos por los Resultados del Factorial 2^3 .

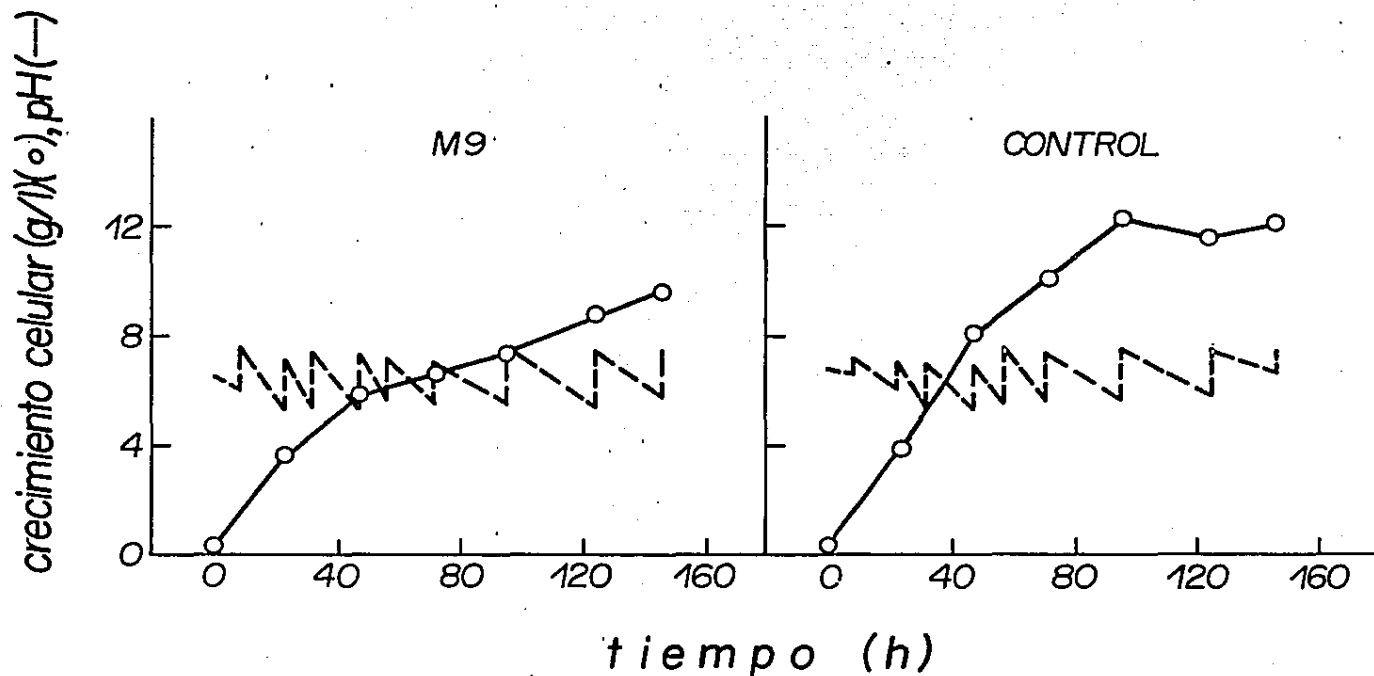


FIGURA 64C.

Gráfica que Relaciona el Crecimiento de P. shermanii ATCC 13673, el pH durante todo el Curso de la Fermentación y la Producción de Vitamina B-12 a los 2 últimos Días de la Misma en un Medio a base de Glucosa. Experimento M9 Propuesto por los Resultados del Factorial 2^3 y el Experimento Control.

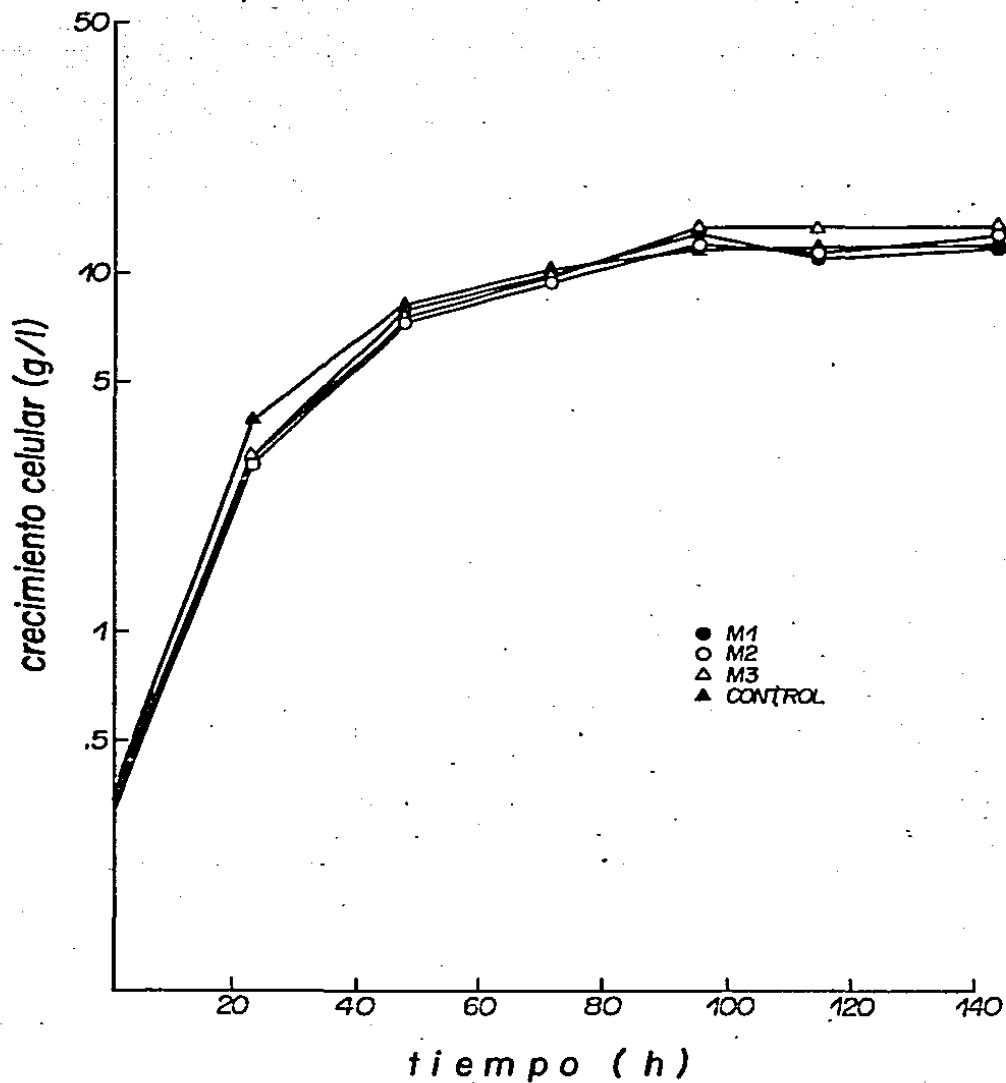


FIGURA 65A. Velocidades Específicas de Crecimiento (h^{-1}) de *P. shermanii* ATCC 13473 en Fermentaciones de 150 ml de Medio/Matriz de 250 ml en un Medio a base de Glucosa Propuestos por los Resultados del Factorial 2^3 . Experimentos M1, M2, M3 y el Control.

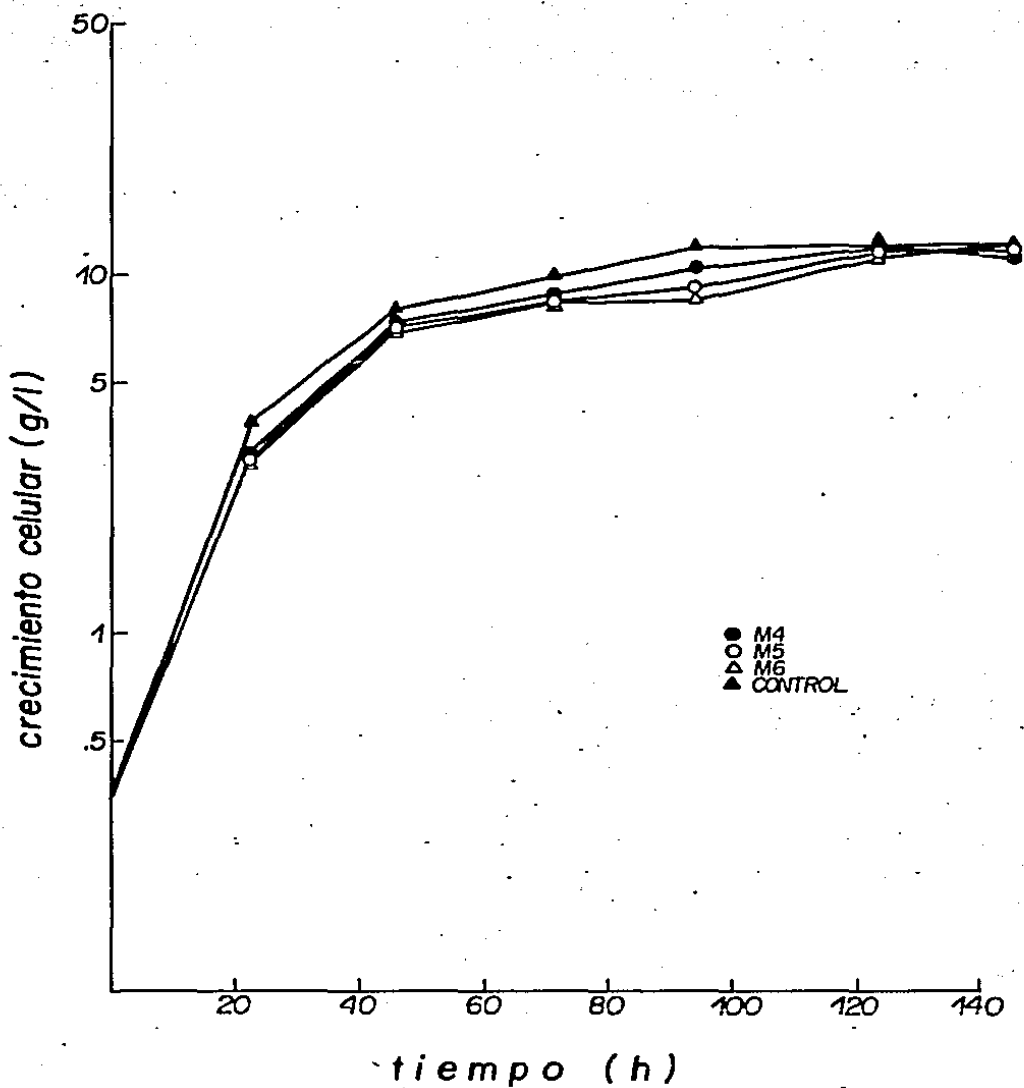


FIGURA 65B. Velocidades Especificas de Crecimiento (h^{-1}) de *P. shermanii* ATCC 13673 en Fermentaciones de 150 ml de Medio/Matraz de 250 ml en Medios a base de Glucosa Propuestos por los Resultados del Factorial 2^3 . Experimentos M4, M5, M6 y el Control.

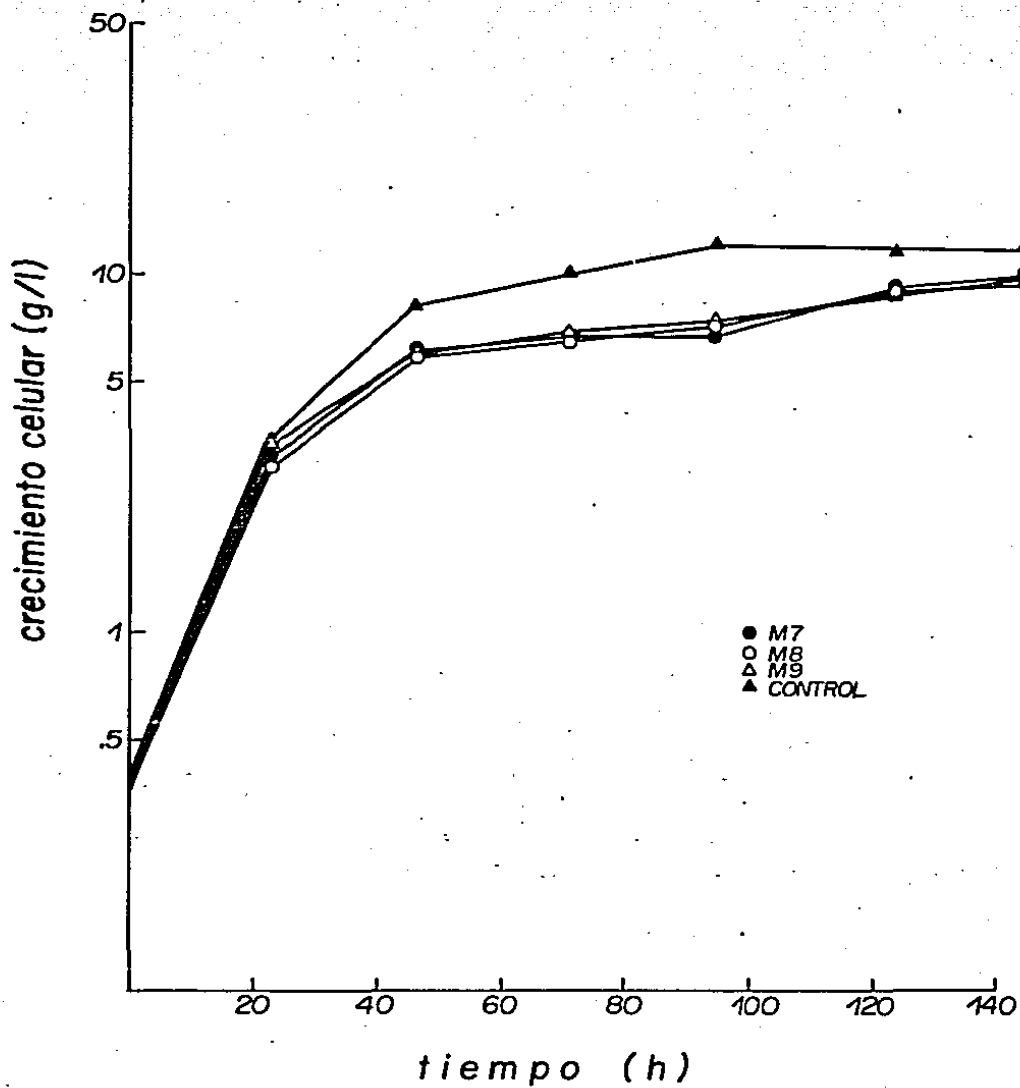


FIGURA 65C. Velocidades Especificas de Crecimiento (h^{-1}) de *P. shermanii* ATCC 13673 en Fermentaciones de 150 ml de Medio/Matraz de 250 ml en Medios a base de Glucosa Propuestos por los Resultados del Factorial 2^3 . Experimentos M7, M8, M9 y el Control.

TABLA XXX. RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS PROPUESTOS POR EL ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS DEL DISEÑO FACTORIAL 2^3 EN UN MEDIO CON GLUCOSA COMO FUENTE DE CARBONO.

TRATAMIENTO	TIEMPO (H)	CRECIMIENTO (g/l)		PRODUCCIÓN ($\mu\text{gB}_{12}/\text{l}$)		PRODUCCION ESPECIFICA ($\mu\text{gB}_{12}/\text{g}_{\text{cel}}$)		PRODUCTIVIDAD ($\mu\text{gB}_{12}/\text{lh}$)	
		124	146	124	146	124	146	124	146
1		10.98	11.89	6974.89	7688.33	635.24	646.46	56.25	52.66
2		11.29	12.73	7096.39	8152.67	628.44	640.68	57.23	55.84
3		13.29	13.85	7028.00	8777.35	528.82	633.74	56.68	60.12
4		11.47	10.97	7772.33	8306.67	677.39	757.42	62.68	56.90
5		11.35	11.94	7092.78	8029.00	624.80	672.39	57.20	55.00
6		11.19	12.19	7548.33	8402.33	674.38	689.28	60.87	57.55
7		8.81	9.52	6741.00	6921.33	764.98	726.73	54.36	47.41
8		8.61	9.15	6290.67	6687.33	730.96	730.70	50.73	45.80
9		8.43	9.19	6673.33	7513.33	791.31	817.64	53.82	51.46
CONTROL		11.35	11.78	7651.00	8425.67	673.92	715.37	61.70	57.71

primera y disminuir la concentración del segundo factor. Así mismo se mostró que el nitrógeno proporcionado por el agua de cocimiento de maíz a esta concentración, fué el límite inferior para emplearse bajo las condiciones de fermentación trabajadas, para alcanzar los incrementos que ya se mostraron anteriormente.

Para las primeras 6 fermentaciones el incremento de vitamina obtenida en este bloque de experimentos frente a la producida con el medio control no resultó ser significativo (empleando el método de Dunnet) (tabla _XXXI_), (ver anexo _5_); mientras que para los tratamientos 7, 8 y 9 el efecto presentado fué negativo. Lo cual indica que la concentración de nitrógeno ó de otras sustancias proporcionadas por el agua de cocimiento de maíz tuvieron mucho que ver en estos resultados.

En producción específica de este metabolito, el efecto fué también negativo para los medios 3, 4, 7, 8 y 9; así como para los crecimientos en algunos de los medios de fermentación. La explicación para estos resultados parece estar en la forma por la cual está funcionando el agua de cocimiento de maíz.

Con estos resultados se puede decir, que para obtener una buena producción de vitamina B-12, se pueden emplear los siguientes medios de fermentación: el 2 del Plackett-Burman, el 4 del factorial 2^3 y el 3 del último bloque de experimentos.

Se recomienda que para poder incrementar aún más la producción de vitamina B-12, se emplee otro tipo de diseño experimental ya que con los experimentos factoriales se ha llegado a su límite. También se debe de tomar en cuenta que se puede hacer uso de otras técnicas de procedimientos experimentales.

Los experimentos hasta aquí sugieren que siempre se aumente la cantidad de la fuente de carbono en el medio de fermentación; pero hay que tomar en cuenta que no se le debe adicionar toda la concentración de glucosa en un principio ya que inhibiría al microorganismo de trabajo. Por lo que se sugiere darsela dosificada sola ó complementada con la fuente de nitrógeno (ACM) y glicina en proporciones como las encontradas en estos experimentos.

TABLA XXXI. COMPARACION DE LOS RESULTADOS DE LOS TRATAMIENTOS DEL DISEÑO FACTORIAL 2³ CON RESPECTO AL EXPERIMENTO CONTROL POR MEDIO DEL METODO DE DUNNET.

t_D

TRATAMIENTO	TIEMPO (h)	CRECIMIENTO (g/l)		PRODUCCION (µg _{B12} /l)		PRODUCCION ESPECIFICA (µg _{B12} /g de cel.)	
		124	146	124	146	124	146
1		1.69	0.34	2.15	1.56	1.34	2.55
2		0.28	2.79*	1.76	0.58	1.62	(-) 2.75*
3		8.77**	6.10**	1.98	0.75	(-) 5.16**	(-) 2.97*
4		0.55	(-) 2.38*	0.39	0.25	0.12	1.53
5		0.006	0.48	1.78	0.84	1.75	1.60
6		0.72	1.20	0.33	0.05	0.02	0.95
7		(-) 11.50**	(-) 6.63**	(-) 2.89*	(-) 3.19*	(+) 3.24*	0.42
8		(-) 12.43**	(-) 7.73**	(-) 4.33**	(-) 3.69**	(+) 2.04	0.56
9		(-) 13.22**	(-) 7.61**	(-) 3.11*	1.94	(+) 4.17**	(+) 3.68**

* Significativo.

** Altamente significativo.

(-) Efecto negativo.

(+) Efecto positivo.

t_D α = 0.05; 10,2 = 2.57

t_D α = 0.01; 10,2 = 3.53

En los estudios de correlación entre los métodos de DNA y D.O. para la determinación de crecimiento microbiano se llegó a lo siguiente:

- Ambos métodos se correlacionaron cuando se empleó mezcla lítica para extraer el DNA de las células de *P. shermanii*.

- El volumen adecuado para la determinación del crecimiento microbiano por el método de DNA fueron de 2.0 y 2.5 ml de suspensión bacteriana, volúmenes que presentaron menor error experimental.

- El coeficiente de correlación (r^2) al emplear ambos métodos en la determinación de crecimiento microbiano durante el curso de una fermentación (130 ml de volumen de trabajo/matraz de 250 ml) empleando un medio a base de jugo cocido de limón (JCL) fué en promedio 0.99.

En las fermentaciones a base de JCL, se encontraron los siguientes resultados:

- La producción de vitamina B-12 fué menor al realizar la fermentación a niveles bajo (200 ml de volumen de trabajo/matraz de 250 ml) y alto de aeración (25 ml de volumen de trabajo/matraz de 250 ml).

- De los niveles de aeración estudiados (25, 75, 130 y 200 ml de volumen de trabajo/matraz de 250 ml), el nivel de 130/250 fué la condición donde se alcanzaron los mejores resultados: 5.2 mg/l en producción, 1034.2 $\mu\text{g/g}$ de cel. en producción específica y 54.70 $\mu\text{g/h}$ en productividad de vitamina B-12.

- Los resultados que se obtuvieron en las fermentaciones donde se probó concentración y tiempo de adición de glicina a un medio a base de JCL, fueron: 2.5 mg/l en producción de vitamina B-12 en el peor de los casos (casi en todas las condiciones probadas, figura 37) y entre 3.0 a 4.0 mg/l en producción de la misma en el mejor de los casos (cuando fué adicionado 10 mM de glicina a las 72 h de haber iniciado la fermentación). Estas últimas cantidades representan entre el 20 % y el 60 % de incremento en la producción de vitamina B-12 con respecto al obtenido en el experimento control (2.5 mg/l). Mientras que en producción específica de vitamina B-12, las cantidades que se obtienen están en el orden de 450 a 700 $\mu\text{g/g}$ de cel. en el peor de los casos (casi en todas las condiciones probadas, figura 37) y entre 800 y 1000 $\mu\text{g/g}$ de cel. en el mejor de los casos (cuando fué adicionado 10 mM de glicina a las 72 h de haber iniciado la fermentación). Estos

Últimos valores, representan el 31.25 % y el 35.0 % de incremento con respecto al control (550 a 650 $\mu\text{g/g}$ de cel.).

- Los resultados que se obtuvieron en las fermentaciones donde fué probada la concentración y tiempo de adición de cobalto a un medio de fermentación a base de JCL, fueron: de 1.0 a 3.0, 2.0 a 4.0 y de 3.8 a 4.8 mg/l en producción de vitamina, bajo las condiciones de 10 y 30/72; 20/48 y 30/24; y 10/24 (mg de cobalto adicionado/horas de iniciada la fermentación), respectivamente. Los incrementos estuvieron en el orden de 20 % al 92 % con respecto al producido en el experimento control (2.5 mg/l). Con lo que respecta a la producción específica de vitamina B-12: de 240 a 600, 440 a 850 y de 650 a 900 $\mu\text{g/g}$ de cel. fueron obtenidas bajo las condiciones de 10 y 30/72; 20/48 y 30/24; y 10/24 (mg de cobalto adicionado/horas de iniciada la fermentación), respectivamente. Incrementos en alguno de los casos entre el 9.3 % y el 38 % con respecto al obtenido en el experimento control (550 a 650 $\mu\text{g/g}$ de cel.).

- Es importante señalar que los valores más altos, señalados anteriormente fueron alcanzados a las 96 h de fermentación.

- Las concentraciones y tiempos de adición de los precursores glicina y cobalto deben ser disminuidos si se desea mejorar tanto la producción como la producción específica de esta vitamina.

- El análisis estadístico realizado a los resultados obtenidos en el factorial 2^2 con un punto central indicaron que la máxima producción y producción específica de vitamina B-12 que se podrían obtener al disminuir el factor tiempo de adición de glicina, serían respectivamente: 3.8 mg/l y 800 $\mu\text{g/g}$ de cel.. Un análisis similar indicó que la máxima producción y producción específica de vitamina B-12 que se podrían obtener al disminuir la concentración el tiempo de adición de cobalto, serían respectivamente: 7.0 mg/l y alrededor de 1200 $\mu\text{g/g}$ de cel..

En las fermentaciones con citrato de sodio, se encontró lo siguiente:

- El *Shermanii* ATCC 13673 no consume el citrato presente en el medio de fermentación.

- El citrato presente en los medios de fermentación parece tener un efecto inhibitorio sobre el crecimiento del microorganismo, ya que en los medios que lo contenían, la curva de crecimiento fué menor a la presentada donde el medio de cultivo estuvo constituido por ACM y por ACM y glucosa.

En las fermentaciones a base de glucosa, se llegaron a los siguientes resultados:

- De los precursores y/o sustancias probadas empleando un diseño experimental Plackett-Burman, la glicina a una concentración de 8.0 mM, fué el único factor que presentó efecto altamente significativo sobre las variables de respuesta cuantificadas (crecimiento, producción y producción específica de vitamina B-12).

- Los 8 medios de fermentación en el diseño experimental Plackett-Burman proporcionaron mejores resultados en comparación a los obtenidos en las fermentaciones control. Los incrementos anduvieron en el orden del 71 % en el peor de los casos y alrededor del 112 % en el mejor de los casos para producción de vitamina B-12. Mientras que para la producción específica de vitamina B-12 los incrementos fueron del 6.67 % y del 29.85 % en el peor y en el mejor de los casos, respectivamente.

- De los 8 experimentos del diseño Plackett-Burman, el medio de fermentación que proporcionó los mejores resultados para producción (6.5 mg/l), producción específica (859.07 μ g/g de cel.) y productividad (58.6 μ g/lh) de vitamina B-12; estuvo constituido por 33.0 g/l de glucosa, 3.15 g/l de nitrógeno (ACM), 8.0 mM de glicina, 8.0 ppm de cloruro de cobalto y empleando un volumen de 150 ml de medio contenidos en matraz de 250 ml.

- Con el diseño factorial 2^3 al probar los factores: concentración de glucosa, concentración de nitrógeno y concentración de glicina, se obtuvo un incremento (con respecto al mejor resultado del diseño Plackett-Burman) del 15 % (9.83 mg/l) en producción, 14 % (68.27 μ g/lh) en productividad sin haber presentado aumento en la producción específica (790.6 μ g/g de cel.) de vitamina B-12. Sin embargo, estos incrementos desde el punto de vista estadístico no fueron significativos; pero si se considera el alto valor comercial de este metabolito, el incremento presentado es verdaderamente importante.

- El análisis estadístico de los resultados obtenidos en el diseño factorial 2^3 , indicaron disminuir las concentraciones de nitrógeno y de glicina y aumentar la concentración de glucosa si se deseaba incrementar aún más la producción de esta vitamina.

- De los medios de fermentación conformados en base a los resultados del diseño factorial 2^3 , los mejores resultados se obtuvieron con la siguiente composición del medio de fermentación: 58.0 g/l de glucosa, 2.15 g/l de nitrógeno (ACM), 1.7 mM de glicina y 8.0 ppm de cloruro de cobalto. Dichos resultados fueron los siguientes: 8.77 mg/l, 633.74 μ g/g de cel. y 60.12 μ g/lh en producción, producción específica y en productividad de vitamina B-12, respectivamente; cantidades que no fueron superiores a los del experimento control: 8.43 g/l, 715 μ g/g de cel. y 57.70 μ g/lh en producción, producción específica y productividad de

vitamina B-12.

- Los últimos resultados obtenidos indicaron que se llegó al límite máximo tanto de las concentraciones de los constituyentes del medio de fermentación como la máxima producción que se puede obtener al emplearlo. Por lo que se recomienda realizar otros tipos de diseños experimentales ó estrategias técnicas de laboratorio si se desea que la producción de este metabolito se incremente aún más. Un tipo de estrategia técnica de laboratorio podría ser realizar fermentaciones a las cuales se le hagan adiciones de la fuente de carbono dado que fué el factor más importante a modificar siempre indicando que se debe de aumentar su concentración ya sea sola ó en combinación proporcional de la fuente de nitrógeno y de glicina.

- En general se puede decir, que mediante los estudios aquí presentados se pudo incrementar la producción de vitamina B-12 en el orden del 112 % (8.5 mg/l) con el diseño Plackett-Burman, del 146 % (9.83 mg/l) con el diseño factorial 2^3 y del 131 % (8.77 mg/l) con el medio conformado en base a los resultados del factorial 2^3 . Todos ellos comparados con las producciones obtenidas en la fermentación control (4.0 mg/l). En producción específica de vitamina B-12, haciendo la misma consideración que el anterior se tienen, en ese mismo orden: 43.3 % (859.09 μ g/g de cel.), del 31.76 % (790.6 μ g/g de cel) y del 5.6 % (633.74 μ g/g de cel.); con respecto al obtenido en la fermentación control (600 μ g/g de cel.). En productividad, haciendo la misma consideración se encontraron incrementos del: 154 % (58.6 μ g/lh), 252.8 % (66.27 μ g/lh) y del 122.22 % (60.12 μ g/lh) con respecto al experimento control (27.0 μ g/lh).

VIII. INTRODUCCION.

" D I S E Ñ O E X P E R I M E N T A L "

Diseño experimental, significa planear el experimento de tal forma que se reúna la información pertinente al problema bajo investigación; seguir un procedimiento para asegurar un análisis objetivo de los resultados experimentales que den lugar a inducciones válidas.

El experimento, es la selección de variables y las precauciones durante el muestreo ó generación específica de muestras en las poblaciones.

El factor es la variable a controlar por el investigador, con el objeto de evaluar su efecto sobre la variable de respuesta. A cada factor se le pueden asignar distintas clasificaciones, conocidas con el nombre de "niveles".

Tratamiento es la combinación específica de los niveles de dos ó más factores; es decir, el conjunto de condiciones experimentales.

La variable de respuesta es aquel parámetro que está sujeto a variaciones debido a los factores y al proceso de medición en el experimento.

Básicamente un experimento tiene como objetivo el comparar los valores de la media poblacional (μ) para un número de variantes estudiadas; esto es, la comparación del efecto de los tratamientos (t_i) en las medias poblacionales, debido a factores específicos.

Una unidad experimental es la entidad física independiente a la cual se le asigna un tratamiento.

De todo esto, se deriva que el diseño consiste en determinar el número de factores a estudiar así como los niveles de éstos, la combinación entre ellos y la asignación a las unidades experimentales.

El análisis estadístico de los resultados, se basa en el modelo empírico más adecuado para representar el efecto sobre las medias de las poblaciones estudiadas (las que se generan al variar los niveles de algunos factores); por lo que se dice que a cada diseño le corresponde un modelo y éste a su vez determina el análisis estadístico a utilizarse.

En los métodos clásicos para la optimización de procesos, mezclan la variación de uno de sus factores o niveles, manteniendo constantes todos los demás factores del proceso. Este supone que no existe interacción entre los factores, lo cual generalmente no se cumple y como consecuencia se pueden obtener conclusiones erróneas.

El método clásico normalmente abarca demasiados experimentos, con el fin de optimizar un proceso.

El concepto de optimización, generalmente se refiere a encontrar un valor ya sea máximo o mínimo, según fuere el caso para una función o condición en un proceso determinado.

Para evitar los métodos o procedimientos clásicos de optimización de un proceso, es importante seleccionar un método que proporcione las herramientas necesarias para el mejor entendimiento de los problemas a los que hay que enfrentarse en el proceso que se quiere optimizar.

Entre los métodos de optimización más comunes (tabla_A_), se encuentran los métodos estadísticos, los cuales son técnicas de experimentación organizadas que además de reducir el tiempo empleado, aportan datos para poder hacer predicciones del comportamiento del sistema en base a los factores estudiados.

En estos métodos se elabora un modelo empírico del fenómeno en estudio, mediante un diseño determinado. Generalmente se basa en una variación simultánea de todos los factores del proceso, permitiendo de esta manera estimar la interacción de variables con un número reducido de experimentos.

Mediante el diseño experimental se busca una estrategia con la cual se tenga un modelo adecuado, con un mínimo de experimentos. Los diseños factoriales son los más adecuados, debido a su simplicidad en el análisis.

En un diseño factorial se fijan ciertos niveles para dos o más factores, los cuales pueden variar de un experimento a otro. Si se emplearían todos los tratamientos posibles, se trataría de un diseño factorial completo y por el contrario si no se evaluarán algunos de los tratamientos, se estaría trabajando con un diseño factorial incompleto.

Dentro de los diseños factoriales, los más importantes son aquellos que emplean dos niveles. En este tipo de diseño, se presenta un nivel superior (+1) y un nivel inferior (-1), con lo cual se tiene un modelo ortogonal. Todos los posibles tratamientos se calculan mediante la ecuación 2^k , donde: el 2 significa dos niveles del factor y k el número de factores a manejar en el experimento.

Por ejemplo, el modelo de regresión 2^2 :

TABLA A METODOS DE OPTIMIZACION UTILIZADOS EN LA INGENIERIA QUIMICA

<u>METODO</u>	<u>APLICACION</u>
<u>Métodos Analíticos</u>	
Optimización por búsqueda directa por el extremo	Procesos determinísticos descritos por funciones diferenciables.
Método de los múltiplos de Lagrangian.	Procesos determinísticos descritos por funciones diferenciables con constraints diferentes.
Cálculo de variaciones	Criterio preformado en la forma de funcionales. Solución de ecuaciones de Euler. Reactores adiabáticos multipa, condiciones de temperatura óptima para aereaciones exotérmicas reversibles en lechos de flujo tapón, condiciones de temperatura óptima para reacciones químicas en el caso de el rango de temperatura, etc.
Principio de Maximidad de Pontryagin	Amplio rango de problemas especialmente en control automático.
<u>Programación Matemática</u>	
Programación Geométrica	Optimización de funciones algebraicas.
Programación Lineal	Manufactura de productos por máximo retorno de diferentes materias primas. Utilización óptima de equipo. Problema de transporte.
Programación Dinámica	Procesos multietapa, Destilación extracción, etc.
<u>Métodos de Gradiente</u>	
Todas las formas	Optimización de funciones lineales y no-lineales con y sin solución lineales y no-lineales. Procesos de ingeniería química complejos.
<u>Optimización por Control de Computadora y Adaptación del Modelo</u>	
Todas las formas	Sistemas de ingeniería química complejos.
<u>Optimización Estadística</u>	
Análisis de Regresión	Sistema no determinístico.
Análisis de correlación: Método de Brandon, Método de Box-Wilson, etc.	Optimización experimental y diseño.

$$\hat{Y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 + E$$

al cual se llega al finalizar el análisis de resultados, se pueden estimar las interacciones entre los factores así como sus efectos.

Una vez obtenido el modelo, la(s) variable(s) de respuesta pueden ser graficadas dentro de los niveles de los factores que presentan efecto.

Los diseños factoriales presentan las siguientes ventajas:

- 1) Son diseños experimentales aplicables para el estudio del efecto de dos ó más variables.
- 2) Son fáciles de diseñar y analizar.
- 3) Al ser balanceados cualquier error experimental sistemático tiende a eliminarse.
- 4) Los ejes de regresión (columnas de niveles de cada factor) son ortogonales.
- 5) Se ahorra tiempo y se reduce el tiempo de experimentación.

Dentro de sus desventajas se tiene:

- 1) Si los niveles inferior y superior no se eligen correctamente, pueden tenerse dos inconvenientes: si el rango de trabajo es muy pequeño, el error experimental no puede detectar el efecto de las variables, si el rango es muy grande el modelo no se cumple.

En la optimización y/o diseños de procesos dentro de la industria, se requiere considerar un gran número de factores; por lo que siempre se desea emplear un método en el cual puedan ser considerados y seleccionados los factores más importantes para mejorar ese proceso y poder hacer sobre éstos, estudios más detallados. Uno de esos métodos es el diseño Plackett-Burman que por sus características de eficiencia y fácil estructura, puede aplicarse para la selección de variables a optimizar. Dicho método se basa en un factorial incompleto desbalanceado elaborándose una matriz, mediante combinaciones maestras de niveles. Estas combinaciones, básicamente sugieren diseños para 8, 12, 16, 20, 25 y hasta 100 experimentos. Los más importantes son los 5 primeros; empleándose cada uno para estudiar N-1 factores. De esta manera el diseño para 8 experimentos es disponible para estudiar 7 factores. Si se presenta el caso de no tener completos los factores, pueden emplearse factores falsos, llamados dummies.

ANALISIS DE COVARIANZA

Un aspecto importante durante el desarrollo del presente trabajo fué utilizar un método rápido y sencillo para determinar el crecimiento microbiano durante el curso de una fermentación.

El método de densidad óptica es un método rápido y sencillo en comparación con el método de DNA, el cual se ha demostrado como método confiable. Si ambos métodos son equivalentes es de esperarse que estén correlacionados y que su correlación sea independiente de la corrida de fermentación. Para demostrar su equivalencia se planeó determinar la cinética de crecimiento en varias fermentaciones empleando ambos métodos, lo que dió lugar a la siguiente matriz de tratamientos:

FERMENTACION	TIEMPO	CRECIMIENTO CELULAR	
		DNA	D.O.
1	t	x	y
	0	10	10
	t	x	y
	1	11	11
	t	x	y
	2	12	12
	:	:	:
:	:	:	
t	x	y	
6	16	16	
2	t	x	y
	0	20	20
	t	x	y
	1	21	21
	t	x	y
	2	22	22
	:	:	:
:	:	:	
t	x	y	
6	26	26	
3	t	x	y
	0	30	30
	t	x	y
	1	31	31
	t	x	y
2	32	32	

:	:	:
:	:	:
t	x	y
6	36	36

Si ambos metodos son equivalentes, se espera que los modelos de regresión en cada fermentación sean equivalentes.

El análisis estadístico que permite determinar la equivalencia de los modelos es el análisis de covarianza (Ostle, B. 1979, cap. 8 sección 8.26), el cual se describe a continuación:

Dadas varias muestras ó grupos de regresiones ($Y = b_0 + b_1 x_i$) de dos variables (x,y) obtenidas de manera independiente, se plantea la siguiente pregunta: ¿puede usarse una misma línea de regresión para todos los datos?. Preguntas más específicas serían:

1- ¿Puede usarse una ecuación de regresión para todas las observaciones?

$$b_{01} + b_{11} x = b_{02} + b_{12} x$$

empleando el siguiente cálculo:

$$F_{cal} = \frac{[(S_T - S_1) / 2(k-1)]}{\frac{k}{[S_1 / \sum_{i=1}^k n_i - 2k]}}$$

si el valor de "F" resulta ser significativo, es necesario determinar cual coeficiente de regresión es diferente de los modelos.

2- Para determinar si $H_0: b_{11} = b_{12}$ (donde H_0 es la hipótesis que se plantea), se efectúa el siguiente cálculo:

$$F_{cal} = \frac{S_2 / (k-1)}{S_1 / (\sum_{i=1}^k n_i - 2k)}$$

Si el valor de "F" resulta ser significativo, la diferencia en los modelos radica en b_{oi} .

La mayoría de los cálculos se presentan en la tabla_A_.

Donde:

$$A = \sum_{i=1}^{ni} x_{ij}^2 - \frac{(\sum_{j=1}^{ni} x_{ij})^2}{ni}$$

$$B = \sum_{i=1}^{ni} x_{ij} y_{ij} - \frac{(\sum_{j=1}^{ni} x_{ij})(\sum_{j=1}^{ni} y_{ij})}{ni}$$

$$C = \sum_{i=1}^{ni} y_{ij}^2 - \frac{(\sum_{j=1}^{ni} y_{ij})^2}{ni}$$

$$A_T = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{ni} x_{ij}^2 - \frac{(\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{ni} x_{ij})^2}{\sum_{i=1}^k ni}$$

$$B_T = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{ni} x_{ij} y_{ij} - \frac{(\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{ni} x_{ij})(\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{ni} y_{ij})}{\sum_{i=1}^k ni}$$

$$C_T = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{ni} y_{ij}^2 - \frac{(\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{ni} y_{ij})^2}{\sum_{i=1}^k ni}$$

TABLA A . Cálculos para probar varias hipótesis acerca de los coeficientes de regresión

Grupo	Grados de libertad	Σx^2	Σxy	Σy^2	$\Sigma y^2 - (\Sigma xy)^2 / \Sigma x^2$	Grados de libertad	Cuadro medio
1.....	$n_1 - 1$	A_1	B_1	C_1	$C_1 - B_1^2/A_1$	$n_1 - 2$
2.....	$n_2 - 1$	A_2	B_2	C_2	$C_2 - B_2^2/A_2$	$n_2 - 2$
.....
k.....	$n_k - 1$	A_k	B_k	C_k	$C_k - B_k^2/A_k$	$n_k - 2$
Dentro de grupos	$\sum_{i=1}^k n_i - k$	$A_w = \sum_{i=1}^k A_i$	$B_w = \sum_{i=1}^k B_i$	$C_w = \sum_{i=1}^k C_i$	$S_1 = \sum_{i=1}^k C_i - \frac{B_w^2}{A_w}$ $S_1 + S_2 = C_w - B_w^2/A_w$	$\sum_{i=1}^k n_i - 2k$	$S_1 / \left(\sum_{i=1}^k n_i - 2k \right)$
Entre grupos	$k - 1$	$A_u = A_T - A_w$	$B_u = B_T - B_w$	$C_u = C_T - C_w$	$S_2 = C_u - B_u^2/A_u$	$\sum_{i=1}^k n_i - k - 1$	$(S_1 + S_2) / \left(\sum_{i=1}^k n_i - k - 1 \right)$
Total	$\sum_{i=1}^k n_i - 1$	A_T	B_T	C_T	$S_T = C_T - B_T^2/A_T$	$\sum_{i=1}^k n_i - 2$

S_2 = Suma de cuadrados entre los coeficientes de regresión de la késima muestra. Expresa la cantidad de variación entre b_{01} , b_{02} .

S_2 = Suma de cuadrados de las desviaciones de las medias "y" a partir de la regresión de las medias "y" en las medias "x".

El análisis realizado a los resultados obtenidos en los experimentos de correlación se muestran en las tablas VIII, XIV y XV correspondientes a la sección VI en el texto de resultados y discusión.

Otro aspecto importante en el trabajo experimental fué el de determinar la influencia del día (reproducibilidad) sobre la curva de calibración del contenido de DNA con diferentes cantidades de suspensión bacteriana, lo cual implicó determinar si los modelos de regresión en los distintos días eran equivalentes o no. Por lo tanto, se aplicó el mismo análisis descrito en este anexo (tabla XI correspondiente a la sección VI en el texto de resultados y discusión).

ANALISIS DE LA VARIANZA

En la selección del mejor método para romper células de *E. shermanii*, así como en la selección del volumen adecuado de mezcla lítica para lograr una extracción eficiente del DNA, fué necesario emplear un método estadístico que permitiera indicar si los factores estudiados presentan un efecto significativo o no. El método de análisis empleado en este caso fué el del análisis de la varianza.

Para emplearse el análisis de varianza con fines de deducción estadística deben hacerse ciertas suposiciones respecto a las observaciones. En general las suposiciones básicas del análisis de varianza son las mismas que las comúnmente asociadas con el análisis de regresión. Estas son: de aditividad, linealidad, normalidad, independencia y varianzas homogéneas. Esto es, el modelo estadístico más frecuentemente supuesto en aplicaciones de análisis de varianza es un modelo lineal al cual se añaden algunas restricciones acerca de las observaciones independientes de distribuciones normales (Ostle, B. 1977, cap. 11).

Este mismo procedimiento de análisis fué de gran ayuda para determinar el efecto del volumen de suspensión bacteriana y el efecto de la toma de muestra, así como del día en que se realice la cuantificación del DNA y de las replicaciones realizadas.

El análisis de varianza es el método comúnmente empleado para determinar si son o no significativos los efectos de los factores sobre la variable de respuesta que se desea estudiar. Para lo cual es necesario establecer un modelo matemático de tipo lineal que represente la situación experimental.

A continuación se resumen para cada uno de los casos donde fué empleado dicho análisis, los siguientes pasos: modelo, matriz de tratamientos y la tabla de análisis de la varianza (anadeva).

1.- Efecto del método de extracción del DNA en células de *E. shermanii*.

Modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + M_i + T_j + MT_{ij} + E_{k(ij)}$$

Donde:

Y_{ijk} = Valor de la variable de respuesta (absorbancia a 600 nm) asociado a la k ésima replicación del j ésimo tiempo de fermentación en el i ésimo método de extracción.

μ = Media poblacional.

M_i = Efecto del i ésimo método de extracción sobre la variable de respuesta. $i = 1...2$

T_j = Efecto del j ésimo tiempo de fermentación sobre la variable de respuesta. $j = 1...3$

MT_{ij} = Efecto de la interacción método de extracción-tiempo de fermentación sobre la variable de respuesta.

$E_{k(ij)}$ = Error experimental. $k = 1...3$

Matriz de tratamientos.

TIEMPO (T) j	METODO (M) i		
	TCA 10%	TCA 20%	SDS
t_4	Y111	Y211	Y311
	Y112	Y212	Y312
	⋮	⋮	⋮
	Y11r	Y21r	Y31r
t_5	Y121	Y221	Y321
	Y122	Y222	Y322
	⋮	⋮	⋮
	Y12r	Y22r	Y32r

Tabla de ANADEVIA

Fuente de Variación (F.V.)	Grados de Libertad (gl)	Suma de Cuadrados (SC)	Media Cuadrática (MC)	Fcal	
M _i	a-1	$\sum_{i=1}^a 2 Y_{i..}$ ----- br	2 (2) Y...	SC / gl M	MC / MC M E
T _j	b-1	$\sum_{j=1}^b 2 Y_{.j}$ ----- ar	(3) ----- (2)	SC / gl T	MC / MC M E
MT _{ij}	(a-1)(b-1)	$\sum_{j=1}^b \sum_{i=1}^a 2 Y_{ij}$ ----- r	(4) ----- (1) ----- (3) + (2)	SC / gl MT	MC / MC MT E
E _{k(ij)}	(n-1)ab	$\sum_{k=1}^r \sum_{j=1}^b \sum_{i=1}^a 2 Y_{ijk}$ - (4)		SC / gl	

La tabla _IX_ sección Vib correspondiente al texto de resultados y discusión, resume los resultados obtenidos.

2.- Efecto de la cantidad de mezcla litica en la extracción del DNA de células de *E. shermanii*.

Modelo.

$$Y_{ijklm} = \mu + C_i + V_j + T_k + CV_{ij} + CT_{ik} + VT_{jk} + CVT_{ijk} + M_{l(ijk)} + E_{m(ijkl)}$$

Donde:

Y_{ijklm} = Valor de la variable de respuesta (absorbancia a 600 nm) asociado a la m ésima replicación de la i ésima alícuota del k ésimo tiempo de fermentación en el j ésimo volumen de suspensión bacteriana en la i ésima cantidad de mezcla lítica.

μ = Media poblacional.

C_i = Efecto de la i ésima cantidad de mezcla lítica sobre la variable de respuesta. $i = 1...2$ (3 ml y 5.5 ml).

V_j = Efecto del j ésimo volumen de suspensión bacteriana sobre la variable de respuesta. $j = 1...2$ (0.5 ml y 1.5 ml).

T_k = Efecto del k ésimo tiempo de fermentación sobre la variable de respuesta. $k = 1...3$ (t_0 , t_1 y t_2).

CV_{ij} = Efecto debido a la interacción cantidad de mezcla lítica - volumen de suspensión bacteriana sobre la variable de respuesta.

CT_{ik} = Efecto debido a la interacción cantidad de mezcla lítica - tiempo de fermentación sobre la variable de respuesta.

VT_{jk} = Efecto debido a la interacción volumen de suspensión bacteriana - tiempo de fermentación sobre la variable de respuesta.

CVT_{ijk} = Efecto debido a la interacción cantidad de mezcla lítica - volumen de suspensión bacteriana - tiempo de fermentación sobre la variable de respuesta.

$M_{l(ijkl)}$ = Efecto de la l ésima replicación de suspensión bacteriana sobre la variable de respuesta, $l = 1..2$ Muestra (replicación de suspensión bacteriana).

$E_{m(ijkl)}$ = Error experimental. $m = 1...3$ replicación de muestra.

Matriz de tratamientos.

		VOLUMEN DE SUSPENSION BACTERIANA (Vi)	CANTIDAD DE SDS (Ci)			
			3 ml		5 ml	
			0.5 ml	1.5 ml	0.5 ml	1.5 ml
TIEMPO (Tk)	MUESTRA (M1)		Y11111	Y12111	Y21111	Y22111
			:	:	:	:
		A	Y1111r	Y1211r	Y2111r	Y2211r
t0	B		Y11121	Y12121	Y21121	Y22121
			:	:	:	:
			Y1112r	Y1212r	Y2112r	Y2212r
t1	A		Y11211	Y12211	Y21211	Y22211
			:	:	:	:
			Y1121r	Y1221r	Y2121r	Y2221r
t1	B		Y11221	Y12221	Y21221	Y22221
			:	:	:	:
			Y1122r	Y1222r	Y2122r	Y2222r
t2	A		Y11311	Y12311	Y21311	Y22311
			:	:	:	:
			Y1131r	Y1231r	Y2131r	Y2231r
t2	B		Y11321	Y12321	Y21321	Y12321
			:	:	:	:
			Y1132r	Y1232r	Y2132r	Y1232r

Tabla de ANADEVVA.

F.V.	gl	SC	MC	Fcal
C _i	a-1	$\sum_{i=1}^a Y_i \dots$ <hr/> bcdr	$\frac{2}{Y \dots}$ <hr/> abcdr	$\frac{SC}{C} / g1$ $\frac{MC}{C} / MC$ M
V _j	b-1	$\sum_{j=1}^b Y_{.j} \dots$ <hr/> acdr	$\frac{2}{V}$ <hr/> (2)	$\frac{SC}{V} / g1$ $\frac{MC}{V} / MC$ M
T _k	c-1	$\sum_{k=1}^c Y_{..k} \dots$ <hr/> abdr	$\frac{2}{T}$ <hr/> (2)	$\frac{SC}{T} / g1$ $\frac{MC}{T} / MC$ M
CV _{ij}	(a-1)(b-1)	$\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b Y_{ij} \dots$ <hr/> cdr	$\frac{2}{CV}$ <hr/> (1) - - (3) + (2)	$\frac{SC}{CV} / g1$ $\frac{MC}{CV} / MC$ M
CT _{ik}	(a-1)(c-1)	$\sum_{i=1}^a \sum_{k=1}^c Y_{i.k} \dots$ <hr/> bdr	$\frac{2}{CT}$ <hr/> (1) - - (4) + (2)	$\frac{SC}{CT} / g1$ $\frac{MC}{CT} / MC$ M
VT _{jk}	(b-1)(c-1)	$\sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^c Y_{.jk} \dots$ <hr/> adr	$\frac{2}{VT}$ <hr/> (3) - - (4) + (2)	$\frac{SC}{VT} / g1$ $\frac{MC}{VT} / MC$ M

$$\begin{array}{l}
 \text{CVT}_{ijk} \quad \frac{(a-1)(b-1)}{(c-1)} \quad \frac{a}{\sum_{i=1}^a} \quad \frac{b}{\sum_{j=1}^b} \quad \frac{c}{\sum_{k=1}^c} \quad \frac{2}{r} \quad (8) \\
 \text{-----} \quad \text{-----} \quad \text{-----} \quad \text{-----} \quad \text{-----} \quad \text{-----} \\
 \text{SC /gl} \quad \text{MC /gl} \\
 \text{CVT} \quad \text{CVT} \quad \text{M} \\
 \text{-----} \quad \text{-----} \quad \text{-----} \\
 \text{(5)} \quad \text{-----} \\
 \text{dr} \\
 \text{-----} \\
 \text{(6)} \quad \text{-----} \quad \text{(7)} \quad \text{-----} \quad \text{(1)} \quad \text{-----} \quad \text{(3)} \quad \text{-----} \quad \text{(4)} \quad \text{-----} \quad \text{(2)}
 \end{array}$$

$$\begin{array}{l}
 \text{M}_1 \quad \frac{(d-1)abc}{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^c} \quad \frac{a}{\sum_{i=1}^a} \quad \frac{b}{\sum_{j=1}^b} \quad \frac{c}{\sum_{k=1}^c} \quad \frac{d}{\sum_{l=1}^d} \quad \frac{2}{r} \quad (9) \\
 \text{-----} \quad \text{-----} \quad \text{-----} \quad \text{-----} \quad \text{-----} \quad \text{-----} \\
 \text{SC /gl} \quad \text{MC /MC} \\
 \text{M} \quad \text{M} \quad \text{E} \\
 \text{-----} \quad \text{-----} \quad \text{-----} \\
 \text{(8)} \quad \text{-----} \\
 \text{r}
 \end{array}$$

$$\begin{array}{l}
 \text{E}_{m(ijkl)} \quad \frac{(r-1)}{(abcd)} \quad \frac{a}{\sum_{i=1}^a} \quad \frac{b}{\sum_{j=1}^b} \quad \frac{c}{\sum_{k=1}^c} \quad \frac{d}{\sum_{l=1}^d} \quad \frac{r}{\sum_{m=1}^r} \quad \frac{2}{r} \\
 \text{-----} \quad \text{-----} \quad \text{-----} \quad \text{-----} \quad \text{-----} \quad \text{-----} \\
 \text{SC /gl} \\
 \text{E} \\
 \text{-----} \\
 \text{(9)}
 \end{array}$$

La tabla X correspondiente a la sección Vic del texto de resultados y discusión se resume los resultados obtenidos al emplear este método de análisis.

3.- Efecto del volumen de suspensión bacteriana y toma de muestra sobre el contenido de DNA en células de P. shermanii. Este análisis se realizó para cada uno de los volúmenes de suspensión bacteriana.

Modelo.

$$Y_{ijk} = \mu + D_i + L_{j(i)} + E_{k(ij)}$$

Donde:

Y_{ijk} = Valor de la variable de respuesta (absorbancia a 600 nm) de la k ésima replicación en la j ésima toma de muestra del i ésimo día de cuantificación.

μ = Media poblacional.

D_i = Efecto de i ésimo día de cuantificación sobre la variable de respuesta. $i = 1...3$

$L_{j(i)}$ = Efecto de la j ésima toma de muestra anidado en el i ésimo día de cuantificación sobre la variable de respuesta. $j = 1...3$

E = Error experimental. k = 1...3
 k(ij)

Matriz de Tratamientos.

TOMA DE MUESTRA (L) j(i)	DIA DE CUANTIFICACION (Di)		
	1	2	3
1	Y111	Y211	Y311
	:	:	:
	Y11r	Y21r	Y31r
2	Y121	Y221	Y321
	:	:	:
	Y12r	Y22r	Y32r
3	Y131	Y231	Y331
	:	:	:
	Y13r	Y23r	Y33r

Tabla de ANADEVA.

F.V.	gl	SC	MC	Fcal	
D i	(a-1)	$\sum_{i=1}^a 2 \quad (1)$ Yi..	2 (2) Y...	SC /gl D	MC /MC D L
		br	abr		
L j(i)	(b-1)a	$\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b 2 \quad (3)$ Yij.	(1)	SC /gl L	MC /MC L E
		r			

$$E_{k(ij)} = (r-1)ab \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^r Y_{ijk} - (3) \quad \frac{SC}{g1} \\ E$$

En la tabla XII correspondiente a la sección Vid en el texto de resultados y discusión se muestran los resultados logrados en este experimento.

4.- Efecto del día de cuantificación, efecto del volumen de suspensión bacteriana y efecto de las replicaciones anidado en los dos primeros.

Modelo.

$$Y_{ijk1} = \mu + D_i + V_j + VD_{ij} + L_{k(ij)} + E_{1(ijk)}$$

Donde:

Y_{ijk1} = Valor de la variable de respuesta (absorbancia a 600 nm) asociado a la l ésima replicación de la k ésima toma de muestra anidado en el j ésimo volumen de suspensión bacteriana y en el i ésimo día de cuantificación.

μ = Media poblacional.

D_i = Efecto del i ésimo día de cuantificación sobre la variable de respuesta. $i = 1...3$

V_j = Efecto del j ésimo volumen de suspensión bacteriana sobre la variable de respuesta. $j = 1...6$

VD_{ij} = Efecto debido a la interacción día de cuantificación - volumen de suspensión bacteriana sobre la variable de respuesta.

$L_{k(ij)}$ = Efecto de la k ésima toma de muestra anidado en el j ésimo volumen de suspensión bacteriana y en el i ésimo día de cuantificación. $k = 1...3$

$E_{1(ijk)}$ = Error experimental. $l = 1...3$

Matriz de Tratamientos.

(L k(ij))		DIA DE CUANTIFICACION (Di)								
		1			2			3		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C
V j	Y1111	Y1211	Y1311	Y2111	Y2211	Y2311	Y3111	Y3211	Y3311	
	Y1112	Y1212	Y1312	Y2112	Y2212	Y2312	Y3112	Y3212	Y3312	
	:	:	:	:	:	:	:	:	:	
0.5	Y111r	Y121r	Y131r	Y211r	Y221r	Y231r	Y311r	Y321r	Y331r	
1.0	Y1121	Y1221	Y1321	Y2121	Y2221	Y2321	Y3121	Y3221	Y3321	
	Y1122	Y1222	Y1322	Y2122	Y2222	Y2322	Y3122	Y3222	Y3322	
	Y112r	Y122r	Y132r	Y212r	Y222r	Y232r	Y312r	Y322r	Y332r	
1.5	Y1131	Y1231	Y1331	Y2131	Y2231	Y2331	Y3131	Y3231	Y3331	
	Y1132	Y1232	Y1332	Y2132	Y2232	Y2332	Y3132	Y3232	Y3332	
	Y113r	Y123r	Y133r	Y213r	Y223r	Y233r	Y313r	Y323r	Y333r	
2.0	Y1141	Y1241	Y1341	Y2141	Y2241	Y2341	Y3141	Y3241	Y3341	
	Y1142	Y1242	Y1342	Y2142	Y2242	Y2342	Y3142	Y3242	Y3342	
	Y114r	Y124r	Y134r	Y214r	Y224r	Y234r	Y314r	Y324r	Y334r	
2.5	Y1151	Y1251	Y1351	Y2151	Y2251	Y2351	Y3151	Y3251	Y3351	
	Y1152	Y1252	Y1352	Y2152	Y2252	Y2352	Y3152	Y3252	Y3352	
	Y115r	Y125r	Y135r	Y215r	Y225r	Y235r	Y315r	Y325r	Y335r	
3.0	Y1161	Y1261	Y1361	Y2161	Y2261	Y2361	Y3161	Y3261	Y3361	
	Y1162	Y1262	Y1362	Y2162	Y2262	Y2362	Y3162	Y3262	Y3362	
	Y116r	Y126r	Y136r	Y216r	Y226r	Y236r	Y316r	Y326r	Y336r	

Tabla de ANADEVVA.

F.V.	gl	SC	MC	Fca:
D i	a-1	$\sum_{i=1}^a Y_i \dots$ (1)	$\frac{SC}{g1}$ D	$\frac{MC}{MC}$ D L
		bc _r	ab _c	
V j	b-1	$\sum_{j=1}^b Y_{.j} \dots$ (3)	$\frac{SC}{g1}$ V	$\frac{MC}{MC}$ V L
		acr	(2)	
VD ij	(a-1)(b-1)	$\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b Y_{ij} \dots$ (4)	$\frac{SC}{g1}$ VD	$\frac{MC}{MC}$ VD L
		cr	(1) - - (3) + (2)	
L k(ij)	(c-1)ab	$\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^c Y_{ijk} \dots$ (5)	$\frac{SC}{g1}$ L	$\frac{MC}{MC}$ L
		r	(4)	
E l(ijk)	(r-1)abc	$\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^c \sum_{r=1}^r \dots$ (5)	$\frac{SC}{g1}$ E	

La tabla_XIII_ correspondiente a la sección Vid en el texto de resultados y discusión muestra la significancia de cada factor sobre la variable de respuesta.

PROCEDIMIENTO DE CALCULO PARA DETERMINAR TIEMPO DE ADICION Y CONCENTRACION DE LOS PRECURSORES GLICINA Y COBALTO EMPLEANDO UN DISEÑO FACTORIAL 2² CON UN PUNTO CENTRAL (Box, G. et al. 1978).

El objetivo que se persiguió al emplear este diseño factorial fue determinar la concentración y/o el tiempo de adición de los precursores glicina y cobalto (estudiados por separado) para incrementar la producción de vitamina B-12 al ser fermentado un medio de cultivo a base de jugo cocido de limón por el microorganismo *E. shermanii* ATCC 13673.

El análisis se realizó sobre las variables de respuesta:

- a) Producción de vitamina B-12 (µg/l).
- b) Producción específica de vitamina B-12 (µg/g de célula).

El procedimiento de cálculo que se emplea es similar al que se realiza en un factorial 2² con la diferencia de que para el cálculo de la media cuadrática del error (MCE) en vez de tomar en cuenta cuatro tratamientos, se toman los 5 tratamientos originales de la matriz experimental. Además, en este tipo de diseños se prueban tanto el efecto lineal como el efecto cuadrático del modelo con el objeto de estimar los efectos y representar la variable de respuesta en relación de un modelo empírico que permitiera analíticamente describir la relación entre las variables.

Para el cálculo se consideran los siguientes puntos:

1) Modelo

$$Y = B_0 + B_1 x_1 + B_2 x_2 + B_{12} x_1 x_2 + E$$

donde:

Y = Variable de respuesta, producción ó producción específica de vitamina B-12.

E = Término independiente.

B₀ y B₁ y B₂ = Coeficientes de regresión asociados respectivamente a los factores que presentan efecto principal (x₁ y x₂).

B₁₂ = Coeficiente de regresión asociado a la interacción al combinar los efectos de los dos factores (x₁ y x₂).

E = Error experimental.

2) Matriz y Codificación de Tratamientos.

		x 1 (A)		
		a 0	a 1	a 2
b 0	Y001			Y201
	Y002			Y202
	: Y00.			: Y20.
	: Y00r (1)			: Y20r (a)
x (B) 2	b 1		Y111 Y112 : Y11. : Y11r	
	b 2	Y021		Y221
		Y022		Y222
		: Y02.		: Y22.
		: Y02r (b)		: Y22r (ab)

A = C = Concentración del precursor.
 B = T = Tiempo de adición del precursor.
 r = Replicación.

Los subíndices de "Y" indican de izquierda a derecha el nivel en que se encuentran los factores A y B. El número que se encuentra al final del subíndice de "Y" es el número de replicación. El punto después de los dos primeros números del subíndice de "Y" significa la cantidad total que resulta al sumar las replicaciones en cada uno de los tratamientos.

3) Matriz de Tratamientos. Para los resultados de producción de vitamina B-12.

En este caso para explicar el procedimiento de cálculo, se tomará como ejemplo los resultados que provienen del tiempo 4 (96 h) de fermentación:

		A		
		a ₀	a ₁	a ₂
B	bo	4788.670		4498.667
		4791.111		3999.333
		9779.781		8498.000
			3738.000	
			3840.000	
	b ₁		7578.000	
		2963.333		2674.000
	b ₂	2730.000		2440.667
		5693.333		5114.667

4) Tabla de coeficientes de contrastes

Tratamiento	Total Yi..	Factor		
		A	B	AB
COEFICIENTES DE CONTRASTES				
1	Y00.	-1	-1	+1
a	Y10.	+1	-1	-1
b	Y01.	-1	+1	-1
ab	Y11.	+1	+1	+1
CONTRASTE (q _i)		q _A	q _B	q _{AB}

Los contrastes (q_i) para cada factor se calcula mediante la relación:

$$q_i = \sum_{i=1}^t C_i Y_i. = C_1 Y_{00}. + C_a Y_{10}. + C_b Y_{01}. + C_{ab} Y_{11}.$$

5) Análisis del modelo

Se emplea el análisis de varianza (ANADEVA) con el fin de conocer que factor ó interacción de factores presentan efecto sobre la variable de respuesta y de esta forma establecer el modelo empírico que gobierna a la variable de respuesta (producción ó producción específica de vitamina B-12).

Tabla de ANADEVA

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media Cuadrática	Fcal
	gl	SC	MC	
A	a-1 1	432657.88	432657.88	10.79*
B	b-1 1	6974703.52	6974703.52	173.87**
AB	(a-1)(b-1) 1	61796.34	61796.34	1.54
E	(r-1)t 5	200572.90	40114.58	

i = 1....2
j = 1....2
k = 1....2

Para el cálculo del error experimental se emplearán las replicaciones de los 5 tratamientos.

Los cálculos se realizaron empleando las siguientes ecuaciones:

$$SC_{qi} = q^2 / r \sum_{i=1}^r C_i^2 \quad (\text{para A, B y AB})$$

$$MC = SC_{qi} / gl \quad (\text{para A, B y AB})$$

$$Fcal = MC / MCE$$

$$SCe = \sum_{k=1}^r \sum_{j=1}^b \sum_{i=1}^a Y_{ijk}^2 - \frac{\sum_{j=1}^b \sum_{i=1}^a Y_{ij}^2}{r}$$

$$MCE = \frac{SCe}{q_e}$$

La "Fcal" así obtenida se compara con la "F" de tablas, tomando en cuenta que:

Si "Fcal" \geq "F" de tablas F 1, (r-1)t, 1- α No hay efecto del factor a probar.

Si "Fcal" $<$ "F" de tablas F 1, (r-1)t, 1- α Hay efecto del factor que se prueba.

Donde:

t = tratamientos = 3.

F 1, (r-1)t = F 1, 5 ; $\alpha = 0.05 = 6.61$
 $\alpha = 0.01 = 16.30$

α = Nivel de significancia.

Cuando el valor obtenido de los datos experimentales es mayor a una significancia del 5 % se dice que es significativo y cuando es mayor a una significancia del 1 % es altamente significativo.

Por lo tanto, para los resultados que se están analizando en este ejemplo del anexo, solo hay efecto de los factores principales concentración (C) y tiempo de adición (T) del precursor cobalto al tiempo de 96 h. de fermentación. La ecuación a la que se llega es de la forma:

$$\hat{Y} = b_0 + b_1 C + b_2 T + E$$

Donde:

\hat{Y} = Variable de respuesta estimada.

b_0, b_1 y b_2 = Coeficientes de determinación estimados.

6) Estimación de los coeficientes de regresión.

Estos coeficientes representan el grado de asociación que cada uno de los factores presentaron sobre la variable de respuesta. Se calculan empleando las siguientes ecuaciones:

Para estimar b_1 y b_2

$$b = q_i / r_i C^2$$

Así para:

$$b_1 = q_A / 2(4) = -1860.447/8 = \underline{\underline{-232.556}}$$

$$b_2 = q_B / 2(4) = -7469.781/8 = \underline{\underline{-933.723}}$$

Para la estimación de b_0 :

se obtiene el valor promedio de los 10 resultados.

$$b_0 = \sum_{i=1}^{10} Y_{ij} / 10 = 4988.67 + \dots + 2440.6672 / 10 = \underline{\underline{3666.3114}}$$

En el caso en que se obtenga efectos de la interacción de los factores estudiados b_{12} , el cálculo para b_1 y b_2 se calcula con la siguiente ecuación:

$$q_{AB} / 4$$

La ecuación que se obtiene es:

$$\hat{Y} = 3666.3114 - 232.556 C - 933.723 T$$

7) Prueba del efecto cuadrático

Esta es una forma de determinar si el modelo empírico presenta o no efecto cuadrático. Para ello se comparan los promedios de los cuatro puntos del factorial 2^2 con el promedio de los valores del punto central del diseño experimental por medio de una simple diferencia:

$$d = \bar{Y}_f - \bar{Y}_c$$

Donde:

d = Diferencia.

\bar{Y}_f = Promedio de los cuatro puntos del factorial 2^2 .

\bar{Y}_c = Promedio de los resultados del punto central.

la cual es una medida de la curvatura total de la superficie. Para determinar si esta diferencia es debida al efecto cuadrático es necesario construir un intervalo de la diferencia:

$$d + Sd$$

Donde:

$$Sd = \sqrt{MCE \left[\frac{1}{8} + \frac{1}{2} \right]}$$

si en este intervalo se localiza el valor de cero, se puede asegurar la ausencia de un efecto cuadrático.

8) Fuerza de asociación entre la variable de respuesta y el modelo.

En este paso se determina el coeficiente de correlación (r^2) del modelo empírico para evaluar el grado de asociación entre los factores concentración (C) y tiempo de adición (T) del precursor y la variable de respuesta. La ecuación que se emplea en este caso es:

$$r^2 = \frac{SC_{ef}}{\sum (Y - \bar{Y})^2}$$

Donde:

r^2 = Coeficiente de correlación.

SC = Suma de cuadrados de los efectos significativos del ef diseño experimental.

Y = Variable de respuesta en cada una de las replicaciones del diseño experimental.

\bar{Y} = Variable de respuesta promedio del diseño experimental.

En el caso particular que se está tomando como ejemplo en este anexo, se tiene que:

$$r^2 = 432657.88 + 6974703.524 / 7710379.311$$

$$r^2 = 0.9607$$

9) Construcción de las gráficas de contorno.

Para su construcción se parte de la ecuación estimada que se obtiene, se despeja a una de sus variables independientes (C ó T) y se les da valores a Y y a la otra variable, a esta última en unidades codificadas (ver anexo_8_). Por ejemplo para el caso particular que se está tratando en este anexo:

$$C = \left[-933.723 T + 3666.3114 - \hat{Y} \right] / 232.556$$

En este caso se les dieron valores para "Y" entre 2,500 a 5,500 en incrementos de 500 ug/l y para T entre -2 a 3 en unidades codificadas y en incrementos de 1. La gráfica que se obtuvo mediante este procedimiento se muestra en la figura 42 (sección Viib) correspondiente al texto de resultados y discusión.

Un procedimiento similar fue empleado para el análisis de resultados donde se empleó glicina como precursor de vitamina B-12 al último día (144 h) de fermentación, para producción (figura _36_, sección Viib del texto de resultados y discusión) y para producción específica (figura _37_, sección Viib).

En este mismo anexo, las figuras _42_ a la _44_ (sección Viib) corresponden al comportamiento encontrado en la producción de vitamina B-12 y las figuras _45_ a la _47_ (sección Viib) para la producción específica de esta misma vitamina al 4o. 5o. y 6o. día de fermentación, cuando fue estudiado el precursor cobalto en el medio de fermentación.

VIII d. ANEXO 4

PROCEDIMIENTO DE CALCULO PARA EL ANALISIS DE LOS RESULTADOS EN EL DISEÑO PLACKETT-BURMAN (Box, et al. 1978).

El análisis se realizó en las siguientes variables de respuesta para los tres últimos días de fermentación:

- Crecimiento (g/l).
- Producción de vitamina B-12 (μg ó mg/l).
- Producción específica de vitamina B-12 (μg B-12/g de cel.)

En base a la tabla de coeficientes (Ci) del diseño Plackett-Burman, y al resultado total de cada tratamiento, se determinó el efecto de los factores sobre las variables de respuesta.

Los resultados que se obtuvieron al emplear este tipo de diseño se muestran en las tablas 1, 2, y 3 del presente anexo.

El procedimiento de calculo comprende los siguiente pasos:

- 1) Tabla de coeficientes del contraste.

Se presenta la tabla de coeficientes y totales empleada en el análisis de crecimiento. De igual forma se utilizan los mismos coeficientes en las otras dos variables de respuesta:

tratamiento	total*	FACTORES						
		A	B	C	D	E	F	G
Yi.		COEFICIENTES DEL CONTRASTE (Ci)						
1	21.2147	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1
2	20.08574	+1	+1	-1	+1	-1	-1	+1
3	20.52674	+1	-1	+1	-1	-1	+1	+1
4	20.19942	-1	+1	-1	-1	+1	+1	+1
5	22.06534	+1	-1	-1	+1	+1	+1	-1
6	19.9309005	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1

TABLA. 1 RESULTADOS OBTENIDOS EN EL DISEÑO PLACKETT-BURMAN PARA EL CRECIMIENTO (g/l) DE *Propionibacterium shermanii* EN LOS TRES ULTIMOS DIAS DE FERMENTACION.

tratamiento	TIEMPO DE FERMENTACION (h)					
	100		122		145	
	Y _{ij}	Y _i	Y _{ij}	Y _i	Y _{ij}	Y _i
1	10.7702 10.4445	21.2147	10.2430 10.8150	21.0579	10.2351 9.9290	20.1641
2	10.1959 9.8898	20.0857	11.1132 10.4445	21.5577	10.2351 9.5409	19.7761
3	10.4409 10.0858	20.5267	10.0037 9.6938	19.6975	9.5707 9.9290	19.4997
4	10.8114 9.3881	20.1994	8.7063 9.6938	18.4001	10.1567 9.3136	19.4703
5	10.9446 11.1207	22.0653	10.8525 10.8149	21.6675	10.7702 10.9874	21.7576
6	10.1195 9.8114	19.9309	10.1606 10.1642	20.3249	11.1524 9.5801	20.7325
7	10.7702 10.8973	21.6675	11.9369 11.3245	23.2614	11.9364 10.8973	22.8337
8	11.1524 10.8561	22.0085	11.2386 11.2383	22.4769	11.1132 11.3559	22.4691

Y_{ij} = Crecimiento obtenido en la jésima replicación del iésimo tratamiento.

Y_i = Crecimiento obtenido al sumar las replicaciones en el iésimo tratamiento.

TABLA 2 RESULTADOS OBTENIDOS EN EL DISEÑO PLACKETT-BURMAN PARA LA PRODUCCION DE VITAMINA B-12 ($\mu\text{g/l}$) EN LOS TRES ULTIMOS DIAS DE LA FERMENTACION.

trata- miento	TIEMPO DE FERMENTACION (h)					
	100		122		145	
	Y _{ij}	Y _i	Y _{ij}	Y _i	Y _{ij}	Y _i
1	6724.667 6766.667	13491.334	7252.000 6384.000	13636.000	6570.667 6813.333	13384.000
2	8129.333 6934.667	15064.000	7998.667 8409.33	16408.000	8894.667 8101.333	16996.000
3	6962.667 6990.667	13953.334	7289.333 7303.333	14592.666	8012.667 8115.333	16128.000
4	7942.667 6430.667	14372.334	7210.000 6402.667	13612.667	7636.444 7420.000	15056.444
5	6892.667 6678.000	13570.666	7233.333 7522.667	14756.000	7438.667 7135.333	14574.000
6	6342.000 6449.333	12791.334	6379.333 6412.000	12791.333	6351.333 6743.333	13094.666
7	7224.000 6822.667	14046.666	7690.667 7648.667	15339.334	7849.333 8582.000	16431.334
8	7200.667 6738.667	13939.334	7247.333 7605.080	14852.413	8185.333 8614.667	16800.000

Y_{ij} = Producción obtenida en la jésima replicación del iésimo tratamiento.

Y_i = Producción obtenida al sumar los resultados de las replicaciones en el iésimo tratamiento.

TABLA 3 RESULTADOS OBTENIDOS EN EL DISEÑO PLACKETT-BURMAN PARA LA PRODUCCION ESPECIFICA DE VITAMINA B-12 ($\mu\text{gB-12/g cel.}$) EN LOS TRES ULTIMOS DIAS DE FERMENTACION.

tratamiento	TIEMPO DE FERMENTACION (h)					
	100		122		145	
	Y _{ij}	Y _i	Y _{ij}	Y _i	Y _{ij}	Y _i
1	624.377 647.870	1272.247	707.998 590.295	1298.293	641.973 686.177	1328.137
2	797.312 701.192	1498.504	719.745 805.145	1524.890	869.034 849.113	1718.147
3	666.863 692.118	1358.981	728.666 753.401	1482.067	837.210 817.335	1654.545
4	734.660 684.984	1419.644	828.134 660.490	1488.624	751.861 796.686	1548.547
5	629.776 600.502	1230.278	666.512 695.581	1362.093	690.671 649.409	1340.080
6	626.712 657.329	1284.041	627.848 630.840	1258.688	569.504 703.887	1273.391
7	670.740 626.090	1296.830	644.277 675.406	1319.683	657.596 787.537	1445.133
8	645.661 620.726	1266.387	644.859 676.711	1321.570	736.542 758.607	1495.149

Y_{ij} = Producción específica obtenida en la jésima replicación del iésimo tratamiento.
 Y_i = Producción específica obtenida al sumar las replicaciones en el iésimo tratamiento.

7	21.66746	-1	+1	+1	+1	-1	+1	-1
8	22.00850	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

* Como resultado de dos replicaciones.

2) Cálculo de q , SC , MC y F_{cal} para cada factor en la variable de respuesta "Crecimiento". De la misma manera se realizaron los cálculos para las otras dos variables de respuesta.

Para ello se emplearon las siguientes fórmulas:

$$q = \sum_{i=1}^t C_i Y_{i.} = C_1 Y_{1.} + C_2 Y_{2.} + \dots + C_t Y_{t.} \quad (1)$$

$$SCq = q^2 / r \sum_{i=1}^t C_i^2 \quad (2)$$

$$F_{cal} = SCq / MCE \quad (3)$$

$$SCE = \sum_{j=1}^2 \sum_{i=1}^8 Y_{ij}^2 - \left[\sum_{i=1}^8 Y_{i.}^2 / r \right] \quad (4)$$

$$MCE = SCE / gl \quad (5)$$

$$gl = (r - 1) t$$

Donde:

q = Contraste.

\sum = Sumatoria.

SCq = Suma de cuadrados del contraste.

C_i^2 = Coeficientes al cuadrado de cada tratamiento en cada uno de los factores. En este caso es igual a 8.

$Y_{i.}$ = Totales de los resultados (suma de las replicaciones en el i ésimo tratamiento).

Y_{ij} = Resultado obtenido en la j ésima replicación del i ésimo tratamiento.

r = Número de replicaciones, $r = 1, \dots, 2$.

Fcal = "F" calculada (distribucion "F").

t = Tratamiento, t = 1....8.

M_{Ce} = Media Cuadrática de cuadrados del error experimental.

g_{le} = Grados de libertad del error experimental.

S_{Ce} = Suma de cuadrados del error.

∑∑ = Doble sumatoria.

2i) Cálculo de la media cuadrática del error experimental (M_{Ce}).

Esta se realizó para las tres variables de respuesta. Como ejemplo se dará el procedimiento para el crecimiento al tiempo t₄ (100 h) de la fermentación:

tomando los datos de la tabla 1:

$$S_{Ce} = (10.7702)^2 + (10.4445)^2 + (10.19592)^2 + (9.88782)^2 + (10.44092)^2 + (10.08582)^2 + 10.81136)^2 + (9.38806)^2 + (10.94464)^2 + (11.1207)^2 + (10.11948)^2 + (9.8114205)^2 + (10.7702)^2 + (10.89726)^2 + (11.1524)^2 + (10.8561)^2 + (21.2147)^2 + (20.08574)^2 + (20.52674)^2 + (20.19942)^2 + (22.06534)^2 + (19.9309005)^2 + (21.66746)^2 + (22.0085)^2 / 2$$

$$S_{Ce} = 1761.709241 - 1760.418495$$

$$S_{Ce} = 1.2907461$$

$$M_{Ce} = 1.2907461 / 8(2-1)$$

$$M_{Ce} = 0.161343262$$

Este término se usa como una medida para indicar si hay efecto o no del factor, como se ejemplifica a continuación:

2ii) Cálculo de la significancia del factor "A" sobre la variable de respuesta "crecimiento" al tiempo t₄ (100 h) de fermentación:

$$q_A = 21.2147 + 20.08574 + 20.52674 - 20.19942 + 20.06534 - 19.9309005 - 21.66746 - 22.00850$$

$$q_A = 0.0862395$$

$$SCqA = (0.0862395)^2 / 16 = 0.0004648$$

$$SCqA = 0.0004648$$

Empleando la MSe calculada en el punto 2i:

$$Fcal = 0.0004648 / 0.16134325$$

$$Fcal = 0.002881$$

La "Fcal" así obtenida, se compara con la "F" de tablas y se toma la decisión; con base a la siguiente regla:

Ho: No existe efecto del factor sobre la variable de respuesta.

Ha: Existe efecto del factor sobre la variable de respuesta.

Si "Fcal" \geq "F"_{1, (n-1)t}; $1-\alpha$ se rechaza Ho.

Si "Fcal" < "F"_{1, (n-1)t}; $1-\alpha$ no se rechaza Ho.

Las "Fcal" para los demás factores a los tres últimos días de fermentación y para las tres variables de respuesta se muestran en la tabla XXIII, sección VIVC correspondiente al texto de resultados y discusión).

VIIIe. ANEXO 5

PROCEDIMIENTO DE CALCULO PARA COMPARAR LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON LOS RESULTADOS DE LA FERMENTACION CONTROL.

En muchas situaciones se desea determinar si un tratamiento presenta un efecto diferente al tratamiento control. Dunnett (Gill, J. L. 1978) desarrolló la prueba de "t" estableciendo el siguiente estadístico de prueba:

$$t_D = (\bar{Y}_c - \bar{Y}_i) / \sqrt{MCE (1/r_c - 1/r_i)}$$

Donde:

t_D = "t" de Dunnett; $t_{m,r}$; $m = t-1$; $r = (r_c-1) + (r_i-1)$

t_D ; 0.95; 1,8 = 3.6

t_D ; 0.99; 1,8 = 4.81

\bar{Y}_c = Valor promedio del resultado del experimento control.

\bar{Y}_i = Valor promedio de cada uno de los experimentos a comparar.

r_c = Número de replicación en el experimento control.
 $r_c = 3$.

r_i = Número de replications en el experimento a comparar.
 $r_i = 3$.

MCE = Media cuadrática del error experimental. Se calcula como se describe en el anexo 4.

Para comparar el crecimiento obtenido en el diseño Plackett-Burman (anexo 4) con respecto al obtenido en el experimento control, se emplea el valor de la media cuadrada del error (MCE) calculado en el anexo de Plackett-Burman y el valor promedio del crecimiento en el experimento control al mismo tiempo de fermentación se procede a realizar los calculos:

tiempo (h)	\bar{Y}_c	MCE
100 t4	6.671	0.1613433

Calculando para el tratamiento "1" al tiempo t4 (100 h) de la fermentación:

$$t = 6.671 - 11.193 \sqrt{0.1613433 (1/3 + 1/3)}$$

D

$$t = 13.605 **$$

D

Las "t" para los demás tratamientos en las tres variables de respuesta a los tres últimos días de fermentación se muestran en las tablas XXIV y XXVIII (secciones Vivc y Vivf correspondientes al texto de resultados y discusión).

PROCEDIMIENTO DE CALCULO PARA EL ANALISIS DE LOS RESULTADOS EN EL DISEÑO FACTORIAL 2³ (Box, et al. 1978).

Como ya se dijo al principio del anexo, los experimentos factoriales son aquellos que involucran varios factores con el objeto de estudiar sus efectos sobre la variable de respuesta. En este caso en particular se estudiarán los siguientes factores: concentración de glicina, de glucosa y de nitrógeno proporcionado por el agua de cocimiento de maíz (ACM) a dos niveles de concentración (mencionados en el texto); sobre las siguientes variables de respuesta:

- Crecimiento (g/l).
- Producción de vitamina B-12 (µg/l).
- Producción específica de vitamina B-12 (µg B-12/g de cel)

Al emplear un diseño factorial 2³ se plantean los siguientes pasos:

1) Modelo:

$$\hat{Y} = b_0 + b_1 A + b_2 B + b_3 C + b_{12} AB + b_{13} AC + b_{23} BC + b_{123} ABC + E$$

\hat{Y} = Variable de respuesta

b_0 = Término independiente

b_1, b_2, b_3 = coeficientes de regresión asociados respectivamente a los factores que presentan efecto principal de A, B y C, respectivamente.

b_{12}, b_{13}, b_{23} = Coeficientes de regresión asociados respectivamente a la doble interacción al combinar los efectos de los factores A, B, A C y B C.

b_{123} = Coeficientes de regresión asociados a la triple interacción al combinar los efectos de los tres factores A B C.

E = Error experimental.

2) Matriz y codificación de tratamientos, totales y valores de la variable de respuesta.

		A			
		a0			a1
B		b0	b1	b0	b1
		Y0001	Y0101	Y1001	Y1101
		Y0002	Y0102	Y1002	Y1102
co	:	Y000.	Y010.	Y100.	Y110.
	:				
	:	Y000r	Y010r	Y100r	Y110r
		(1)	(b)	(a)	(ab)
C					
		Y0011	Y0111	Y1011	Y1111
		Y0012	Y0112	Y1012	Y1112
c1	:	Y001.	Y011.	Y101.	Y111.
	:				
	:	Y001r	Y011r	Y101r	Y111r
		(c)	(bc)	(ac)	(abc)

a0, b0, c0 = son los niveles bajos de los factores A, B y C, respectivamente.

Y = Variable de respuesta.

r = Replicaciones.

Los subíndices de Y indican de izquierda a derecha, el nivel en que se encuentran los factores A, B y C y el número que se encuentra al final es la replicación.

Y000. = Significa la cantidad total que resulta al sumar los resultados obtenidos en las replicaciones en cada uno de los tratamientos.

En el caso de la variable de respuesta "producción de vitamina B-12" el análisis se realizó en base a este diseño. Para el caso de las otras dos variables de respuesta el análisis fué conveniente hacerlo como un factorial 2² (ver anexo 7).

Matriz de tratamientos para los resultados de "Producción de vitamina B-12":

A

ao

al

B	bo	b1	bo	b1
	7080.666	7975.333	9300.666	8185.333
co	6808.666	7385.333	9604.000	7578.666
	7060.666	7952.000	10558.666	7840.000
	(1)	(b)	(a)	(ab)
C				
	5154.000	8171.333	7588.000	8759.333
c1	6729.333	7513.333	8353.333	8759.333
	7037.333	7509.333	9576.000	8614.666
	(c)	(bc)	(ac)	(abc)

A = Concentración de Glucosa.
 B = Concentración de Nitrógeno (ACM).
 C = Concentración de Glicina.

3) Tabla de Coeficientes de Contrastes:

Tratamiento	Total%	FACTORES						
		A	B	C	AB	AC	BC	ABC
COEFICIENTES DE CONTRASTES (Ci)								
i	20949.998	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1
a	29493.332	+1	-1	-1	-1	-1	+1	+1
b	23312.666	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1
c	19520.666	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1
ab	23603.999	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1
ac	25517.333	+1	-1	+1	-1	+1	-1	-1
bc	23193.999	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1
abc	24971.332	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1

* Total de los resultados en cada uno de los tratamientos.

4) Los contrastes (q_i) de cada uno de los factores se se calculan como se indicó en el anexo de Plackett-Eurman. Obteniendose los siguientes valores:

Factor:	" q_i "
A	16608.667
B	399.333
C	4156.665
AB	12471.335
AC	1060.667
BC	6653.997001
ABC	4032.667

5) Análisis del modelo.

A partir de las " q_i " calculadas se realiza el análisis de la varianza (ANADEVA) con el fin de conocer que factor y/o interacciones de los factores presentan efecto sobre la variable de respuesta "Producción de vitamina B-12" y de esta forma poder establecer el modelo matemático que gobierna a éste parámetro, bajo las condiciones de fermentación tabajadas.

TABLA DE ANADEVA

Fuente de Variación F.V.	Grados de Libertad (gl)	Suma de Cuadrados SC = ($q^2/8r$)	Media Cuadrática MC = (SC/gl)	Fcal SCq/MCe
A	1	11493659.15	mismo número	34.29**
B	1	6644.45187	"	0.02
C	1	719910.9968	"	2.14
AB	1	6480591.528	"	19.34**
AC	1	46875.60353	"	0.14
BC	1	1844819.637	"	5.5*
ABC	1	677600.1305	"	2.02
Error Exp.	$8(r-1)=16$	53623333.30	335145.8313	

NOTA: q , SC, MCq, MCE y Fcal se determinan como ya antes se explicó en el anexo de Plackett-Burman.

La "Fcal" así obtenida se compara con la F de tablas, proponiendo las siguientes hipótesis:

H₀: No existe efecto del factor sobre las variables de respuesta.

H_a: Existe efecto del factor sobre las variables de respuesta.

Si "Fcal" \geq a "F" de tablas F 1, 8(r-1); 1- α se rechaza H₀
Si "Fcal" $<$ a "F" de tablas f 1, 8(r-1); 1- α no se rechaza H₀

Por lo tanto se tiene:

$$F_{1, 8(r-1)} = F_{1, 16}; \alpha = 0.05 = 4.47$$

$$\alpha = 0.01 = 8.53$$

α = Nivel de significancia.

En este caso el factor A y la interacción A, B presentaron efecto significativo; mientras que la interacción B, C presentan efecto altamente significativo.

Por consiguiente se establece el modelo empírico, tomando en cuenta que si existen efectos significativos entre las interacciones, los efectos principales deben aparecer en el modelo.

$$\hat{Y} = b_0 + b_1 A + b_2 B + b_3 C + b_{12} AB + b_{13} BC + E$$

Donde:

\hat{Y} = Variable de respuesta, Producción de vitamina B-12.

b_0 = Término independiente.

b_1, b_2, b_3 = Coeficientes de regresión asociados a cada uno de los factores (A, B, C) que presentaron efecto sobre la variable de respuesta.

b_{12}, b_{13} = Coeficientes de regresión asociados a la interacción de A, B y B, C, respectivamente.

E = Error Experimental.

6) Estimación de los coeficientes de correlación. Para ello se utilizó la siguiente ecuación:

$$q_i / r_i C^2$$

de esta forma se calcularon cada uno de los coeficientes, b_1 , b_2 , b_{12} y b_{23} . Para estimar el valor de b_0 , solo se toma el valor promedio de la suma de los 24 resultados obtenidos en la matriz de resultados.

Al final se obtiene la siguiente ecuación:

$$Y = 7940.1385 + 692.028 A - 16.638875 B - 173.194375 C - 519.639 AB + 277.250 BC$$

7) Se calcula el coeficiente de determinación (r^2) del modelo para determinar su capacidad de predicción. r^2 debe ser lo más cercano a "1", para poder ser aceptado. En este caso se obtiene una $r^2 = 0.966$. r^2 describe adecuadamente la predicción del modelo.

La ecuación que se emplea en este caso es la siguiente:

$$r^2 = \frac{SC}{E} / \frac{r(t-1)}{Y} S^2$$

Donde:

r^2 = Coeficiente de determinación ó de correlación.

SC = Suma de los cuadrados de los efectos del modelo.
E

S^2 = Varianza de los promedios de los tratamientos.
Y

t = Número de tratamientos.

8) Construcción de las gráficas de contorno. Para su construcción se parte de la ecuación que se obtiene y se despeja a una de sus variables independientes, por ejemplo "A". Como en este modelo se relacionan los 3 factores estudiados, se optó por fijar arbitrariamente los niveles de uno de los factores, por ejemplo "B". Posteriormente se le dieron valores a "Y" y a la variable "C"; a este último se le recomienda dar los valores en forma de unidades codificadas (uc) (ver anexo _8_), con el fin de facilitar los cálculos.

Las ecuaciones que se obtuvieron para cada uno de los niveles de nitrógeno propuestos y de producción de vitamina B-12, fueron las siguientes:

Nivel del factor "B"	Ecuación	Rango de valores de "Y" ($\mu\text{g/l}$)
-1.5	$A = \frac{Y-7965.096813+589.059375 C}{1471.4865}$	6,000 a 10,000
-1.0	$A = \frac{Y-7956.777375+450.444375 C}{1211.667}$	8,000 a 9,500
-0.5	$A = \frac{Y-7948.457938+311.819375 C}{951.8475}$	7,000 a 8,500
0.0	$A = \frac{Y-7940.1385+173.194375 C}{692.028}$	7,500 a 8,500
0.5	$A = \frac{Y-7931.819063+34.569375 C}{432.2085}$	7,500 a 8,000
1.0	$A = \frac{Y-7923.499625-104.055625 C}{172.389}$	8,000
1.5	$A = \frac{-Y+7915.180188+242.680625 C}{87.4305}$	8,000

Con los valores obtenidos al emplear éstas fórmulas, se construyen las gráficas de concentración de glucosa (A) vs concentración de glicina (C). Cada línea que se obtiene representa un valor empírico de producción de vitamina B-12 (figura 62, sección Vive en el texto de resultados y discusión).

PROCEDIMIENTO DE CALCULO PARA EL ANALISIS DE RESULTADOS EN UN DISEÑO FACTORIAL 2² (Box, et al. 1976).

En virtud de que el análisis de varianza en el diseño factorial 2³ para crecimiento de *P. shermanii* y producción específica de vitamina B-12, indicó interacción altamente significativa de AB para ambas variables de respuesta y de A y B para crecimiento; y efecto significativo de B para la producción específica de vitamina B-12. Fue conveniente analizar los resultados como un factorial 2² ya que son solamente dos los efectos que intervienen en el comportamiento en cada una de estas dos variables de respuesta.

Al emplear un factorial 2² se plantean exactamente los mismos pasos que para un factorial 2³ (anexo 6).

1) Modelo:

$$\hat{Y} = b_0 + b_1 A + b_2 B + b_{12} AB + E$$

2) Matriz y codificación de los tratamientos:

		A	
		a0	a1
b0	Y001		Y101
	Y002		Y102
	⋮	Y00.	⋮
	⋮		Y10.
	Y00r	(1)	Y10r (a)
b1	Y011		Y111
	Y012		Y112
	⋮	Y01.	⋮
	⋮		Y11.
	Y01r	(b)	Y11r (ab)

A = Concentración de glucosa.

B = Concentración de nitrógeno (ACM).

r = Replicaciones, r = 1 6.

3) Matriz de resultados:

Para explicar el presente análisis, se tomaron como ejemplo los resultados obtenidos para la producción específica de vitamina B-12.

		A	
		ao	ai
bo		744.745	735.766
		602.487	612.629
		704.028	762.600
		716.715	682.192
		709.062	873.410
		715.384	773.133
B			
bi		728.895	625.183
		678.564	672.398
		656.690	584.850
		726.247	581.200
		756.660	621.785
		732.214	665.873

3) Tabla de Coeficientes de Contrastes:

Trata- miento	Total* Yi.	Promedio	FACTORES		
			COEFICIENTES DE CONTRASTES (Ci)		
			A	B	AB
i	4192.421	698.737	-1	-1	+1
a	4439.730	739.955	+1	-1	-1
b	4279.270	713.217	-1	+1	-1
ab	3751.289	625.215	+1	+1	+1
qi	16662.7109	694.277	-280.672	-601.542	-775.2896

4) Análisis del modelo.

Se realiza el análisis de varianza (ANADEVA), con el fin de conocer que factor o interacciones de factores presentan efecto sobre la variable de respuesta y de esta forma poder establecer el modelo empírico que gobierna a este parámetro.

TABLA DE ANADEVA

Fuente de Variación F. V.	Grados de Libertad (g/1)	Suma de Cuadrados SC = (q ² /4r)	Media Cuadrática MC = (SC/g)	Fcal SCq/MC
A	1	3282.374838	mismo valor	1.0
B	1	15079.72566		4.59*
AB	1	25044.74849		7.63*
E	4(r-1)=20	65623.19000	3281.1595	

NOTA: q, SC, MCq, MCE y Fcal se determinan como se explica en el anexo 4.

Tomando en cuenta que:

F de tablas F 1, 4(r-1); α=0.05 = 4.35
F 1, 4(r-1); α=0.01 = 8.10

se encuentra que hay efecto significativo de la interacción de AB y del efecto principal de B. Como existe interacción, el efecto principal de A debe aparecer en el modelo.

Por lo tanto, el modelo empírico al que se llega es:

$$\hat{Y} = b_0 + b_1 A + b_2 B + b_{12} AB + E$$

5) Se estiman los coeficientes de correlación y el análisis de regresión (r²) de igual forma que en el diseño factorial 2³ (anexo 6).

$$\hat{Y} = 694.2796 - 11.69468333 A - 25.06635 B - 32.3073333 AB$$

$$r^2 = 0.999962$$

6) Construcción de las gráficas de contorno. Para su construcción, se despeja de la ecuación obtenida a una de las variables independientes, por ejemplo A asignando valores a "Y" y a "B". Este último en forma de unidades codificadas (uc) (ver anexo_8_).

$$A = (694.2796 - Y - 25.06635 B) / (11.69468333 + 32.3073333 B)$$

de esta ecuación se construye la gráfica A vs B, es decir concentración de glucosa vs concentración de nitrógeno (ACM). Cada línea que se obtiene representa un valor empírico de producción específica de vitamina B-12 (figura _63_, sección Vive correspondiente al texto de resultados y discusión).

Este procedimiento fue empleado para la variable de respuesta "crecimiento", encontrando que hubo efecto altamente significativo de los factores A y B y de la interacción de ambos (tabla _XXVII_, sección Vive correspondiente al texto de resultados y discusión).

La ecuación que gobierna este comportamiento así como su coeficiente de determinación (r^2) son:

$$\begin{aligned} \hat{Y} &= 11.46887708 + 1.203680417 A + 0.444910416 B \\ &\quad - 0.168845416 AB \end{aligned}$$

$$r^2 = 1.0$$

La gráfica de contorno para "crecimiento" microbiano (figura _61_, sección Vive correspondiente al texto de resultados y discusión) se construyó [concentración de glucosa vs concentración de nitrógeno (ACM)] empleando la siguiente ecuación:

$$A = (Y - 11.46887708 - 0.444910416 B) / (1.203680417 - 0.168545416 B)$$

VIII. ANEXO 8

PROCEDIMIENTO DE CALCULO PARA DETERMINAR LAS CONCENTRACIONES DE GLUCOSA Y GLICINA POR EL METODO DEL ASCENSO RAPIDO (Box, G. et al. 1978) PARA CONFORMAR NUEVOS MEDIOS DE FERMENTACION.

En el presente se describe la obtención de los nuevos niveles del factor concentración de glicina (C) y niveles del factor concentración de glucosa (A) utilizando el procedimiento del ascenso rápido con el objeto de aumentar la producción de vitamina B-12. Este procedimiento parte de la información obtenida del factorial 2^3 (anexo_6) donde se evaluó el efecto de la concentración de glucosa, concentración de nitrógeno y concentración de glicina.

El modelo obtenido al analizar el factorial 2^3 , para la producción de vitamina B-12 es:

$$Y = 7940.1385 + 692.028 A - 16.636875 B - 173.194375 C - 519.639 AB + 277.250 BC \quad (1)$$

Ya que se obtuvo una buena producción de vitamina B-12 hacia el nivel bajo del factor concentración de nitrógeno (B). Se obtuvieron tres ecuaciones fijando los niveles de este último factor (B) en: -1, -1.25 y -1.5 en unidades codificadas. Al sustituir -1.5 en B la ecuación anterior se reduce a:

$$C = 1471.4865 A / 589.059375 - (Y - 7965.0968813 / 589.059375) \quad (2)$$

Esta relación describe una familia de líneas al ser fijado el valor de producción (Y) (figura _62_, sección Vive correspondiente al texto de resultados y discusión).

$$C = b'_{0} + 2.498027 A \quad (3)$$

La técnica del ascenso rápido indica que el máximo cambio obtenido en Y se da por una línea paralela a (3), es decir:

$$C = b''_{0} - 0.400315954 A \quad (4)$$

Es decir, por cada unidad codificada de aumento en A se debe de disminuir -0.400315954 unidades codificadas en B para seguir la ruta del ascenso rápido, la máxima producción se obtuvo cuando los niveles de A y B fueron respectivamente +1 y -1. Al sustituir en 4 y al reordenar:

$$C = -0.599684145 - 0.400315854 A \quad (5)$$

Al fijar a A en 1.5 y al sustituirlo en (5), se obtiene:

$$C = 1.20026$$

las cuales al decodificar da para la concentración de glucosa A = 48 g/l, empleando las siguientes relaciones:

$$UC = X - X_p / d \quad (6)$$

$$X_p = X_1 - X_2 / 2 \quad (7)$$

$$d = X_1 - X_p \quad (8)$$

donde:

UC = Unidad codificada

X = Concentración de cada uno de los factores que se obtendrá para conformar el nuevo medio de fermentación.

X_p = Promedio e las dos concentraciones ó niveles (bajo y alto) utilizados en el factorial 2³. 23 y 43 g/l para glucosa, 4 y 12 mM para glicina, respectivamente.

d = Unidad de variación. Para glucosa de 10 g/l y para glicina de 4 mM.

De esta forma tenemos, para glucosa:

$$UC = X - 33 / 10$$

$$A = 48 \text{ g/l}$$

de la ecuación (5)

$$C = -0.59968 - 0.40032 (-1.5)$$

$$C = 1.20016 \text{ en UC}$$

de la ecuación (6):

$$UC = X - 8 / 4$$

$$C = 3.19936 \text{ mM}$$

de igual forma se determinó para los otros dos niveles de A, 2.0 y 2.5 en UC. Estos valores van en aumento dado que la ecuación a la que se llegó para explicar el comportamiento de la producción de vitamina B-12, indicó que este factor debía ser incrementada su concentración para poder incrementar aún más la producción de este metabolito.

Para los niveles de -1.0 y -1.25 del factor B, se partieron de las siguientes ecuaciones:

Para B = -1.0

$$C = 1211.667 A / 450.444375 - (Y + 7956.777375 / 450.444375)$$

Para B = -1.25

$$C = 1341.57675 / 519.756875 + (-Y + 7960.9370 / 519.756875)$$

Al seguir el anterior procedimiento para los niveles de 1.5, 2.0 y 2.5 para A en UC, se obtuvieron los del factor C. Las concentraciones a las que se llegó se muestran en la siguiente tabla:

ACM		GLUCOSA		GLICINA	
UC	g/l	UC	g/l	UC	mM
		1.5	48	-1.184	3.25
-1.0	2.15	2.0	53	-1.372	2.50
		2.5	58	-1.558	1.80
		1.5	48	-1.200	3.23
-1.25	1.65	2.0	53	-1.420	2.45
		2.5	58	-1.630	1.70
		1.5	48	-1.200	3.20
-1.5	1.15	2.0	53	-1.400	2.40
		2.5	58	-1.600	1.60

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

Anónimo (1979), fideicomiso del limón (folleto).

Akira Nanba, Reichi Nukada and Shiro Nagai (1983). Inhibition by Acetic and Propionic acids of the growth of Propionibacterium shermanii. J. Ferment. Technol; Vol. 61, No. 6: 551-556.

Aries, R. (1974). Nouveau procédé de preparation de la vitamine B-12 ou cyanocobalamine. No. de publication: 2.209.842. Republique France, Pat. 2.209.842.

Association of Official Agricultural Chemists (A.O.A.C.) (1975). Official Methods of Analysis, 12a ed., Washington, Method 47.021.

Battersby, A. R. and McDonald, E. (1976). Biosynthesis of Porphyrins and Corrin. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B; No. 273: 161-180.

Bauchop, T. & Elsdon, S.R. (1960). The Growth of Microorganisms in Relation to Their energy Supply. Journal of General Microbiology; No. 23: 457-469.

Box, G. E. P.; Hunter, W. G. and Hunter, J. S. (1978). Statistics for Experimenters, Chapter 12. John Wiley & Sons.

Bonartseva, G.A.; Tapytkova, S.D.; Vorob'eva, L.I.; Krainova, O.A. and Bryukacheva, N.L. (1973). The Aerobic Metabolism of Propionic Acid Bacteria. Mikrobiologiya, Vol. 42: 765-771.

Bullerman, L. B. and Berry, E. C. (1966 a). Use of Cheese Whey for Vitamin B-12 Production. I.- Whey Solids and Yeast Extract Levels. Applied Microbiology; Vol. 14, No. 3: 353-355.

Bullerman, L. B. and Berry, E. C. (1966 b). Use of Cheese Whey for Vitamin B-12 Production. II.- Cobalt, Precursor and Aeration Levels. Applied Microbiology; Vol. 14, No. 3: 356-357.

Bullerman, L. B. and Berry, E. C. (1966 c). Use of Cheese Whey for Vitamin B-12 Production. III.- Growth, Studies and Dry-Weight Activity. Applied Microbiology; Vol. 14, No. 3: 358-360.

Burnham, B. F. and Lascelles, J. (1963). Control of Porphyrin Biosynthesis Through a Negative-Feedback Mechanism. Biochem. J., No. 87: 462-472.

Burnham, B. F. (1969). Metabolism of Porphyrins and Corrinoids in Metabolic Pathway. Vol. 3, Chap. 18, pag. 400-

528; Academic Pres.

Burton, K. (1956). Deoxiribonucleic Acid Estimation. *Biochem J.*, Vol. 62: 315-323.

Burton, G.; Jordan, P. M.; Mackenzie, N. E. and Scott, A. I. (1981). Control of Porphyrin Biosynthesis in *Rhodospseudomonas spheroides* and *Propionibacterium shermanii*. *Biochem. J.*; No. 194: 627-631.

Bykhovskii, V. Y. and Zaitseva, N. I. (1976). Study of Biosynthesis of New Tetrapyrrole Compound (Corriphyrin) and Its Role in Biogenesis of Vitamin B-12 in *Propionibacterium shermanii*. *Prikladnaya Biokimiya i Mikrobiologiya*; Vol. 12, No. 3: 365-370.

Conn, E. E. y Stumpf, P. K. (1976). *Bioquímica Fundamental*; Capítulo 9, págs. 258-262; 3a. edición. Editorial Limusa (1976).

Cooney, Ch. L.. Growth of Microorganisms in Rehm, H. J. and Reed, G. (1981). *Biotechnology*, Vol. 1, Chapter 2 pages 75-112. Verlag Chemie

Daniels, H. J. (1970). Some Factors Influencing Vitamin B-12 Production by *Pseudomonas denitrificans*. *Can. J. Microbiol.*; No. 16: 809-815.

Darken, M. (1953). Production of Vitamin B-12 by Microorganisms and Its Occurrence in Plant Tissues. *Botan. Rev.*; Vol. 19, No. 2: 99-130.

Davis, B. D.; Dulbecco, R.; Eisen, H. N.; Ginsberg, H. S. and Wood, W. B. (1980). *Tratado de Microbiología*; capítulo 5, págs. 92-93; 2a. edición. Salvat Editores, S. A.

Delwiche, E. A. & Carson S. F. (1953). Citric Acid Cycle in *Propionibacterium pentosaceum*. *Journal of Bacteriology*; No. 65: 318-321.

De Vries, W. Van Wyck-Kapteyn, W. and Stouthamer, A. H. (1972). Influence of Oxygen on Growth, Cytochrome Synthesis and Fermentation in Propionic Acid Bacteria. *J. Gen. Microbiol.*; Vol. 71: 515-524.

De Vries, W.; Van Wyck-Kapteyn, W. and Stouthamer, A. H. (1973). Generation of ATP During Cytochrome-linked Anaerobic Electron transport in Propionic Acid Bacteria. *J. Gen. Microbiol.*; Vol. 76: 31-41.

Drill (1978). *Farmacología Médica*; capítulo 51, págs. 1044-1056; 2a. edición. La Prensa Médica Mexicana.

Dumenil, G.; Crémieux, A.; Couderc, R.; Chevalier, J.; Guiraud, H. and Ballerini, D. (1979). Production of Vitamin

B-12 by Gram-Variable Methanol-Utilizing Bacteria. Biotechnology Letters; Vol. 1, No. 9: 371-376.

Dumenil, G.; Cremieux, A.; Chevalier, J. and Guiraud, H. (1981). Vitamin B-12 Formation by Gram-Variable Methanol-Utilizing Bacterium. Biotechnology Letters; Vol. 3, No. 6: 285-290.

Fisher, R. A. (1954). Rapid Spectrophotometric Determination of Vitamin B-12 in Microbial Material. Agr. Food Chem. No. 11: 951-953.

Florent, J. and Ninet (1979). Vitamin B-12 in Microbial Technology; No. 1: 497-518.

Friedmann, H. C. and Cagen, L. M. (1970). Microbial Biosynthesis of B-12 -Like Compounds. Annual Review of Microbiology; No. 24: 159-207.

Garcia, H. F. y Pérez, M. J. L. (1983). Fermentación de Desechos Agroindustriales para la Obtención de Metabolitos de Interes Industrial. Bol. Est. Med. Biol., Méx., Suplemento vol. 32: 177-195.

Gibson, K. D.; Matthew, M.; Neuberger, A. and Tait, G. H. (1961). Biosynthesis of Porphyrins and Chlorophylls. Nature; No. 192:204-208.

Gill, J.L. (1978). Design and Analysis of Experiments in the animal and medical science, VII. 1, Chapter 2, secc. 2.2.5. The Iowa State University Press.

Goodman, L. S. y Gilman, A. (1978). Bases Farmacologicas de la Terapéutica; capítulo 64, pags. 1113-1126; 5a. edición. Interamericana.

Granick, K. S. and Beale, S. I. (1978). Hemes, Chlorophylls and Related Compounds: Biosynthesis and Metabolic Regulation. Adv. Enzymol; No. 46: 33-202.

Harvey, S. M.; Collins, A.; Tschudy, D. P. and Rechcigl, M. Jr. (1966). d-Aminolevulinic Acid Synthetase. The Journal of Biological Chemistry; Vol. 241, No. 19: 4323-4329.

Hollriegel, V.; Lam, L.; Rowold, J.; Horig, J. and Ren, P. (1982). Biosynthesis of Vitamin B-12. Arch. Microbiol.; No. 132: 155-158.

Ibragimova, S. I. and Shul'govskaya, E. M. (1979). Growth of Propionibacterium shermanii Cultur Under Various Aerations Conditions Microbiologiya; Vol. 48, No. 4: 668-671.

Ibragimova, S. I.; Shul'govskaya, E. M. and Rabotnova, I. L. (1979) Influence of Aeration on the Retardation of Growth of Propionibacterium shermanii at Various pH. Mikrobiologiya;

Vol. 48, No. 5: 845-848.

Inn Hee Lee, A.G.; Fredrickson and Tsuchiya, H.M. (1974). Growth of *Propionibacterium shermanii*. Applied Microbiology; vol. 28, No. 5: 831-835.

Islas-Murguía, L.; Pérez-Mendoza, J.L. and García-Hernández, F. (1984). Production of Glutamic Acid by Fermentation of an Industrial Waste Product of the Mexican Lime (*Citrus aurantifolia* Swingle). Developments in Industrial Microbiology, chapter 58, Vol. 25: 651-656.

Kamikubo, T. ; Hayashi, M.; Nishio, N and Nagai, S. (1978). Utilization of Non-Sugar Sources for Vitamin B-12 Production. Applied and Environmental Microbiology; Vol. 35, No. 5: 971-973.

Kramli, A. and Vorob'eva, L. I. (1964). Influence of Oxidation-Reduction Conditions on the Formation of Vitamin B-12 by Propionic Acid Bacteria. Microbiologiya; Vol. 33, No. 3: 408-414.

Krieger, J. H. (1973). Chem. & Eng. News.; Vol. 51, No. 11: 16-19).

Labbe, R. F.; Kurumada, T. and Onisawa, J. (1965). The role of Succinyl-CoA Sintetasa in The Control of Heme Biosynthesis. Biochim. Biophys. Acta III; 403-415.

Lamm, L.; Heckmann, G. and Renz, P. (1982). Biosynthesis of Vitamin B-12 in Anaerobic Bacteria. Eur. J. Biochem.; No. 122: 569-571.

Lascelles, J. (1960). The Synthesis of Enzymes Concerned in Bacteriochlorophyll Formation in Growing Cultures of *Rhodospseudomonas spheroides*. J. Gen. Microbiol; No. 22: 487-498.

Lascelles, J. (1961). Synthesis of Tetrapyrrol by Microorganisms. Physiol. Rev.; No. 41: 417-436.

Lascelles, J. and Hatch, T. P. (1969). Bacteriochlorophyll and Heme Synthesis in *Rhodospseudomonas spheroides*: Possible Role of Heme in Regulation of the Branched Biosynthetic Pathway. Journal of Bacteriology; Vol. 98, No. 2: 712-720.

Lehninger, A. L. (1981). Bioquímica; capítulo 13, págs. 354-357 y págs 192 y 343; 2a. edición. Ediciones omega.

Lim, P. G. (1968). Glicine Additive. U.S. Patent 3,411,991; November 19, assigned to Hercules Inc.

Marriott, J.; Neuberger, A. and Tait, G. H. (1969). Control of d-Aminolaevulate Synthetase Activity in *Rhodospseudomonas spheroides*. Biochem. J.; no. 111: 385-394.

Maught, T. H. (1973). Science. Vitamin B-12: After 25 Years, The First Synthesis. Science; Vol. 179: 266-267.

Menon, F. A. and Shemin, D. (1967). Arch. Biochem. and Biophys.; Vol. 121: 304-310.

Metzler, D. E. (1977). Biochemistry the Chemical Reactions of Living Cells; cap. 8, pags. 499-515, 539, 552, 825, 831-832, 837. International Edition Academic Press.

Meyers, F. H.; Jawetz, E. and Golfiend, A. (1980). Farmacologia Clinica; cap. 44, pags. 533-536; 4a. edición. El Manual Moderno, S. A..

Mongomery, D. C. (19). Desdign & Analisis of Experiments. J. Wiley & Sons 2th Edition.

Monod, J. (1949). The Growth of Bacterial Cultures. Ann Rev. Microbial, No. 3: 371-393.

Nishio, N.; Tsuchiya, Y.; Hayashi, M. nd Nagai, S. J. (1977). A Fed-Batch Culture of Methanol-Utilizing Bacteria with pH Stat. Ferment. Technol.; Vol. 55: 151-155.

Note, A. J. ; Van Loesecke, H. W. and Pulley, G. N. (1942). Feed Yeast and Industrial Alcohol. Industrial and Engineering Chemistry. Vo. 34, No. 6: 670-673.

Noyes, R. (1969). Vitamin B-12 Manufacture. Noyes Development Corporation, page 131-136.

Ostle, B. (1978). Estadística Aplicada, capítulo 8 y 11. Editorial Limusa.

Pérez, M. J. L. (1981). Utilización de Productos Industriales del Limón Mexicano por Via Fermentativa para la Producción de Vitamina B-12. Tesis de Maestria, Conafrut.

Perlman, D. (1977). Microbial Production of Therapeutic Compounds. In Henry J. Peppler (editor), Microbial Technology, Chapter 11, page 287.

Perlman, D. and O'Brien, E. (1978). Characteristics of a Cobalt Tolerant Culture of Saccharomyces cerevisiae. J. Bacteriology; Vol. 68: 167-170.

Perlman, D. (1978). Vitamins in Economic Microbiology, Vol. 2; cap. 8, pags. 303-311. Academic Press.

Pritchard, G. G. and Asmundson, R. V. (1978). Aerobic Electron Transport in Propionibacterium shermanii Effects of Cyanide. Arch. Microbiol.; No. 126: 167-173.

Quintero, R. R. (1981). Análisis de Alternativas para la Producción Industrial de Proteína a Partir de Celulosa. En Monroy, O. y Viniegra, G. Biotecnología para el

Aprovechamiento de los Desperdicios Orgánicos, pag. 177-189.
AGT Editor, S. A.

Riley, P. B.; Jackson, P. W.; Ross, D. and Savage, P. A. (1961). Production of Vitamin B-12 and an Analogue by continuous Fermentation Monograph; No. 12: 127-132.

Rodríguez, R. L. and Tait, R. C. (1983). Recombinant DNA Techniques: An Introduction, page 164. Addison-Wesley Publishing Company.

Ronzio, R. A. and Barker, H. A. (1967). Enzymic Synthesis of Guanosine Diphosphate Cobinamide by Extracts of Propionic Acid Bacteria. Biochemistry; Vol. 6, pte. 3: 2344-2354.

Rose, A. H. (1977). Microbiología Química; cap. 3, pages 110-140; 2a. edición. Editorial Alhambra, S. A.

Santana, C. L. A. (1983). Cinética de crecimiento de Propionibacterium shermanii en un Subproducto de la Industria del Limón Mexicano. Tesis de Licenciatura, ENEP-Zaragoza, UNAM.

Santana, C. L. A. ; Pérez, M. J. L. and García, H. F. (1985). Production of Vitamin B-12 by Fermentation of an Industrial Waste-Product of the Mexican Lime (Citrus aurantifolia Swingle). I. Fermentation Kinetics of Propionibacterium shermanii ATCC 13673. Developments in Industrial Microbiology. Chapter 64, pag. 769-780.

Scott, A. I. (1975). Concerning the Biosynthesis of Vitamin B-12. Ann N. Y. Academic Sci.; No. 244: 356-370.

Sone, N. (1972). The Redox Reactions in propionic Acid Fermentation. I.- Occurrence and Nature of a Electron Transfer System in Propionibacterium arabinosum. J. Biochem.; No. 71: 931-940.

Speedie, J. and Hull, G. British Process U.S. Patent 2,951,017; august 30, 1960 asiged to the Distillers Company Limited.

Stanier, R. V.; Doudoruff, M. and Adelberg, E. A. (1970). The Microbial World, Chapter 9, pages 298-324, 3th edition. Prentice-Hall, Inc.

Sudarsky, J. and Fisher, R. Molasses and Waste Brewer's Yeast U.S. Patent 2,816,856; December 17, 1957 assigned to Pacific Yeast Products, Inc.

Ting, S. V. (1956). Rapid Colorimetric Methods for Simultaneous Determination of Total Reducing Sugar and Fructose in Citrus Juices. Agricultural and Food Chem. No. 4: 363-366.

Toraya, T.; Yongsmith, B.; Tanaka, A. and Fukui, S. (1976). Vitamin B-12 Production by a Methanol-Utilizing Bacterium. Appl. Microbiol.; Vol. 30, No. 3: 477-479.

Toraya, T.; Yongsmith, B.; Honda, S.; Tanaka, A. and Fukui, S. (1976). J. Ferment. Technol.; No. 54: 102-108.

Tschudy, D. P.; Welland, F. H. and Hunter, G. (1964). Metabolism, Vo. 13: 396.

Tsuchiya, Y.; Nishio, N. and Nagai, S. (1980). Vitamin B-12 Production from Methanol by Continuous Culture of *Pseudomonas AM-1*. J. Ferment. Technol.; Vol. 58, No. 5: 485-487.

Viniegra, G. C. (1981). Consideraciones Económicas Sobre el Aprovechamiento de los Desperdicios Agrícolas, Ganaderos y Agroindustriales. En Monroy, O. y Viniegra, G. Biotecnología para el Aprovechamiento de los Desierdicios Orgánicos, pag. 19-29. AGT Editor, S. A.

Vorob'eva, L. I. and Kuznetsova, U. S. (1964). Effect of MnSO₄ on Vitamin B-12 Production by Propionic Acid Bacteria. 4 Microbiologiya; Vol. 33, No. 1: 26-30.

Wang, D. I. C.; Cooney, Ch. L.; Demain, A. L.; Dumenil, P.; Humphrey, E. and Lilly, M. D. (1979). Fermentation and Enzyme Technology, Chapter 6, pages 57-97. John Wiley & Sons, Inc.

Wood, H. G.; Andersen, A. A. & Werkman, C. H. (1938). Nutrition of the Propionic Acid Bacteria. J. Bacteriology Vol. 36: 201-214.

Yamane, T.; Kishimoto, M and Yashida, F. (1976). J. Ferment. Technol.; No. 54: 229-240.

Yongsmith, B. and Chutima, K. (1983). Production of Vitamin B-12 by Living Bacterial Cells Immobilized in Calcium Alginate Gels. J. Ferment. Technol.; Vol. 61, No. 6: 593-598.

Zodrow, K. and Stefaniak, O. (1963a). Effect of Temperature on the Growth and the production of Corrinoids by *Propionibacterium shermanii*. Acta Microbiologica Polonica; Vol. 12: 271-279.

Zodrow, K.; Stefaniak, O.; Chelkowski, J. and Szczepska, K. (1963b). Influence of Ca-Pantothenate and Biotin on the Growth and Biosynthesis of Corrinoids by *Propionibacteria*. Acte Microbiologica Polonica; Vol. 12.

Zodrow, K.; Chelkowi, J.; Stefaniak, O and Czarnecka, D. (1963c). The Effect of Different Casein Hidrolysates on the Growth and Biosynthesis of Corrinoids by *Propionibacteria*. Acta Microbiologica Polonica; Vol. 12: 287-289.

Zodrow, K. and Zodrow, H. (1963d). Studies on the Effect of 5,6-dimethylbenzimidazole on the Biosynthesis of Corrinoids

by Propionibacteria. Acta Microbiologica Polonica, Vol.12:
61-68.