

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



OBTENCIÓN DE RIBOFLAVINA (VITAMINA B₂), POR PROCESO DE
FERMENTACIÓN SUMERGIDA EN MEDIO DE PRODUCCIÓN DE AGUA DE
COCIMIENTO DE MAÍZ Y ACEITE DE SOYA UTILIZANDO COMO
MICROORGANISMO PRODUCTOR *Saccharomyces cerevisiae*.

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR
CARLOS ALBERTO BUSTILLO MEJÍA.
ERICK ADALBERTO ROMERO CAMPOS.

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIATURA EN QUÍMICA Y FARMACIA

SEPTIEMBRE DE 2008

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMÉRICA.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MSc. RUFINO QUEZADA SÁNCHEZ

SECRETARIO GENERAL

LIC. DOUGLAS VLADIMIR ALFARO CHÁVEZ

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

DECANO

LIC. SALVADOR CASTILLO ARÉVALO

SECRETARIA

MSc. MORENA LIZETTE MARTÍNEZ DE DÍAZ

COMITÉ DE TRABAJO DE GRADUACIÓN

COORDINADORA GENERAL

Lic. María Concepción Odette Rauda Acevedo

ASESORA DE ÁREA DE APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES

MSc. Coralia de los Ángeles González de Díaz

ASESORA DE ÁREA DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE ALIMENTOS

MSc. María Evelyn Sánchez de Ramos

DOCENTE DIRECTORA

Lic. María Elsa Romero de Zelaya

AGRADECIMIENTOS

A NUESTRO DOCENTE DIRECTOR:

Licda. María Elsa Romero de Zelaya, por su asesoría, tiempo, apoyo, paciencia y dedicación para la realización de este trabajo.

A LA COORDINADORA GENERAL Y ASESORAS DE ÁREAS

Licda. María Odette Rauda, MSc María Evelyn Sánchez de Ramos, MSc Coralía de los Ángeles González de Díaz. Por sus observaciones y recomendaciones las cuales ayudaron a la realización del trabajo de investigación.

A todas las personas que de una u otra forma contribuyeron a la elaboración de esta investigación. Nuestros más sinceros agradecimientos.

DEDICATORIA

- A DIOS TODO PODEROSO

Quien fue mi constante apoyo en los momentos en que todo parecía perdido y por nunca dejarme solo.

- A MIS PADRES

José Oscar Romero Pineda y Ana Julia Campos Ramírez por la paciencia y apoyo que me brindaron, a ellos dedico este triunfo.

- A MIS HERMANOS

Karina Yamileth Hernández y José Oscar Ernesto Romero por todos las veces que estuvieron a mi lado en los momentos que mas los necesitaba

- A MI ESPOSA E HIJO

Yamileth Canales Fuentes quien estuvo a mi lado en los momentos que más la necesitaba

- A MI COMPAÑERO DE TESIS

Carlos Alberto Bustillo por compartir el mismo objetivo y su amistad de muchos años.

- A MI FAMILIA

Quienes me acompañaron en toda mi carrera y en especial a mi tía Fidelia Romero Pineda por su apoyo incondicional muchas gracias.

Erick Adalberto Romero Campos.

DEDICATORIA

– **A DIOS TODO PODEROSO,**

Que permanece siempre en mi corazón y en mi vida para darme apoyo y sostenerme en la vida.

– **A MIS PADRES,**

Juan Carlos y María Emilia, son el mejor regalo que DIOS me ha dado, gracias por su incondicional amor y apoyo para culminar mi carrera.

– **A MIS HERMANOS,**

Karla María y Juan Ramón, mi éxito también es de ustedes, Gracias por cada momento que hemos compartido en la vida.

– **A MI ESPOSA E HIJO,**

Por comprenderme y darme el apoyo y empuje necesario para finalizar mi carrera y superar los imprevistos que nos proporciona la vida.

– **A MI COMPAÑERO DE TESIS,**

Erick Adalberto Romero, por compartir un mismo objetivo en la vida, y superar nuestras propias barreras.

– **AL PERSONAL DE MICROBIOLOGÍA,**

Por su paciencia y apoyo incondicional en el desarrollo de esta investigación y contribuir a mi formación profesional.

Carlos Alberto Bustillo Mejía

INDICE**CONTENIDO****PAGINA****RESUMEN****CAPÍTULO I****1.0 INTRODUCCION**

xxii

CAPÍTULO II**2.0 OBJETIVOS**

25

2.1 Objetivo General

25

2.2 Objetivo Especifico

25

CAPÍTULO III**3.0 MARCO TEORICO**

27

3.1 Vitaminas

27

3.1.1 Vitamina B₂

28

3.1.2 Estructura Química

30

3.1.3 Características y Propiedades Físicas y Químicas

32

3.1.4 Métodos de Producción de Vitamina B₂

33

3.2 Aceite vegetal

33

3.2.1 Fuentes

33

3.2.2 Soya

34

3.2.3 Aceite de Soya

35

3.3 Maíz	37
3.3.1 Agua de cocimiento de Maíz	37
3.3.2 Valor nutricional del agua de Maíz	39
3.4 Levaduras	40
3.4.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	44
3.4.2 Estructura química de levaduras	45
3.5 Fermentación	46
3.6 Cinética de crecimiento Microbiano	49
3.7 Factores que Afectan la Rapidez de Crecimiento	52
3.8 Evaluación de la Cinética de Crecimiento Microbiano	52
3.8.1 Crecimiento de Microorganismos	
3.8.1.1 Velocidad Volumétrica de Generación de Células Microbianas por peso seco	53
3.8.1.2 Velocidad Específica de Generación de células Microbianas por peso seco	53
3.8.2 Consumo de Nutrientes	54
3.8.2.1 Velocidad Volumétrica de consumo de Sustrato	54
3.8.2.2 Velocidad específica de Consumo de Sustrato	54
3.8.3 Formación de Producto	
3.8.3.1 Velocidad Volumétrica de Formación de Productos	55
3.8.3.2 Velocidad Específica de Formación de Productos	55

3.8.4 Rendimiento en el Cultivo	56
4.0 DISEÑO METODOLOGICO	58
4.1 Tipo de Estudio	58
4.2 Investigación Bibliográfica	58
4.3 Investigación de Campo	59
4.4 Parte Experimental	59
4.4.1 Procedimiento para adaptar la Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> al medio de Producción	59
4.4.2 Metodología para preparar el Medio de Fermentación	60
4.4.3 Composición del Medio de Fermentación	60
4.4.4 Preparación del Biorreactor	61
4.4.5 Producción y Determinación de Riboflavina	61
4.4.6 Determinaciones Analíticas	62
4.4.6.1 Determinación de Biomasa por el Método de Peso Seco	62
4.4.6.2 Determinación de pH	63
4.4.6.3 Determinación de Grados Brix	64
4.4.6.4 Elaboración de Curva Estándar de Glucosa	64
4.4.6.5 Determinación de Azúcares Totales Método Fenol-Sulfúrico	64

4.4.6.6 Fluorescencia de Riboflavina Obtenida en el Medio de Producción	65
4.4.6.7 Método Espectrofotométrico para cuantificar Riboflavina (Vitamina B ₉)	65
5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	69
5.1 Resultados de Procesos Experimentales Ensayos 1,2 y 3	69
5.2 Velocidad Volumétrica de Biomasa por peso seco	81
5.3 Velocidad Específica de Biomasa por peso seco	83
5.4 Velocidad Volumétrica de Consumo de Sustrato	89
5.5 Velocidad Específica de Consumo de Sustrato	91
5.6 Cálculo de Concentración de Vitamina B ₂ por el método Espectrofotométrico	93
5.7 Velocidad Volumétrica de Producción de Vitamina B ₂	95
5.8 Velocidad Específica de Formación de Vitamina B ₂	97
5.9 Rendimiento en el Cultivo	99
CAPÍTULO IV	
6.0 CONCLUSIONES	103
CAPÍTULO V	
7.0 RECOMENDACIONES	106
BIBLIOGRAFIA	107
ANEXOS	

INDICE DE TABLAS

TABLA N°	PAGINA
1: Resultados de Biomasa en Ensayos 1,2 y 3.	69
2: Resultados Promedios de Biomasa en Ensayos 1,2 y 3.	70
3: Resultados de pH en Ensayos 1,2 y 3.	71
4: Resultados Promedios de pH en Ensayos 1,2 y 3.	72
5: Resultados de Grados Brix en Ensayos 1,2 y 3.	73
6: Resultados Promedios de Grados Brix en Ensayos 1,2 y 3.	74
7: Resultados de Concentración de Azucares Totales en Ensayos 1,2 y 3.	75
8: Resultados Promedios de Concentración de Azucares Totales en Ensayos 1,2 y 3.	76
9: Resultados de Identificación de Vitamina B ₂ por Fluorescencia en Cámara UV.	77
10: Resultados de Concentración de Vitamina B ₂ en Ensayos 1,2 y 3	78
11: Resultados Promedios de Concentración de Vitamina B ₂ en Ensayos 1,2 y 3.	79
12: Resultado del Análisis de Muestras por el Método de peso seco durante el Proceso de Producción de Vitamina B ₂ .	80
13: Resultado de Velocidad Volumétrica de Biomasa por	

peso seco durante el proceso de Producción de Vitamina B ₂ .	82
14:Resultado de Velocidad Especifica de Biomasa por peso seco durante el proceso de Producción de Vitamina B ₂ .	83
15:Resultado de Curva Estándar de Glucosa Mediante Aplicación del Método Fenol-Sulfúrico para Cuantificación de Azucares Totales.	84
16:Resultado de Aplicación de Regresión Lineal al Análisis de Muestras por Método Fenol-Sulfúrico para Cuantificación de Azucares Totales.	86
17:Aplicación de Regresión Polinomial a los Resultados del Análisis de Muestras para Cuantificación de Azucares Totales.	87
18:Resultado de Velocidad Volumétrica de Consumo de Sustrato durante el proceso de Producción de Vitamina B ₂ .	89
19:Resultado de Velocidad Especifica de Consumo de Sustrato durante el proceso de Producción de Vitamina B ₂ .	90
20:Resultado Concentración de Vitamina B ₂ . durante el proceso de Producción.	93
21:Resultado de Velocidad Volumétrica de Producción de Vitamina B ₂ .	95
22:Resultado de Velocidad Específica de Producción de Vitamina B ₂ .	97
23:Resultado de Rendimiento de Vitamina B ₂ en	

el Medio de Producción 99

INDICE DE ANEXOS

ANEXOS N°		PAGINA
1.0	Reactivos	112
2.0	Cristalería	114
3.0	Equipo	116
4.0	Técnica de Fermentación	118

INDICE DE FIGURAS

FIGURA N°	PAGINA
1: Estructura de riboflavina	30
2: Estructura de riboflavina, FAD y FMN.	31
3: Curva de crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	49
4: Curva de resultados de Biomasa por peso seco (g/L) Vrs Tiempo (horas) para ensayos de producción de vitamina B ₂ .	68
5: Determinación promedio de tres ensayos de Biomasa g/L Vrs Tiempo (horas) durante la producción de vitamina B ₂ .	69
6: Curva de resultados de pH Vrs Tiempo (horas) para ensayos de producción de vitamina B ₂ .	70
7: Determinación promedio de tres ensayos de pH Vrs Tiempo (horas) durante la producción de vitamina B ₂ .	71
8: Curva de resultados de grados Brix Vrs Tiempo (horas) para ensayos de producción de vitamina B ₂ .	72
9: Determinación promedio de tres ensayos de grados brix Vrs Tiempo (horas) durante la producción de vitamina B ₂ .	73
10: Curva de resultados de concentración de azúcares totales (mg/ml) Vrs Tiempo (horas) para ensayos de	

producción de vitamina B ₂ .	74
11:Determinación promedio de tres ensayos de la [] de azúcares totales (mg/ml) Vrs Tiempo (horas) durante la producción de vitamina B ₂ .	76
12:Grafica de resultados de Fluorescencia Vrs Tiempo (horas) para ensayos de producción de vitamina B ₂ .	77
13:Curva de resultados de concentración de riboflavina (mg/L) Vrs Tiempo (horas) durante la producción de vitamina. B ₂ .	78
14:Determinación promedio de tres ensayos de concentración de riboflavina (mg/L) Vrs Tiempo (horas) durante la producción de vitamina B ₂ .	79
15:Curva Ln de Biomasa mg/ml Vrs. Tiempo (horas) para la producción de vitamina B ₂ .	80
16:Curva de Velocidad Volumétrica de Biomasa (g/Lh) Vrs. Tiempo (horas) para producción de vitamina B ₂ .	82
17:Curva de Velocidad Especifica de Biomasa (g/Lh) Vrs. Tiempo (horas) para producción de vitamina B ₂ .	84
18:Curva Estándar de Glucosa	86
19:Curva de Concentración de Azúcares en Muestra (mg/ml) Vrs. Tiempo (horas)	87
20:Curva de Velocidad Volumétrica de Consumo de Sustrato (g/Lh) Vrs. Tiempo (horas) para la producción de	

vitamina B ₂ .	90
21:Curva de Velocidad Específica de Consumo de Sustrato (g/Lh) Vrs. Tiempo (horas) para la producción de vitamina B ₂ .	92
22:Concentración de Vitamina B ₂ (mg/L) Vrs. Tiempo (horas). 94	
23:Curva de Velocidad Volumétrica de producción de Vitamina (g/Lh) Vrs. Tiempo (horas) para la producción de Vitamina B ₂ .	96
24:Curva de Velocidad Específica de producción de Vitamina B ₂ (g/Lh) Vrs. Tiempo (horas) para la producción de Vitamina B ₂ .	98
25:Curva de rendimiento de producción de vitamina B ₂ en el cultivo Vrs Tiempo (horas).	100

INDICE DE CUADROS

CUADRO N°	PAGINA
1: Clasificación taxonómica de la soya.	35
2: Composición del aceite de soya.	36
3: Elementos Químicos contenidos en las cenizas de una plata de maíz.	40
4: Constituyentes normales referidas a la materia seca de la levadura.	44
5: Clasificación taxonómica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	46

ABREVIATURAS

°C: Grados Centígrados

Lb.: Libras

C.S.P: Cantidad Suficiente Para

mL: Mililitros

t: Tiempo

g: Gramos

L: Litros

h: Horas

rpm: Revoluciones por Minuto

nm: Nanometros

µg: Microgramos

mg: Miligramos

M_x: Muestra

St: Estándar

C: Concentración

Abs.: Absorbancia.

RESUMEN

El presente trabajo consta en la investigación, de obtención de riboflavina (vitamina B₂), a través de proceso biotecnológico de fermentación en medio de producción de agua de cocimiento de maíz y aceite de soya utilizando como microorganismo productor ***Saccharomyces cerevisiae***.

La presente investigación es de carácter retrospectivo – prospectivo y experimental.

Retrospectivo por que toma en cuenta investigaciones ya antes realizados; prospectivos por que es una base para futuras investigaciones acerca del tema.

Fue analítico - experimental ya que se tuvieron datos experimentales que posteriormente fueron analizados. La investigación se llevo a cabo en tres etapas: investigación bibliográfica, investigación de campo y parte experimental.

El microorganismo utilizado en la investigación cinética de producción de vitamina B₂ pertenece al grupo de levaduras (***Saccharomyces cerevisiae***) la cual puede ser de fácil adquisición.

Se experimento con tres medios de fermentación A, B, C cada uno con la misma composición y bajo las mismas condiciones experimentales de fermentación esto con el fin de tener una muestra constante de la producción de vitamina B₂ (Riboflavina). A cada una de las muestras se les determino pH,

grados Brix, biomasa (peso seco) azúcares totales (fenol-sulfúrico) producción de vitamina B₂.

Se llegó a la conclusión que el agua de cocimiento de maíz enriquecida con aceite de soya es un medio de fermentación adecuado para la ***Saccharomyces cerevisiae***, ya que nos permitió adquirir los sustratos necesarios que son transformados en energía produciendo el anabolismo como proceso enzimático microbiano; el cual, durante la oxidación aeróbica por el proceso de biosíntesis alcanza su máxima producción de riboflavina a lo 72 h, obteniendo un valor de 2.48mg/L. por método espectrofotométrico, el cual también se comprobó por el método UV observando la fluorescencia.

La ***Saccharomyces cerevisiae*** es un microorganismo productor de vitamina B₂ que bajo condiciones fermentativas apropiadas de temperatura ambiente, pH de 4.5, nutrientes como glicina y aceite de soya, producirán la vitamina B₂ a las 72 horas. El proceso cinético en obtención de vitamina B₂ se lleva a cabo favorablemente en aerobiosis; la cual dura 72 horas.

Se recomienda que se sigan realizando investigaciones de vitamina B₂ y se lleve a la práctica esta investigación ya que en el país no se produce esta vitamina a nivel industrial y dependemos de proveedores extranjeros para la utilización de la vitamina B₂, con esta finalidad se realizó este trabajo de investigación.

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCION

En esta investigación se realizaron una serie de ensayos para la obtención de riboflavina ó vitamina B₂ mediante un método de biosíntesis alternativo, como es la utilización de la biotecnología microbiana, que es la disciplina que se refiere al uso de los organismos o de sus productos en procesos industriales para proveer bienes y servicios. A nivel nacional no existe una industria que desarrolle procesos para la obtención de riboflavina ó vitamina B₂.

Se realizo un ensayo para la obtención de riboflavina (vitamina B₂) utilizando un método de fermentación biotecnológico. En la fermentación se tomaran en cuenta las siguientes condiciones: aireación, agitación, pH. El medio de producción será; agua de cocimiento de maíz, enriquecido con aceite de soya, y como microorganismo productor la levadura ***Saccharomyces cerevisiae***. Los cuales sirven como medio de producción en la fermentación. Contribuyendo a la formación de metabolitos o sustancias de interés en las áreas de medicina e industria alimenticia, así como la biofarmacia.

Las vitaminas son consideradas como compuestos orgánicos esenciales en el metabolismo y necesarios para el crecimiento y, en general para el buen funcionamiento del organismo.

La riboflavina llamada vitamina B₂, Lactoflavina, Vitamina G, es la 6,7-dimetil-9-(1-D-ribitol)-isoaloxazina, su formula es C₁₇H₂₀N₄O₆ con un peso molecular de

376.36 g/mol (Ver Fig. N° 1), consiste en un anillo isoaloxacina heterocíclica adherido al alcohol del azúcar ribitol. ⁽⁸⁾

La riboflavina constituye el grupo prostético activo del flavina-adenina-dinucleótido (FAD) y flavina-mono-nucleótido (FMN), coenzimas que transportan el hidrógeno-sustrato en la cadena respiratoria y que constituyen los pigmentos amarillos. (Ver Fig. N° 2) ⁽⁷⁾

La riboflavina puede ser obtenida por biosíntesis sometiendo medios nutritivos escogidos a fermentación por cultivos puros de varios microorganismos. ⁽⁸⁾

Se conocen tres grupos de microorganismos que sintetizan riboflavina en cantidades importantes:

- Bacterias del grupo butanol-acetona, del que el representante principal es el ***Clostridium acetobutylicum***.
- Ciertas levaduras del género Cándida.
- Dos hongos afines a las levaduras; ***Eremothecium ashbyii*** y ***Ashbya gossypii***. ⁽⁸⁾

La riboflavina es un polvo cristalino amarillo o amarillo anaranjado, que posee un leve olor, punto de fusión de 280 °C, soluble en agua en una proporción de 5.5mg-33.3mg en 100 ml. de agua; pero insoluble en acetona, cloroformo, etanol y benceno. ⁽⁸⁾

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Obtención de riboflavina (Vitamina B₂), por el proceso de fermentación sumergida en medio de producción de agua de cocimiento de maíz y aceite de soya utilizando como microorganismo productor *Saccharomyces cerevisiae*.

2.2 Objetivos específicos

- 2.2.1 Recolectar de la industria alimenticia agua de cocimiento de maíz y esta enriquecerla con aceite de soya, para usarlo como medio de producción en la obtención de metabolitos de interés como es la vitamina B₂.
- 2.2.2 Optimizar las condiciones de la cinética de crecimiento microbiana en el proceso de fermentación sumergida para la obtención de la vitamina B₂.
- 2.2.3 Identificar la vitamina B₂ obtenida en el caldo de producción por fluorescencia en cámara UV.
- 2.2.4 Cuantificar la vitamina B₂ obtenida en el caldo por el método oficial espectrofotométrico.

CAPITULO III
MARCOTEORICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1 VITAMINAS

Las vitaminas son consideradas como compuestos orgánicos esenciales en el metabolismo y necesarios para el crecimiento y, en general para el buen funcionamiento del organismo.

Aunque se tenga una dieta rica en otros nutrientes es necesario, abastecer al organismo de cantidades adecuadas de vitaminas ya que su carencia provoca ciertas manifestaciones químicas que no pasan desapercibidas, así mismo, las vitaminas están relacionadas con la fusión de las enzimas, ya que inician y catalizan las reacciones químicas; sin embargo, se conoce claramente que varias vitaminas solo actúan en combinación con ciertas proteínas específicas y forman en este caso enzimas. ⁽⁸⁾

Algunas vitaminas forman complejos enzimáticos e intervienen en el metabolismo de los hidratos de carbono; ejemplo: vitamina B₁ y B₂. ⁽⁸⁾

Las levaduras son organismos autónomos que poseen un metabolismo complicado y contienen un número de vitaminas como: B₁ (tiamina), B₂ (riboflavina o lactoflavina), B₃ (factor de crecimiento de las aves), B₄ (factor antiparalítico), B₅ (vitamina entera), nicotinamida, ácido fólico, Inocitol, colina, y B-Caroteno. Las vitaminas de importancia para las levaduras son: B₁, B₂, B₆, nicotinamida, ácido pantoténico, ácido fólico y la pro-vitamina D₂ y D₃. ⁽⁸⁾

3.1.1 VITAMINA B₂

Desde 1879 en adelante se han aislado series de compuestos con pigmento amarillo a partir de diversas fuentes y se han denominado flavinas, con un prefijo que indica la fuente (Ej. Lacto, ovo y hepato). Después se ha demostrado que esas diversas flavinas tienen idéntica composición química. ⁽⁸⁾

Warburg y Cristian (1932) describieron una enzima respiratoria amarilla en las levaduras, posteriormente en 1933 Kuhn aisló por primera vez la riboflavina de la clara de huevo. La porción del pigmento amarillo en la enzima fue identificado como vitamina B₂ (ver figura N° 1). Su nombre deriva de la pigmentación amarilla que corresponde a la designación de flavina y Ribo, a raíz de la presencia de ribosa en su estructura. ⁽⁸⁾

La síntesis de riboflavina por microorganismos puede ser dividida según el grado de acumulación de la vitamina; así se encuentran superproducciones débiles, moderadas y fuertes, tal como la presentan varias bacterias, algunas levaduras y hongos (Presscott, Dunn 1962). ⁽⁷⁾

La vitamina B₂ (riboflavina) proporciona energía al interior de las células y se necesita para producir enzimas decisivas en la liberación de la energía que tienen las grasas, los carbohidratos y las proteínas que ingerimos de los alimentos. ⁽¹⁴⁾

Esta vitamina hidrosoluble es vital para el crecimiento e importante en la reproducción celular y ayuda a producir glóbulos rojos sanos. Mantiene además, la buena salud de la piel, las uñas y el cabello. Incluso es muy

probable que ayude a la memoria ya que las personas mayores que tienen niveles normales de vitamina B₂, mantienen vivos sus recuerdos. ⁽¹⁴⁾

Así mismo ayuda al sistema inmunológico manteniendo en buen estado las membranas mucosas que forman el aparato respiratorio y el digestivo. Conserva además el estado de las superficies húmedas del cuerpo como los ojos, la boca, la lengua y la vagina. ⁽¹⁴⁾

Durante el embarazo, comer alimentos que contienen vitamina B₂, evita la malformación ósea y los trastornos en el desarrollo cerebral del feto. Beneficia también a los ojos, ya que oxigena la córnea y alivia la fatiga de éstos. ⁽¹⁴⁾

La carencia de esta vitamina, muy frecuente entre adolescentes, embarazadas, ancianos y deportista; afecta también a quién usa de manera prolongada anticonceptivos y/o antidepresivos. Cuantas más calorías se agreguen a la dieta, más riboflavina necesita el cuerpo. ⁽¹⁴⁾

El Dietary Allowances Committe del National Research Council recomienda ingestión de riboflavina de 0.6 mg/1000 Kcal., que es equivalente alrededor de 1.6 mg/día para varones adultos jóvenes, y de 1.2 mg/día para mujeres adultas jóvenes. En ancianos se recomienda que el consumo no sea menor de 1,2 mg/día, incluso cuando la ingestión de calorías disminuye por debajo de 2,000 Kcal. El recambio de riboflavina parece relacionarse con el gasto de energía, y los periodos de actividad física aumentada se relacionan con incremento moderado del requerimiento.

Hay síntomas muy concretos que pueden hacer sospechar una carencia de la vitamina B₂: Sensación de falta de energía, nerviosismo y depresión, temblores, debilidad muscular y mareos. ⁽¹⁴⁾

La carencia genera trastornos oculares, bucales y cutáneos. Bucleles: inflamación de la comisura de la boca, labios resecos, lisos y brillantes, inflamación de la lengua (glositis) y dolor de garganta. ⁽¹⁴⁾

Cutáneos: dermatitis seborreica o caída del cabello por enfermedad de la piel (alopecia). Otros síntomas son la anemia, la cicatrización lenta y la fatiga.

A su vez, la carencia de esta vitamina puede ser causa de regímenes alimenticios no balanceados (exceso de proteína o exceso de alimentos refinados como pan blanco, bollería refinada, etc.), en casos de alcoholismo crónico, diabetes, hipertiroidismo, exceso de actividad física, estados febriles prolongados, lactancia artificial, estrés, calor intenso y el uso de algunas drogas. ⁽¹⁴⁾

La riboflavina tiene fuerte demanda en la industria farmacéutica, para fines terapéuticos se administra riboflavina USP por vía oral e intramuscular como solución acuosa estéril a la que se añade niacinamida u otro agente solubilizante. También incorpora en todos los complejos de vitamina B y en la mayor parte de las preparaciones multivitaminicas. ⁽⁸⁾

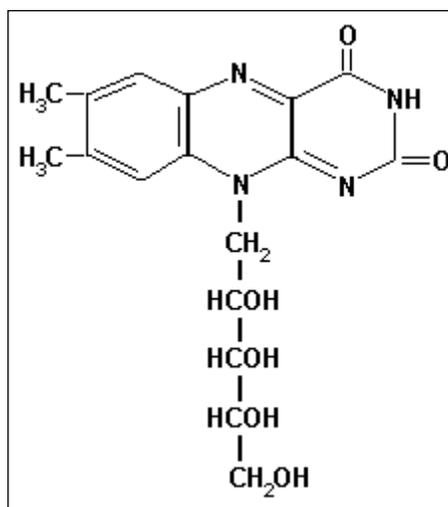


Fig. N° 1: Estructura de riboflavina (7).

3.1.2 ESTRUCTURA QUÍMICA

La riboflavina llamada vitamina B₂, Lactoflavina, Vitamina G, es la 6,7-dimetil-9-(1-D-ribitol)-isoaloxazina, su fórmula es C₁₇H₂₀N₄O₆ con un peso molecular de 376.36 g/mol (Fig. N° 1), consiste en un anillo isoaloxacina heterocíclica adherido al alcohol del azúcar ribitol. (8)

La riboflavina constituye el grupo prostético activo del flavina-adenina-dinucleótido (FAD) y flavina-mono-nucleótido (FMN), coenzimas que transportan el hidrógeno-sustrato en la cadena respiratoria y que constituyen los pigmentos amarillos. (Ver Fig. N° 2) (7)

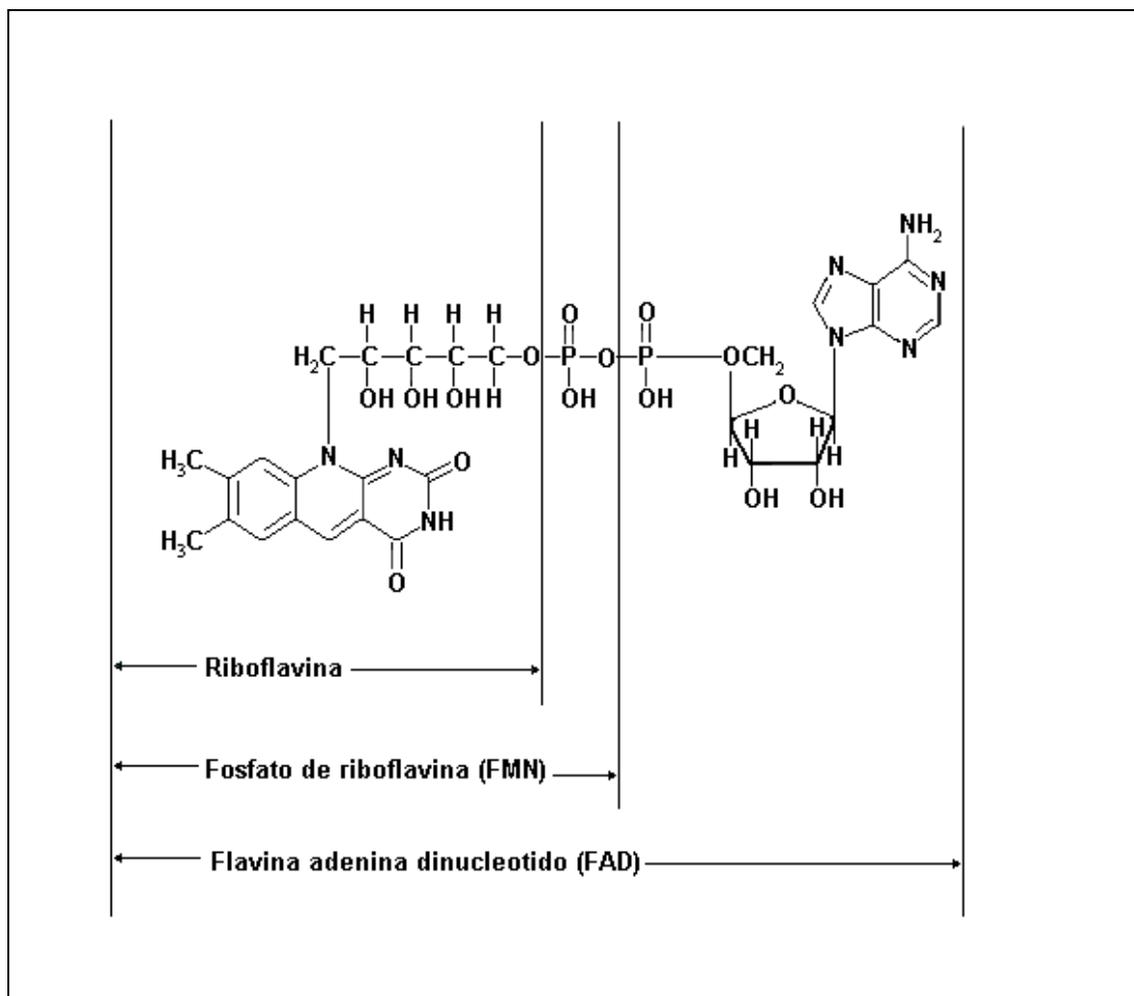


Fig. N° 2: Estructura de la riboflavina, FAD y FMN ⁽⁷⁾

3.1.3 CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

La riboflavina es un polvo cristalino amarillo o amarillo anaranjado, que posee un leve olor, punto de fusión de 280 °C, soluble en agua en una proporción de 5.5mg-33.3mg en 100 ml. de agua; pero insoluble en acetona, cloroformo, etanol y benceno. ⁽⁸⁾

3.1.4 MÉTODO DE PRODUCCIÓN DE VITAMINA B₂

La riboflavina puede ser obtenida por biosíntesis sometiendo medios nutritivos escogidos a fermentación por cultivos puros de varios microorganismos. ⁽⁸⁾

Se conocen tres grupos de microorganismos que sintetizan riboflavina en cantidades importantes:

- Bacterias del grupo butanol-acetona, del que el representante principal es el ***Clostridium acetobutylicum***.
- Ciertas levaduras del género *Cándida*.
- Dos hongos afines a las levaduras; ***Eremothecium ashbyii* y *Ashbya gossypii***. ⁽⁸⁾

3.2 ACEITE VEGETAL

El aceite vegetal es un compuesto orgánico obtenido a partir de semillas u otras partes de las plantas en cuyos tejidos se acumula como fuente de energía. Algunos no son aptos para consumo humano, como el de colza, castor o algodón. Como todas las grasas está constituido por glicerina y tres ácidos grasos. ⁽¹⁶⁾

3.2.1 FUENTES.

El aceite vegetal puede provenir de frutos o semillas como: Aceituna (fruto del olivo),Soya, Palma, tanto del fruto como del hueso, Sésamo, Girasol, Arroz, Maíz, Lino, Cáñamo, Almendra y Nuez. ⁽¹⁶⁾

3.2.2 SOYA.

La soya cuyo nombre científico es *Glycine max*, es originaria de Asia oriental. Su cultivo se remonta a unos 3000 años, cuando campesinos chinos comenzaron a sembrar granos silvestres. En el año 1100 a.c. la soya domesticada producía granos más grandes y útiles que los silvestres. (4)

La presencia de la soya en occidente fue registrada por primera vez en 1712 por el botánico alemán Engelbert Kaempfer, quien descubrió la planta en Japón. En 1765 el marino inglés Samuel Bowen la introdujo al nuevo mundo a su regreso a China. Durante los siguientes años la soya solo representó una curiosidad botánica. (4)

En la penúltima década del siglo XIX científicos franceses informaron sobre el bajo contenido de almidón del frijol de soya. Así en los años siguientes se realizaron diferentes investigaciones, entre las que figuran la digestibilidad, aporte de aminoácidos, vitaminas, minerales, equilibrio acidez-alcalinidad y propiedades alergénicas; contenido de sal, grasas, colesterol, antibióticos, y hormonas. (4)

Cuadro N° 1: Clasificación taxonómica de la soya:

Reino-----	Vegetal.
División-----	Antofita.
Sub.-división -----	Angiosperma.
Clase-----	Dicotiledóneas.
Sub-clase -----	Dipétalas.
Orden-----	Rosales.
Familia-----	Leguminosas.
Sub-familia-----	Papilionáceas.
Genero-----	Glicine.
Especie-----	Max.

Existen aproximadamente unas 600 variedades de semillas de soya, muchas de las cuales aun no están clasificadas, por lo general se distinguen por su forma, color o bien por la duración del ciclo de vida. (4)

3.2.3 ACEITE DE SOYA.

El aceite es extraído por diversidad de métodos, de las semillas de las diferentes variedades de ***Glicyne max*** el color puede variar desde verde anaranjado hasta amarillo claro. En el cuadro que a continuación se presenta detalla la composición del aceite bruto. (4)

Cuadro N° 2: Composición del aceite de soya.

INGREDIENTES	PORCENTAJE %
Ácido Mirístico	0.10
Ácido Tetradecenoico	0.10
Ácido Laurico	0.20
Ácido Hexadecenoico	0.40
Ácido Araquidónico	0.90
Ácido Esteárico	2.40
Ácido Linolénico	6.50
Ácido Palmítico	9.80
Ácido Oleico	28.30
Ácido Linoleico	50.70

El aceite de soya, además contiene esteroides y estero glucósidos siendo los principales el estigmasterol y sis-tosterol. ⁽⁴⁾

Al utilizar el método de extracción por solventes se puede recuperar hasta el 98% del aceite presente en la semilla de soya, en comparación con el 80% que puede obtenerse por prensas hidráulicas y expresión. La estructura física de la semilla de soya la hace muy apta a la extracción por solventes. En muchos casos se combinan los métodos de expresión y solventes. ⁽⁴⁾

Los solventes de extracción más usados son: n-hexano, acetona y éter de petróleo. Luego de la extracción se procede a remover el solvente a fin de purificar el aceite. Posteriormente este se refina por diferentes métodos. ⁽⁴⁾

3.3 EL MAÍZ

El maíz (*Zea mays*) Pertenece a la familia de las gramíneas, posee un tallo grueso de dos a tres metros de altura y puede ser cultivado prácticamente después de cualquier otro cultivo; asimismo puede preceder a casi todos los cultivos sin producir efectos adversos. Se siembra en distintas clases de suelos y requiere de grandes cantidades de agua. ⁽¹⁾

El maíz en particular es un alimento de gran importancia ya que aporta nutrientes a la dieta, proporciona hasta un 50% de las calorías y un 45% de la proteína a la ingesta diaria. Tiene un promedio de 9.5 gramos por ciento de proteínas. ⁽¹⁾

3.3.1 GENERALIDADES DEL AGUA DE COCIMIENTO DE MAÍZ.

Diversos investigadores han descrito el modo en que se cocina el maíz en las zonas rurales de los países consumidores de tortillas. Illescas (1943) fue el primero en descubrir el proceso tal como se lleva a cabo en México. Consiste en mezclar una parte de maíz integral con dos partes de una solución de cal aproximadamente al 1%. La mezcla se calienta a 80 °C durante un lapso de 20 a 45 minutos y luego se deja reposar toda la noche. Al día siguiente, se decanta el líquido cocido y el maíz, denominado entonces nixtamal; se lava dos o tres veces para eliminar las cubiertas seminales, las pilóricas, la cal sobrante y las impurezas del grano. ⁽³⁾

La añadidura de cal en la fase de cocción y de remojo contribuye a eliminar las cubiertas seminales; los subproductos se desechan o bien sirven para alimentar ganado porcino. (3)

La generación de agua de cocimiento de maíz a nivel industrial es un proceso que puede derivarse de dos maneras. En las zonas urbanas hay dos variantes: la primera consiste en pequeñas industrias caseras de propiedad familiar que siguen el procedimiento descrito anteriormente. Esta pequeña industria puede utilizar harina industrial para tortillas o maíz integral, en cuyo caso la masa se cuece en receptáculos de grandes dimensiones. La otra variante es la transformación industrial a gran escala del maíz en harina instantánea precocida para tortilla. El procedimiento, que ha sido descrito por diversos investigadores (Ej. Deschamps, 1985), se basa en el método utilizado tradicionalmente en las zonas rurales. El maíz se selecciona según su contenido de humedad, se eliminan todas las impurezas, como suciedad y hojas. Una vez limpio, el maíz se envía a los silos y depósitos para su almacenamiento. De ahí se transporta a las instalaciones de elaboración para su cocción en agua de cal, convirtiéndolo en nixtamal, ya sea tandas o mediante un procedimiento de elaboración continua. Tras su cocción y maceración, el maíz tratado en agua de cal se lava a presión o pulverización y se tritura hasta que forme una masa que se lleva a secado y se convierte en harina. (3)

3.3.2 VALOR NUTRICIONAL DEL AGUA DE MAÍZ.

La realización de las aguas residuales derivadas del proceso de mixtamalización, se basa por una parte en que estas aguas residuales contienen sobrantes propios del maíz, así como restos de cal que fue usada durante la cocción. Esta materia orgánica e inorgánica es una fuente de contaminación desde el punto de vista ambiental. Por otra parte, la utilización del agua de cocimiento de maíz tiene por objeto aprovechar una buena cantidad de sustancias orgánicas incluyendo las proteínas, carbohidratos y lípidos liberados del grano de maíz, durante el proceso de cocción y que dan por resultado un medio orgánico rico en nutrientes orgánicos. ⁽³⁾

La aplicación del estudio cinético de crecimiento microbiano permite la utilización de este medio para la implementación de un método de obtención de vitamina B₂ o riboflavina utilizando como microorganismo de fermentación la levadura ***Saccharomyces cerevisiae***.

Cuadro N° 3: Elementos Químicos contenidos en las cenizas de una planta de maíz. ⁽³⁾

ELEMENTO	PROCENTAJE %
Manganeso	0.30
Hierro	0.70
Aluminio	0.90
Cloro	1.20
Azufre	1.40
Magnesio	1.50
Fósforo	1.70
Calcio	1.90
Potasio	7.70
Elementos indeterminados	7.80
Silicio	9.80
Nitrógeno	12.20

3.4 LEVADURAS

Las levaduras al igual que los mohos, son hongos, pero se distinguen de ellos porque su forma dominante es unicelular generalmente su reproducción es por esporulación, gemación o fisión. El método más común es por gemación.

La gemación se produce cuando disponen de suficientes nutrientes para su alimentación. ⁽⁸⁾

Se diferencia de las algas porque no realizan fotosíntesis, tampoco son protozoos puesto que tienen una pared celular rígida, son más grandes que las bacterias, hay aproximadamente 350 especies de levaduras, separadas en 39 géneros. ⁽⁸⁾

Las levaduras aparecen casi incoloras en las suspensiones, en grandes concentraciones o prensadas, muestran una coloración blanca o amarilla pardusca. Esto también es aplicado a las levaduras de la industria, además hay algunas tipos de levaduras rojas y negras, de importancia secundaria. ⁽⁸⁾

Las levaduras no poseen movimiento propio pues carecen de órganos motores (cilios), se multiplican con una velocidad bastante grande. Para un buen crecimiento tienen importancia unas condiciones óptimas de vida, es decir, una temperatura y una alimentación adecuada. ⁽⁸⁾

Las levaduras han servido al hombre durante muchos siglos para fermentar jugos de fruta, para elaborar muchos y nutritivos alimentos. ⁽⁸⁾

Su importancia es aun mayor en la actualidad porque se ha utilizado en muchos procesos fermentativos síntesis de muchos materiales, grasas y proteínas a partir de azúcares simples y amoníaco. ⁽⁸⁾

Se consideran tres principales subdivisiones reconocidas:

- Las levaduras ascospóroenas y ascomicéticas
- Las levaduras basidiomicéticas
- Las levaduras que no tienen estadios perfectos (hongos imperfectos) son deuteromicetos.

Las levaduras se encuentran muy difundidas en la naturaleza y son diseminadas por los insectos y el viento. Varían considerablemente de tamaño entre 1-5 micrómetros de ancho y de 5 a 30 micrómetros o más de largo, generalmente son ovoides si bien algunos son esféricos y otros alargados, cada especie tiene su aspecto característico. Las levaduras no tienen flagelos u otros organelos de locomoción. (8)

Las células viejas de las levaduras con paredes engrosadas, especialmente son resistentes a condiciones poco favorables de calor, luz, desecación y sustancias químicas. (8)

Algunas especies de levaduras almacenan grandes cantidades de grasas, carbohidratos o proteínas; otras especies son fuente de glicógeno, enzimas y vitaminas, para los microorganismos y suplementos alimenticios de humanos y otros animales. (8)

Cuando se desarrollan en medio de cultivos adecuados las colonias de levaduras varían en aspecto, textura y margen. Así algunas son lisas, otras rugosas, aplanadas, otras elevadas; tienen bordes bien definidos o irregulares. Las colonias jóvenes tienen consistencia comparable a la de una pasta; la cual con el tiempo se vuelve más espesa y seca. (8)

Como las levaduras son muy importantes en la industria por su capacidad para fermentar u oxidar sustratos y producir sustancias útiles, es conveniente usar la cepa de microorganismos que proporcionan la mayor cosecha. (8)

Las levaduras también son capaces de crecer en un amplio margen de temperatura desde 0° a 47 °C, algunos no se desarrollan a más de 15 °C, aunque otros pueden hacerlo a mucho menos temperatura. La óptima para la mayor parte esta entre 20 y 30 °C. En general se sostiene que las levaduras se desarrollan mejor en medios con acción ácida. ⁽⁸⁾

En los procesos aeróbicos típicos (producción de ácido cítrico, ácido acético, penicilina, estreptomycin y levadura) es indispensable la presencia de aire (oxígeno), en los procesos anaeróbicos típicos es imperativa la ausencia de aire, en la producción de Butanol-Acetona. ⁽⁸⁾

La levadura se propaga bien en presencia del aire y en ausencia de el, pero fermenta los azúcares más rápidamente cuando esta ausente el aire; puesto que la asimilación es entonces más lenta y la mayor parte del azúcar es convertida en alcohol. ⁽⁸⁾

En presencia de aire en exceso, es inhibida la fermentación y se estimula la asimilación; por esta razón se airea fuertemente la solución fermentada.

En escala de laboratorio, es conveniente airear gran número de matraces que contengan pequeñas cantidades de líquidos, agitándolos constantemente por medio de una máquina. De esta manera se consigue una aireación uniforme en cada matraz. El método de aireación más empleado es hacer burbujear aire a través del sustrato líquido. ⁽⁸⁾

Los constituyentes normales de las células referidas a la materia seca de levadura en cantidades porcentuales son las siguientes: ⁽⁸⁾

Cuadro N° 4: Constituyentes normales referidas a la materia seca de levadura.

COMPONENTES	PORCENTAJE EN PESO SECO
Grasas	2.0
Elementos Inorgánicos	9.0
Hidratos de Carbono	37.0
Sustancias Nitrogenadas	50.0

3.4.1 *Saccharomyces cerevisiae*.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* tiende a formar colonias de color crema, blancas y húmedas en mosto agar. En cultivos jóvenes las células presentan forma redonda, ovalada o poliforme y un tamaño de 4 a 14 micras de longitud por 3-7 micras de grueso. Forma ascosporas redondas y lisas. Fermentan glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa y rafinosa. No utiliza nitratos, y tolera pH: 3.5-4.0. ⁽⁸⁾

En condiciones normales de observación en el microscopio el núcleo será invisible, el protoplasma en las células jóvenes será de apariencia suave y poco granulado, aumentando su granulación y el tamaño de las vacuolas en las células viejas. Las células muertas presentan generalmente una apariencia más irregular, con el protoplasma rugoso y paredes celulares más gruesas. ⁽⁸⁾

Saccharomyces cerevisiae esporula en forma muy difícil y para inducir la esporulación es necesario mantener la levadura en medio húmedo, con aire y

sin nutrientes, excepto solo minerales, cuando se forman esporas, estas generalmente serán 2 a 4, conociéndose con el nombre de ascosporas y llamándose a la bolsa que la contiene asca. ⁽⁸⁾

3.4.2 ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA LEVADURA.

Básicamente la célula de la levadura consiste de una pared celular formada por tres capas en las células sanas. Esta pared rodea al plasmalema (membrana del citoplasma) y el citoplasma, dentro del cual existen varios organelos, incluyendo vacuolas, mitocondrias, poli-ribosoma y gránulos. ⁽⁸⁾

Existe también un núcleo en dos diferentes dimensiones ópticas; la región que es más densa óptimamente se conoce con el nombre de nucléolo y la región menos densa se llama núcleo plasma. ⁽⁸⁾

La pared celular exterior de ***Saccharomyces cerevisiae*** consiste principalmente en un complejo de fosfomanan, en tanto que las zonas exteriores de las mismas, estarán formadas por manana y glucana. ⁽⁸⁾

La estructura de la pared celular previene físicamente la difusión dentro o fuera de la célula de compuestos con pesos moleculares mayores de 4,500. Como se mencionó anteriormente, debajo de la pared celular se encuentra la membrana citoplasmática o plasmalema, la cual consiste de manan, proteína y lípidos.

Esta membrana controla el paso de iones inorgánicos, aminoácidos y azúcares; así como el paso hacia el exterior de los productos del metabolismo (alcohol, enzima, material proteico, etc.)⁽⁸⁾

En el citoplasma existen mitocondrias los cuales están directamente involucrados con la síntesis de proteínas y ácido ribonucleico (RNA) y también en las reacciones del ciclo de Krebs y en los sistemas para transporte de electrones. En las levaduras que se encuentran en condiciones aeróbicas la mitocondria puede tener forma esférica o de bastón, en tanto que en las levaduras que se encuentran en condiciones anaeróbicas o en un medio que tenga un alto contenido de glucosa se formarán mitocondrias más simples. (8)

Cuadro N° 5: Clasificación taxonómica de *Saccharomyces cerevisiae*. (8)

Clase	Ascomycetas.
Sub-clase	Hemiascomycetidae.
Orden	Hendomicetales.
Familia	Sacharomycetaceae.
Sub-familia	Sacharomycoideae.
Genero	Saccharomyces.

3.5 FERMENTACIÓN.

La fermentación en términos generales es la descomposición de las sustancias orgánicas de origen vegetal exentas de nitrógeno, preferentemente los hidratos de carbono o sus derivados por medio de bacterias, levaduras y mohos con producción de energía. Hay fermentaciones aeróbicas, oxidantes y anaeróbicas.

Tanto la fermentación anaeróbica y aeróbicas tienen ambas el mismo fin, la provisión de energía de los microorganismos causantes del fenómeno.

La fermentación es un proceso metabólico que se caracteriza por la degradación incompleta de los Hidratos de Carbono, por esta razón la energía que se libera durante un proceso fermentativo es mucho menos que la energía liberada en un proceso respiratorio. ⁽⁸⁾

La fermentación es un proceso conocido desde la antigüedad y algunas de ellas constituyen hoy en día una de las ramas de producción más importantes en la industria. Existen dos tipos de fermentación: fermentación anoxidativa en la cual no hay intervención del oxígeno en el proceso y fermentación oxidativa en la cual el oxígeno está presente. ⁽⁸⁾

Todos los procesos fermentativos dependen de las condiciones ambientales a que se somete el microorganismo en presencia del sustrato, entre estas condiciones están: ⁽⁸⁾

- Concentración del azúcar.
- Control del pH del medio.
- Aeración.
- Control de temperatura.
- Formación de espuma.
- Contaminación.

Concentración del Azúcar: Sistema típico donde la concentración de la sustancia convertible se reduce gradualmente desde un valor inicial alto hasta un mínimo. La mitad de los azúcares totales fermenta en 8 - 10 horas durante el período principal de fermentación de un proceso que dura de 60 a 70 horas. ⁽⁸⁾

Control de pH del Medio: El ajuste del pH del sustrato a un valor óptimo inicial antes de la inoculación de los microorganismos es una parte de la preparación del sustrato. El pH inicial óptimo depende de la especie de organismo usado, de la reacción deseada y de las condiciones del proceso. ⁽⁸⁾

Aeración: En muchos procesos y si es aeróbico es conveniente la presencia del aire, en especial durante la fase de incubación, cuando el organismo prolifera rápidamente. Las levaduras crecen bien bajo condiciones aeróbicas. ⁽⁸⁾

Control de Temperatura: La temperatura inicial óptima depende de factores análogos a los que controlan el pH. Aunque la mayoría de microorganismos toleran intervalos amplios de temperatura. Las levaduras no toleran temperaturas mayores de 470 °C y la ***Saccharomyces cerevisiae*** crece a 200 °C. ⁽⁸⁾

Formación de Espuma: Durante el proceso fermentativo el caldo de cultivo tiende a formar espuma, debido al movimiento acelerado de agitación y al exceso de aire propagado en el sustrato, forma espuma compuesta de caldo y levadura, quedando adherida en las paredes del fermentador.⁽⁸⁾

Contaminación: algunos procesos microbianos fermentativos no pueden realizarse con éxito, debido a contaminación causada por la presencia de microorganismos como bacterias, degeneración de los microorganismos y las diferencias en los valores óptimos del pH.⁽¹¹⁾

3.6 CINÉTICA DE CRECIMIENTO

Las más importantes de las fermentaciones, desde el punto de vista técnico son las que se efectúan por medio de la levadura. Durante un proceso fermentativo o de crecimiento celular ocurren ciertas fases, que se generalizan en una curva de crecimiento del microorganismo participante, en nuestro caso la levadura ***Saccharomyces cerevisiae***. Este comportamiento se ilustra a continuación:⁽¹¹⁾

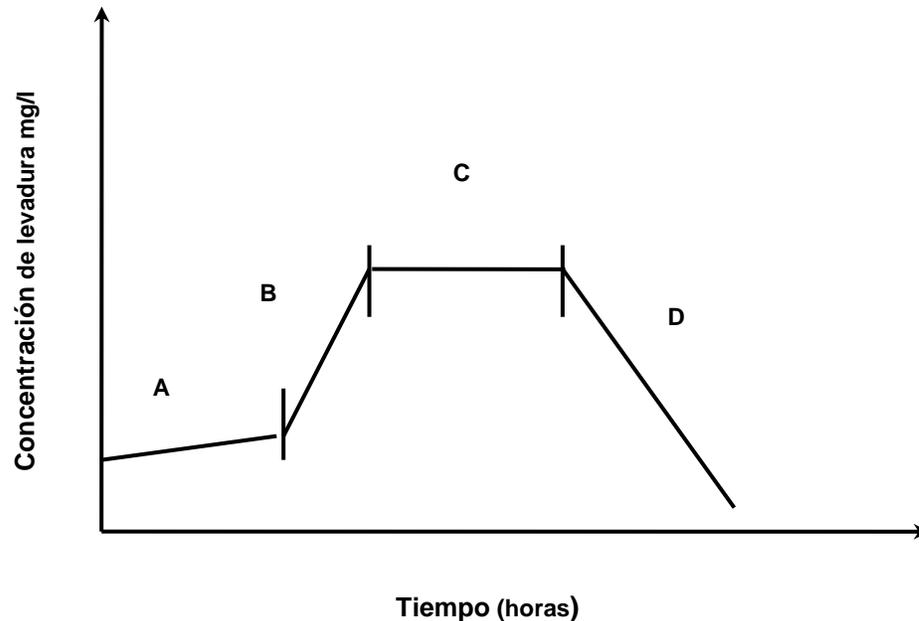


Fig. N° 3: Curva de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*.

En esta curva se aprecia que hay un período inicial en el que parece no haber desarrollo, seguido de un desarrollo rápido, después nivelación y finalmente un descenso en la población viable. En cada una de estas fases hay un periodo de transición (parte curva) tiempo en que todas las células pasan a la fase nueva.

La curva tiempo de desarrollo microbiano consta de cuatro fases: ⁽⁴⁾

Fase lag (A): periodo de adaptación para el crecimiento de los microorganismos en un medio nuevo y significa la síntesis de las enzimas requeridas para la evolución en este medio. ⁽¹¹⁾

Fase Logarítmica o Exponencial (B): fase de crecimiento equilibrado, donde la síntesis de todos los constituyentes celulares aumenta a una rapidez constante, de modo que la población de células se duplica y continúa duplicándose a intervalos regulares. ⁽¹¹⁾

Fase Estacionaria (C): fase sin ningún crecimiento neto, como resultado de la disminución de algún nutriente esencial, formación de productos tóxicos o algún cambio en medio físico. ⁽¹¹⁾

Fase de Declinación (D): fase en la cual la rapidez de muerte es más alta que la rapidez de crecimiento. ⁽¹¹⁾

En un proceso fermentativo se distinguen dentro de la vida microbiana: el desarrollo, la asimilación, la biosíntesis y la desasimilación.

El desarrollo: Se refiere tanto al micro individuo como a todo el grupo de organismos que viven juntos en una colonia o cultivo incluye el aumento en el tamaño de la célula y la reproducción celular. ⁽⁸⁾

Asimilación: Es la actividad por la cual son transformados los diversos componentes del sustrato en sustancias de las células proporcionado así el material necesario para el desarrollo y las actividades de la vida. ⁽⁸⁾

Biosíntesis: Es la formación de compuestos complejos dentro de las células en cantidades mayores que las necesarias para el sostenimiento de las actividades normales de la vida. ⁽⁸⁾

Desasimilación: Los compuestos del sustrato que el organismo puede utilizar como fuente de energía son transformados en nuevos productos que tienen menos energía que el compuesto con el cual se forman, esto se produce dentro de las células y los productos son expulsados al medio que la rodea. ⁽⁸⁾

3.7 FACTORES QUE AFECTAN LA RAPIDEZ DE CRECIMIENTO

Los factores principales que afectan la rapidez de crecimiento son: la concentración del sustrato, la temperatura, el pH y la inhibición por productos.

3.8 EVALUACION DE LA CINETICA DE CRECIMIENTO MICROBIANO

La evaluación de la cinética de crecimiento microbiano de un cultivo por lote implica la medición del crecimiento de los microorganismos, consumo de nutrientes y formación de productos.

3.8.1 CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS

3.8.1.1 VELOCIDAD VOLUMETRICA DE GENERACION DE CELULAS MICROBIANAS POR PESOS SECO

$$\mu = \frac{\text{Ln}x_2 - \text{Ln}x_1}{t_2 - t_1} = \frac{d\text{Ln}x}{dt}$$

donde :

μ : velocidad volumétrica (g/Lh)

x_2 : gramos de biomasa en tiempo final

x_1 : gramos de biomasa en tiempo inicial

t_1 : tiempo inicial

t_2 : tiempo final

3.8.1.2 VELOCIDAD ESPECIFICA DE GENERACION DE CELULAS MICROBIANAS POR PESO SECO

$$\mu^l = \frac{1}{x} \times \frac{d\text{Ln}x}{dt}$$

donde:

μ^l : velocidad específica

x : gramos de biomasa / litros de muestra analizada

$\frac{d\text{Ln}x}{dt}$: velocidad volumétrica de biomasa

3.8.2 CONSUMO DE NUTIENTES

3.8.2.1 VELOCIDAD VOLUMETRICA DE CONSUMO DE SUSTRATO

$$Q_s = \frac{S_2 - S_1}{t_2 - t_1} = - \frac{ds}{dt}$$

donde:

Q_s : velocidad volumétrica de consumo de sustrato (g/Lh)

S_2 : concentración (g/L) de sustrato en tiempo final

S_1 : concentración (g/L) de sustrato en tiempo inicial

t_2 : tiempo final

t_1 : tiempo inicial

3.8.2.2 VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CONSUMO DE SUSTRATO

$$q_s = -\frac{1}{x} \times \left(- \frac{ds}{dt} \right)$$

donde:

q_s : velocidad específica de consumo de sustrato (g/Lh)

$\frac{ds}{dt}$: velocidad volumétrica de consumo de sustrato

X: gramos de biomasa / litros de muestra

3.8.3 FORMACION DE PRODUCTO

3.8.3.1 VELOCIDAD VOLUMETRICO DE FORMACION DE PRODUCTOS

$$Q_p = \frac{p_2 - p_1}{t_2 - t_1} = \frac{dp}{dt}$$

donde:

Q_p : velocidad volumétrica de producción de vitamina B₂ (g/Lh)

P_2 : concentración (g/L) de vitamina B₂ (g/Lh)

P_1 : concentración (g/L) de vitamina B₂ (g/Lh)

t_2 : tiempo final

t_1 : tiempo inicia

3.8.3.2 VELOCIDA ESPECÍFICA DE FORMACION DE PRODUCTO

$$q_p = \frac{1}{x} \times \frac{dp}{dt}$$

donde:

q_p : velocidad especifica de producción de vitamina B₂

x : gramos de biomasa / litros de muestra analizada

$\frac{ds}{dt}$: velocidad volumétrica de producción de vitamina B₂

3.8.4 RENDIMIENTO EN EL CULTIVO

$$Y_{p/s} = \frac{dp}{-ds}$$

donde:

$Y_{p/s}$: gramos de vitamina B₂ / gramos de sustrato consumido

dp : gramos de vitamina B₂

ds : gramos de sustrato consumido

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 TIPO DE ESTUDIO

La presente investigación es de carácter prospectivo – retrospectivo y experimental.

Retrospectivo por que toma en cuenta investigaciones ya antes realizados; prospectivos por que es una base para futuras investigaciones acerca del tema.

Analítico - experimental ya que se tuvieron datos experimentales que posteriormente fueron analizados.

La investigación se llevo a cabo en tres etapas: investigación bibliografica, investigación de campo y parte experimental.

4.2 INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA

Se realiza en las siguientes Bibliotecas:

- Universidad Centroamericana José Simeón Cañas (UCA)
- Universidad Nueva San Salvador (UNSSA)
- Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer (USAM)
- Central de la Universidad de El Salvador (UES)
- Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador (UES)
- Las ingenierías de la universidad de El Salvador (UES)

4.3 INVESTIGACIÓN DE CAMPO

El microorganismo utilizado en la investigación cinética de producción de vitamina B₂ pertenece al grupo de levaduras (***Saccharomyces cerevisiae***) la cual puede ser obtenido en cualquier supermercado.

El sustrato (azúcar) a utilizar en la investigación se encuentra en el agua de cocción de Maíz proveniente del proceso de mixtamalización artesanal del maíz y se recolecto en la zona de Soyapango, San Salvador.

4.4 PARTE EXPERIMENTAL

El microorganismo que se usara para el estudio cinético de producción de vitamina B₂ será la levadura ***Saccharomyces cerevisiae***.

4.4.1 PROCEDIMIENTO PARA ADAPTAR LA LEVADURA ***Saccharomyces cerevisiae*** AL MEDIO DE FERMENTACIÓN.

- 1) Pesar 10 g de levadura (***Saccharomyces cerevisiae***)
- 2) Inocular la levadura en 100 ml de medio de fermentación.
- 3) Agitar el medio inoculado.
- 4) Colocar el matraz erlenmeyer que contiene el medio inoculado, sobre el aparato de agitación.
- 5) Incubar durante 24h a temperatura ambiente, con agitación constante (proteger de la luz).

4.4.2 METODOLOGÍA PARA PREPARAR EL MEDIO DE FERMENTACIÓN.

- 1) Recolectar el agua de cocción de Maíz.
- 2) Filtrar.
- 3) Separar el líquido por decantación.
- 4) Agregar aceite de soya, peptona, glicina, sacarosa, y D-glucosa.
- 5) Agitar hasta disolver sólidos.
- 6) Regular pH hasta 4.5.
- 7) Esterilizar por autoclave: 121°C por 15 minutos a 15 libras de presión (PSI).

4.4.3 COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE FERMENTACIÓN.

- 1) Peptona comercial ----- 10 g/L
- 2) Aceite de Soya ----- 5 g/L
- 3) D-glucosa ----- 5 g/L
- 4) Sacarosa ----- 5 g/L
- 5) Glicina ----- 0.2 g/L
- 6) Agua de cocción de Maíz c.s.p. ----- 1L

pH = 4.5 bajo una Temperatura de fermentación: Ambiente.

4.4.4 PREPARACION DEL BIORREACTOR. ⁽⁸⁾

Se usa como biorreactor un kitazato de 1000 ml con tapón de caucho y varilla hueca de vidrio para aireación, este se lavará con agua, detergente, y se desinfectará con alcohol isopropílico.

El biorreactor con el medio de fermentación inoculado con el microorganismo ***Saccharomyces cerevisiae*** se cubrirá con papel carbón para protegerlo de la luz, se crearan las condiciones de aerobiosis y agitación, luego se colocará el biorreactor protegido en el Hot plate.

4.4.5 PRODUCCIÓN Y DETERMINACIÓN DE RIBOFLAVINA. ⁽⁸⁾

- 1) Preparar un Kitazato conteniendo 800ml de medio de cultivo de fermentación estéril (agua de cocción de Maíz).
- 2) Inocular con 100ml de inculo preparado según procedimiento.
- 3) Agitar para obtener homogenización completa.
- 4) Incubar en condiciones de agitación y aeración a temperatura ambiente durante 8 días.
- 5) Retirar una muestra cada 24 horas.

4.4.6 DETERMINACIONES ANALITICAS

4.4.6.1 DETERMINACION DE BIOMASA POR EL METODO PESO SECO. (11)

Determinación por peso seco.

El método más usado para medir el crecimiento microbiano es una estimación directa de la masa celular denominado: peso seco celular, según Humphrey (1984).

El método para medir el crecimiento microbiano consiste en secar lentamente volúmenes conocidos de cultivo celular hasta obtener un peso constante. Cuando se trata de levaduras, estas sedimentan rápidamente.

Procedimiento:

- 1) Lavar cinco tubos de ensayo de 15 ml rotular como: 0h, 24h, 48h, 72h y 144h y pesar, secar a 105 °C por 30 minutos, enfriar en desecador.
- 2) Pesar los tubos previamente tarados en balanza analítica, anotar peso.
- 3) Colocar en cada tubo previamente pesado 10 ml de muestra de cada tiempo de fermentación y centrifugar a 4000 RPM por 15 minutos.
- 4) Decantar el líquido sobrenadante.
- 5) Secar en estufa la masa celular a una temperatura de 105 °C por 10 horas hasta que el peso sea constante.
- 6) Enfriar los tubos en desecador por treinta minutos.
- 7) Pesar los tubos en balanza analítica y por diferencia de peso determinar biomasa.

4.4.6.2 DETERMINACION DE pH. ⁽⁸⁾

Tomar una muestra de 30 ml, filtrar a presión por micropore, del filtrado determinar el pH.

Procedimiento:

- Calibrar previamente el pHmetro, utilizando soluciones buffer de pH 4 y 7.
- Pipetear 6 ml de filtrado.
- Colocar en Beaker de 10 ml.
- Introducir el electrodo del pHmetro en la muestra.
- Dejar reposar durante 1 minutos.
- Leer directamente el valor de pH.

4.4.6.3 DETERMINACION DE GRADOS BRUX. ⁽⁸⁾

- Limpiar el prisma del brixometro con un algodón impregnado de alcohol isopropílico, secar con kleenex.
- Calibrar el brixómetro con una gota de agua destilada y llevar a cero en la escala.
- Del filtrado obtenido del cultivo de fermentación, depositar una gota de fermento sobre el prisma del brixómetro.
- Tomar lectura orientando el brixómetro hacia la luz para observar la escala en el instrumento.
- Realizar tres lecturas y obtener un promedio.

4.4.6.4 ELABORACION DE CURVA ESTANDAR DE GLUCOSA. ⁽¹³⁾

- Desecar 1.5 g de D glucosa a 105 °C durante 1h, enfriar en desecador.
- Pesar 1g en balanza analítica.
- Transferir a un balón volumétrico de 1000 ml, adicionar 500 ml de agua destilada y agitar hasta disolución aforar a 1000 ml.
- Colocar 1 ml de solución preparada en un balón volumétrico de 10 ml, aforar con agua destilada.
- Preparar a partir de la solución anterior de glucosa las soluciones que se detallan en la tabla N° 3, utilizar como blanco el tubo N° 1 de la tabla N° 1.
- Leer en Spectronic 20 a una longitud de onda $\lambda = 490$ nm.
- Realizar tres lecturas de cada muestra.

4.4.6.5 DETERMINACION DE AZUCARES TOTALES METODO (FENOL-SULFURICO). ⁽¹³⁾

- Tomar 0.1 ml de filtrado y llevar a 10 ml con agua destilada, adicionar 0.5 ml de $ZnSO_4$ 10% y 0.5 ml de NaOH 0.5N.
- Dejar reposar 15 minutos y luego centrifugar 15 minutos a 100 RPM.
- Tomar 0.5 ml de sobrenadante y agregar 0.1 ml de fenol 80%, dejar en baño de hielo por 5 minutos.
- Adicionar 5.0 ml de H_2SO_4 concentrado por las paredes del tubo, en baño de hielo, agitar y dejar reposar por 30 minutos.
- Leer a longitud de onda $\lambda = 490$ nm en Spectronic 20.

4.4.6.6 FLUORESCENCIA DE RIBOFLAVINA OBTENIDA EN EL MEDIO DE PRODUCCIÓN.

- Rotular 6 Beaker de 10 ml como sigue: 0h, 24h, 48h, 72h, 144h.
- Colocar 8 ml de muestra de filtrado en el Beaker correspondiente.
- Colocar las muestra en cámara UV cerrar y encender la lámpara.
- Apagar las luces del laboratorio para observar mejor la fluorescencia.
- Observar la intensidad de fluorescencia de cada muestra.
- Llevar un blanco con agua destilada.

4.4.6.7 MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA CUANTIFICAR RIBOFLAVINA (VITAMINA B₂).⁽¹²⁾

1. Preparación de Estándar de Riboflavina.

- Secar el estándar de riboflavina a 105 °C por 2 horas.
- Pesar 0.105 g de estándar de riboflavina.
- Disolver en 800 ml de ácido acético glacial diluido (1:400) y calentar suavemente hasta completa disolución.
- Aforar con agua destilada hasta volumen de 1000 ml.
- Agitar para homogenizar.

2. Preparación de Muestra.

- Tomar 5 ml de filtrado de muestra obtenido del caldo de fermentación
- Leer a 445 nm.

Procedimiento:

- Encender espectrofotómetro 15 minutos antes de ser utilizado.
- Ajustar condiciones de trabajo, y longitud de onda $\lambda = 445$ nm.
- Colocar el blanco en la celda (agua destilada) y llevar a cien de transmitancia y cero de absorbancia.
- Colocar 5 ml de estándar de riboflavina en otra celda y proceder a leer absorbancia.
- A la solución estándar anterior de riboflavina agregar 0.02 g de Hidrosulfito de sodio, para reducir la vitamina dando la forma leucorriboflavina que es incolora y no fluorescente.
- Colocar en la celda y leer Absorbancia
- Realizar lecturas repetitivas para confirmar que la absorbancia es la misma.
- Realizar tres lecturas.
- Obtener promedio.

Proceder de igual manera con la muestra obtenida en caldo de fermentación.

Cálculos:

$$\text{mg de riboflavina} = \text{mg estándar de riboflavina} \times \frac{AT - AT'}{AS - AS'}$$

donde:

AT = Absorbancia de muestra sin Hidrosulfito de sodio.

AT' = Absorbancia de muestra con Hidrosulfito de sodio.

AS = Absorbancia de estándar sin Hidrosulfito de sodio.

AS' = Absorbancia de estándar con Hidrosulfito de sodio.

CAPITULO V
RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

TABLA N° 1 : RESULTADOS DE BIOMASA EN ENSAYOS 1,2 Y 3.

N° Muestra	Tiempo (horas)	Ensayo N° 1 Biomasa (g/L)	Ensayo N° 2 Biomasa (g/L)	Ensayo N° 3 Biomasa (g/L)
1	0	7.65	7.75	7.70
2	24	8.05	8.31	8.15
3	48	8.50	8.75	8.65
4	72	9.45	9.78	9.65
5	144	9.21	9.57	9.41

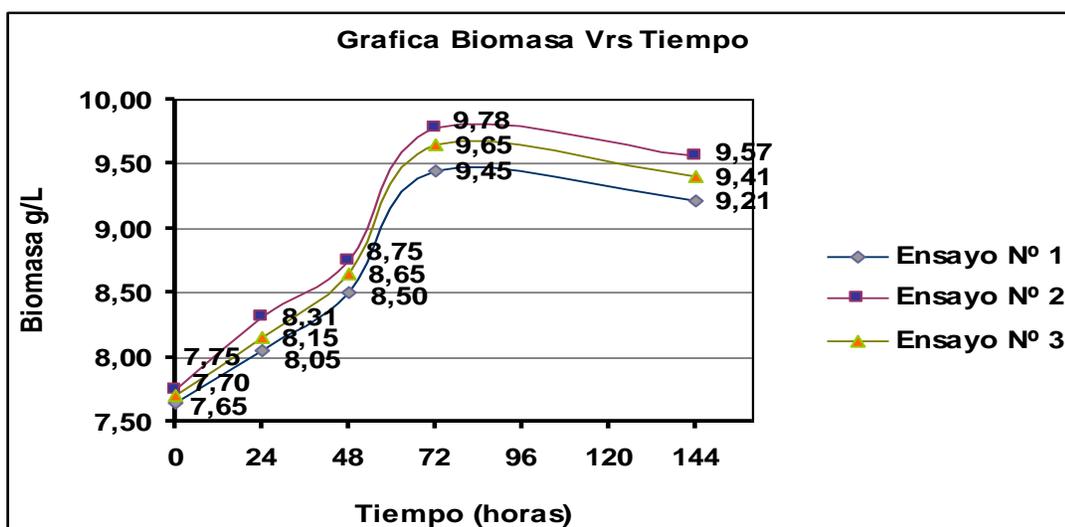


Fig. N° 4: Curva de resultados de Biomasa por peso seco (g/L) Vrs Tiempo (horas) para ensayos de producción de vitamina B₂.

La figura N° 4 muestra la generación de células microbianas y la cinética de crecimiento en sus diferentes fases; adaptación, exponencial, estacionaria y muerte. De los tres ensayos de fermentación.

TABLA N° 2 : RESULTADOS PROMEDIOS DE BIOMASA EN ENSAYOS 1, 2 Y 3.

N° Muestra	Tiempo (horas)	Promedio Biomasa g/L Ensayo 1,2,3
1	0	7.70
2	24	8.17
3	48	8.63
4	72	9.63
5	144	9.40

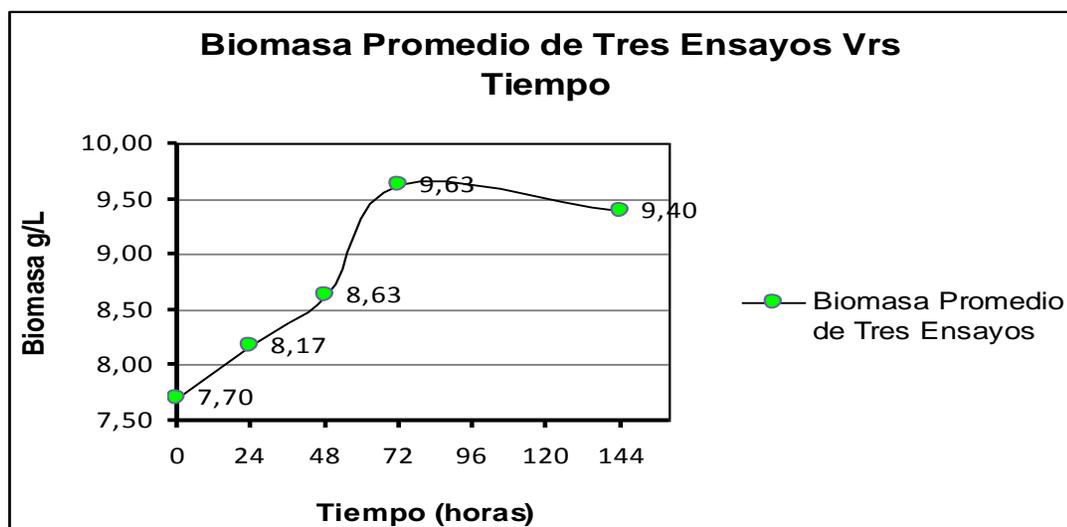


Fig. N° 5: Determinación promedio de tres ensayos de Biomasa g/L Vrs Tiempo (horas) durante la producción de vitamina B₂.

La figura N° 5 muestra la generación de células microbianas promedio de los ensayos de fermentación 1,2 y 3. La tendencia de la curva va en ascenso hasta las 72 horas, donde alcanza un valor máximo de 9.63 g/L de biomasa, siguiendo la tendencia de la curva de crecimiento.

TABLA N° 3 : RESULTADOS DE pH EN ENSAYOS 1,2 Y 3.

N° Muestra	Tiempo (horas)	Ensayo N° 1 pH	Ensayo N° 2 pH	Ensayo N° 3 pH
1	0	4.04	4.05	4.03
2	24	4.02	4.03	4.01
3	48	3.99	4.00	3.98
4	72	3.96	3.97	3.96
5	144	4.06	4.08	4.07

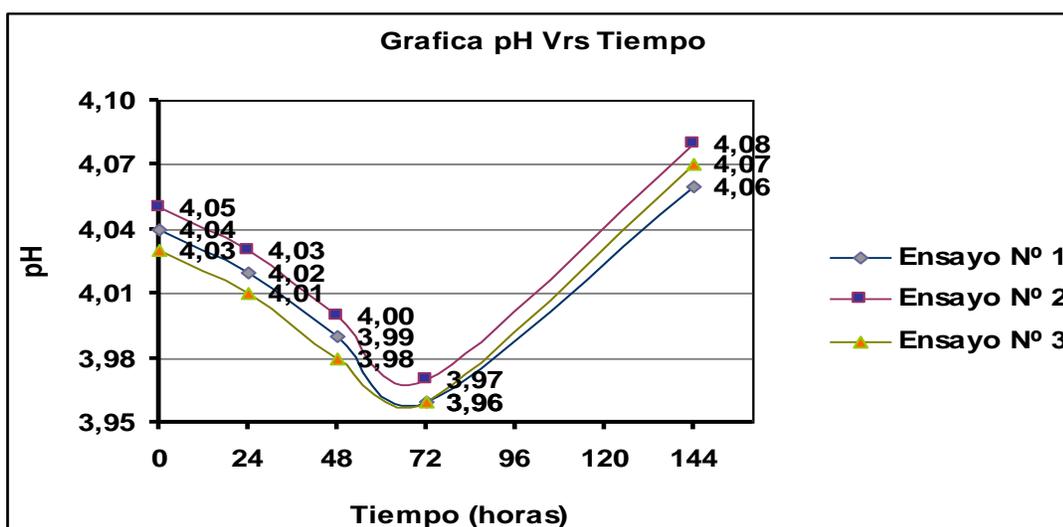


Fig. N° 6: Curva de resultados de pH Vrs Tiempo (horas) para ensayos de producción de vitamina B₂.

La figura N° 6 muestra la tendencia de pH en las fermentaciones 1,2 y 3. Se observa que durante el proceso de fermentación el pH se encuentra dentro del rango óptimo de crecimiento de la levadura el cual es 3.5 a 4.5.

TABLA N° 4 : RESULTADOS PROMEDIOS DE pH EN ENSAYOS 1,2 Y 3.

N° Muestra	Tiempo (horas)	Promedio pH Ensayo 1,2,3
1	0	4.04
2	24	4.02
3	48	3.99
4	72	3.96
5	144	4.07

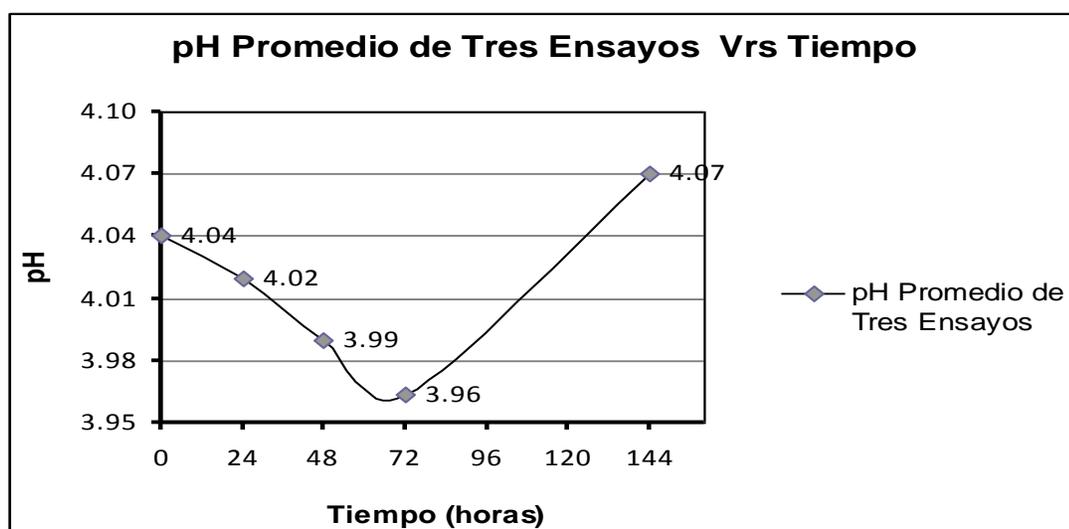


Fig. N° 7: Determinación promedio de tres ensayos de pH Vrs Tiempo (horas) durante la producción de vitamina B₂.

La figura N° 7 muestra que el pH promedio inicia con 4.04 (0 horas) y disminuyo a 3.96 en las 72 horas; observándose que durante el proceso de fermentación el pH se encuentra dentro del rango óptimo de trabajo de 3.5 a 4.5 de pH.

TABLA N° 5 : RESULTADOS DE GRADOS BRIX EN ENSAYOS 1,2 Y 3.

N° Muestra	Tiempo (horas)	Ensayo N° 1 Brix	Ensayo N° 2 Brix	Ensayo N° 3 Brix
1	0	5.0	5.0	5.0
2	24	4.8	4.8	4.8
3	48	4.6	4.6	4.5
4	72	4.2	4.2	4.2
5	144	5.0	4.8	5.0

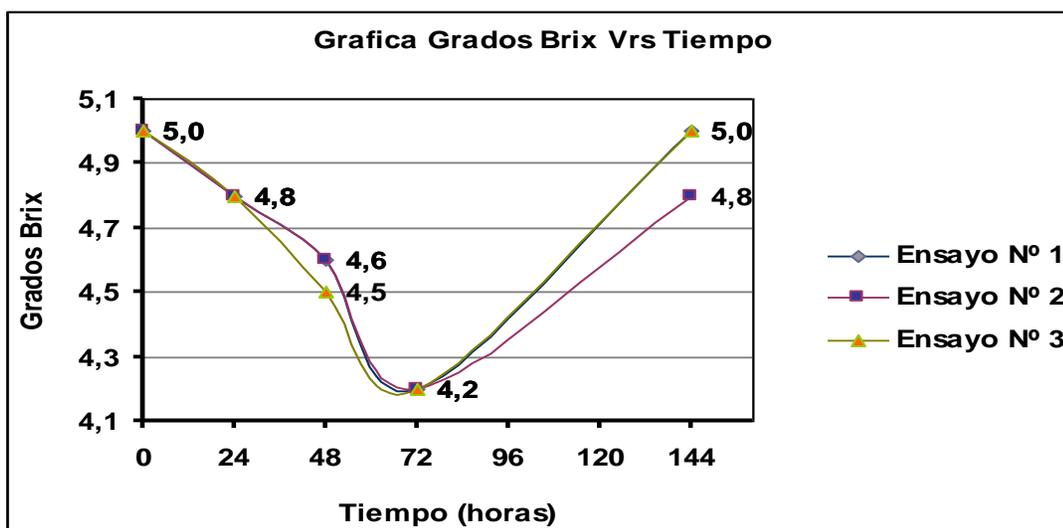


Fig. N° 8: Curva de resultados de grados Brix Vrs Tiempo (horas) para ensayos de producción de vitamina B₂.

La figura N° 8 muestra el comportamiento de grados Brix en las fermentaciones 1,2 y 3. Se observa la disminución desde las 24 horas hasta las 72 horas durante la fermentación aeróbica. Y luego aumenta desde las 96 hasta las 144 horas.

TABLA N° 6 : RESULTADOS PROMEDIOS DE GRADOS BRIX EN ENSAYOS 1,2 Y 3.

N° Muestra	Tiempo (horas)	Promedio Brix Ensayo 1,2,3
1	0	5.0
2	24	4.8
3	48	4.6
4	72	4.2
5	144	4.9

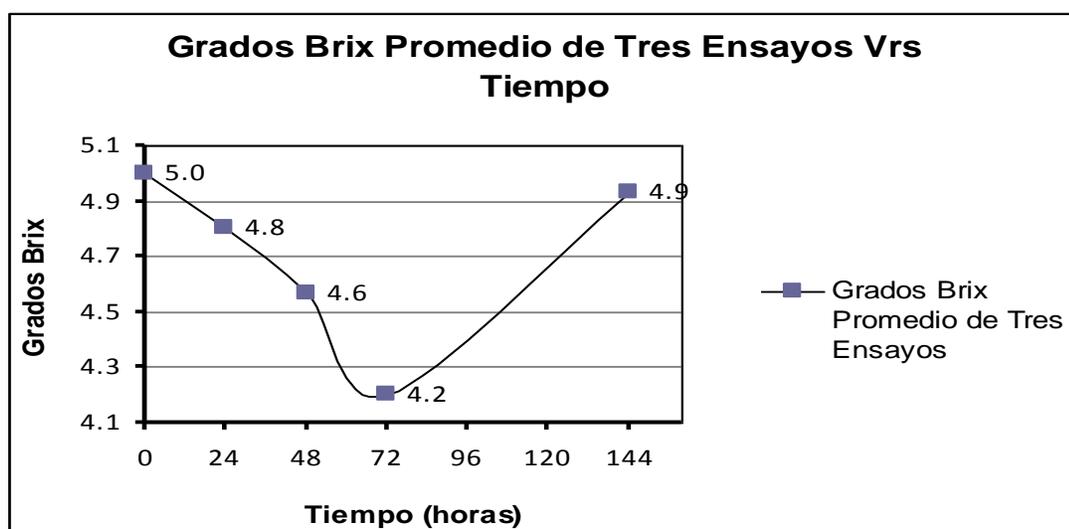


Fig. N° 9: Determinación promedio de tres ensayos de grados brix Vrs Tiempo (horas) durante la producción de vitamina B₂.

La figura N° 9 muestra que los grados Brix inician de 5.0 y disminuye a 4.2 en las 72 horas y aumenta hasta 4.9 en las 144 horas. Demostrando así el consumo de azúcares para la producción de riboflavina en la fermentación.

TABLA N° 7 : RESULTADOS DE CONCENTRACION DE AZUCARES TOTALES EN ENSAYOS 1,2 Y 3.

N° Muestra	Tiempo (horas)	Ensayo N° 1 [] de Azucares (mg/ml)	Ensayo N° 2 [] de Azucares (mg/ml)	Ensayo N° 3 [] de Azucares (mg/ml)
1	0	0.0355	0.0352	0.0354
2	24	0.0287	0.0286	0.0287
3	48	0.0209	0.0199	0.0211
4	72	0.0104	0.0104	0.0104
5	144	0.0249	0.0274	0.0252

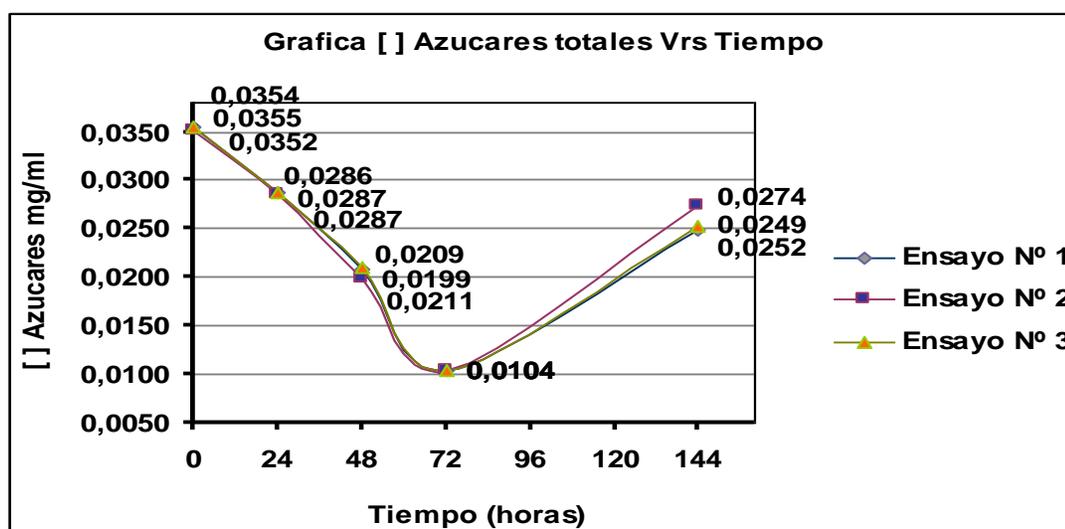


Fig. N° 10: Curva de resultados de concentración de azucares totales (mg/ml) Vrs Tiempo (horas) para ensayos de producción de vitamina B₂.

La figura N° 10 muestra el comportamiento de la concentración de azucares totales en los ensayos de fermentación 1,2 y 3. Se observa la disminución desde las 24 horas hasta las 72 horas. Y aumentando desde las 96 a las 144 horas.

TABLA N° 8 : RESULTADOS PROMEDIOS DE AZUCARES TOTALES EN ENSAYOS 1,2 Y 3.

N° Muestra	Tiempo (horas)	Promedio [] de Azucares Ensayo 1,2,3
1	0	0.0354
2	24	0.0287
3	48	0.0206
4	72	0.0104
5	144	0.0258

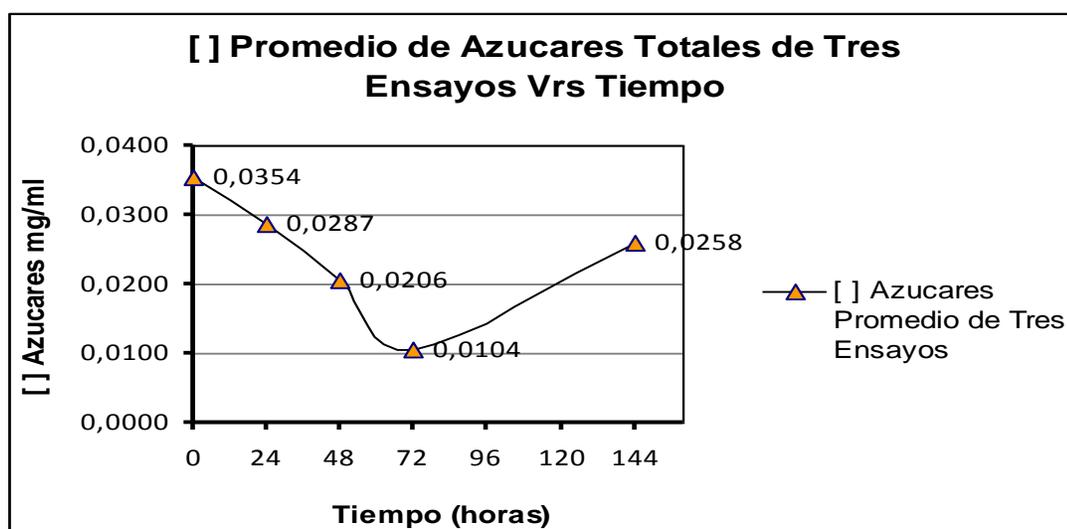


Fig. N° 11: Determinación promedio de tres ensayos de la [] de azúcares totales (mg/ml) Vrs Tiempo (horas) durante la producción de vitamina B₂.

La figura N° 11 muestra que la concentración de los azúcares totales promedio inicia a las 0 horas con 0.0354 mg/ml y disminuye a 0.0104 mg/ml a las 72 h y luego aumenta a 0.0258 mg/ml a las 144 h. Se demuestra que hay consumo de azúcar en la fermentación.

TABLA N° 9 : RESULTADOS DE IDENTIFICACION DE VITAMINA B₂ POR FLUORESCENCIA EN CAMARA UV.

Nº Muestra	Tiempo (h)	Fluorescencia
1	0	Baja
2	24	Media
3	48	Alta
4	72	Maxima
5	144	Media

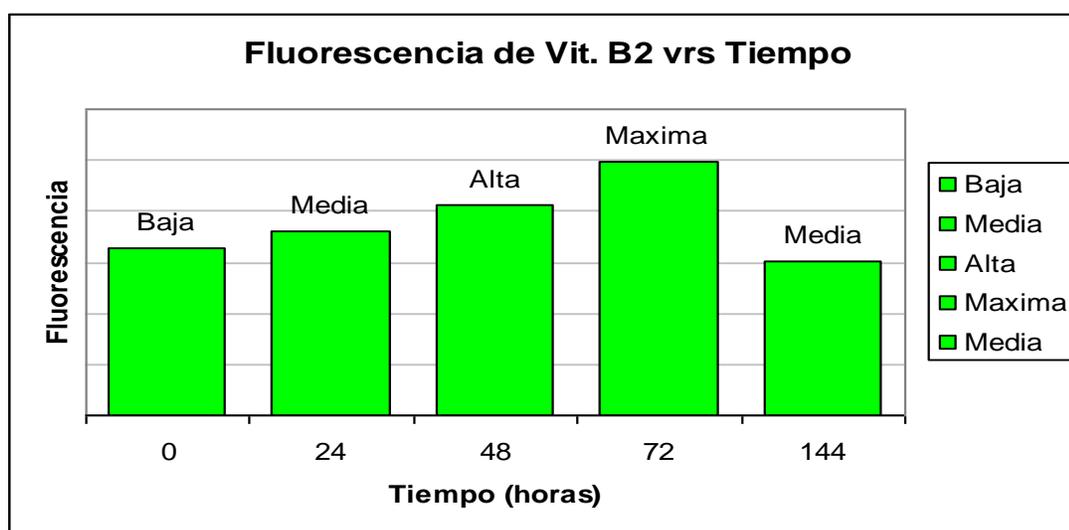


Fig. N° 12: Grafica de resultados de Fluorescencia Vrs Tiempo (horas) para ensayos de producción de vitamina B₂.

La figura N° 12 muestra el comportamiento de la Fluorescencia en los ensayos de fermentación 1,2 y 3. Se observa el aumento desde las 0 horas hasta las 72 horas, donde alcanza su máxima intensidad y la disminución a las 144 horas. Con esto se demuestra la presencia de riboflavina o vitamina B en los ensayos ya que esta tiene la característica de identificación de ser fluorescente.

TABLA N° 10 : RESULTADOS DE CONCENTRACION DE VITAMINA B₂ EN ENSAYOS 1,2 Y 3.

N° Muestra	Tiempo (horas)	Ensayo N° 1 [] de vit. B ₂ (mg/L)	Ensayo N° 2 [] de vit. B ₂ (mg/L)	Ensayo N° 3 [] de vit. B ₂ (mg/L)
1	0	1.63	1.67	1.63
2	24	1.80	1.83	1.80
3	48	2.06	2.12	2.03
4	72	2.45	2.52	2.48
5	144	1.47	1.57	1.50

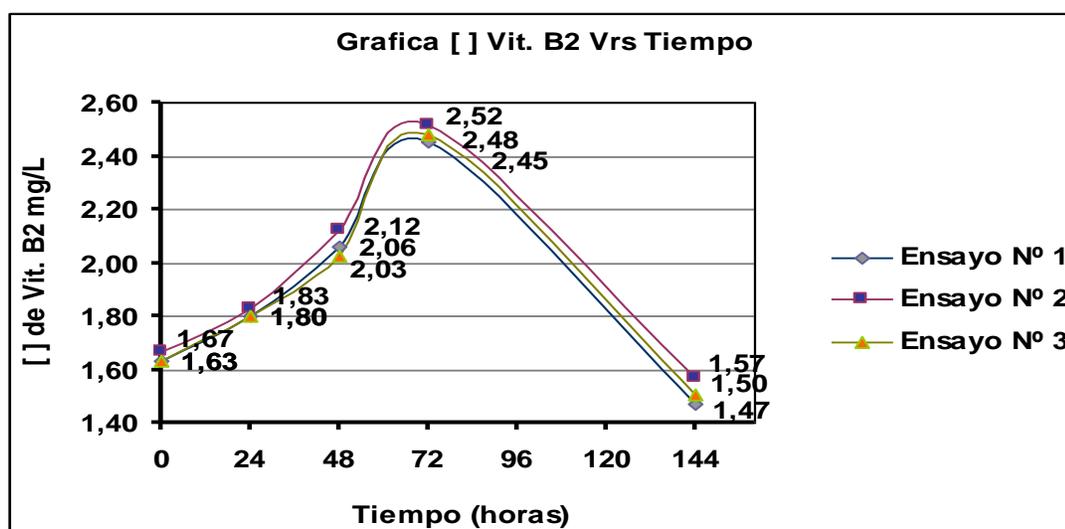


Fig. N° 13: Curva de resultados de concentración de riboflavina (mg/L) Vrs Tiempo (horas) durante la producción de vitamina. B₂.

La figura N° 13 muestra la concentración de vitamina B₂ en los ensayos de fermentación 1,2 y 3. Observándose el incremento desde las 24 horas hasta alcanzar su máximo valor de concentración de vitamina B₂ a las 72 horas. Y luego esta tiende a disminuir desde las 96 hasta las 144 horas.

TABLA N° 11 : RESULTADOS PROMEDIOS DE CONCENTRACION DE RIBOFLAVINA EN ENSAYOS 1,2 Y 3.

Nº Muestra	Tiempo (horas)	Promedio [] de Vit. B2 Ensayo 1,2,3
1	0	1.64
2	24	1.81
3	48	2.07
4	72	2.48
5	144	1.51

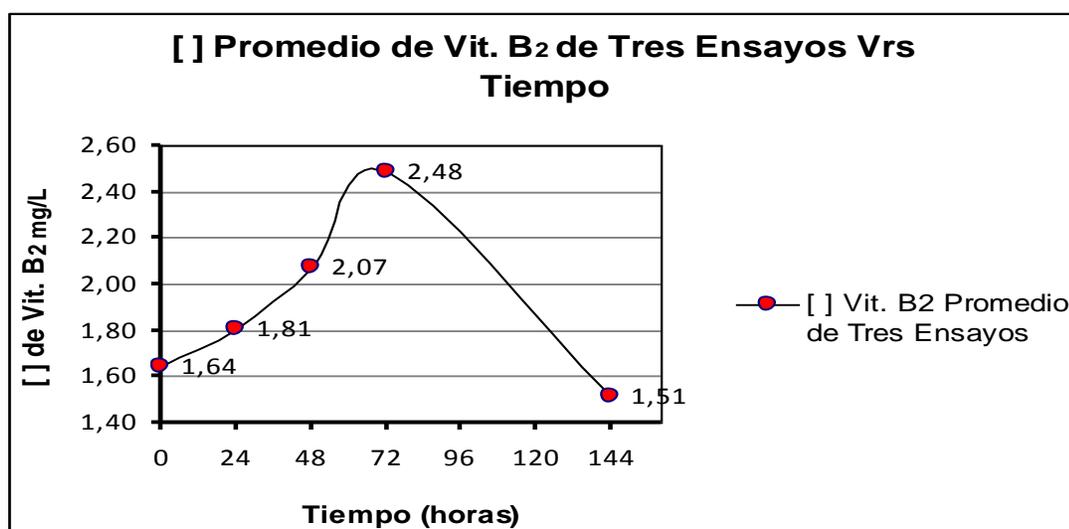


Fig. N° 14: Determinación promedio de tres ensayos de concentración de riboflavina (mg/L) Vrs Tiempo (horas) durante la producción de vitamina B₂.

La figura N° 14 se observa que la concentración de riboflavina promedio inicia con 1.64 mg/L y aumenta hasta una concentración máxima de 2.48 mg/L a las 72 h, luego disminuye a 1.51 mg/L a las 144 horas.

TABLA N° 12 : RESULTADO DEL ANÁLISIS DE MUESTRAS POR EL MÉTODO DE PESO SECO DURANTE EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE VITAMINA B₂.

Nº Muestra	Tiempo (h)	Biomasa (mg/ml)	Ln de x
1	0	7.70	2.04
2	24	8.17	2.10
3	48	8.63	2.16
4	72	9.63	2.26
5	144	9.40	2.24

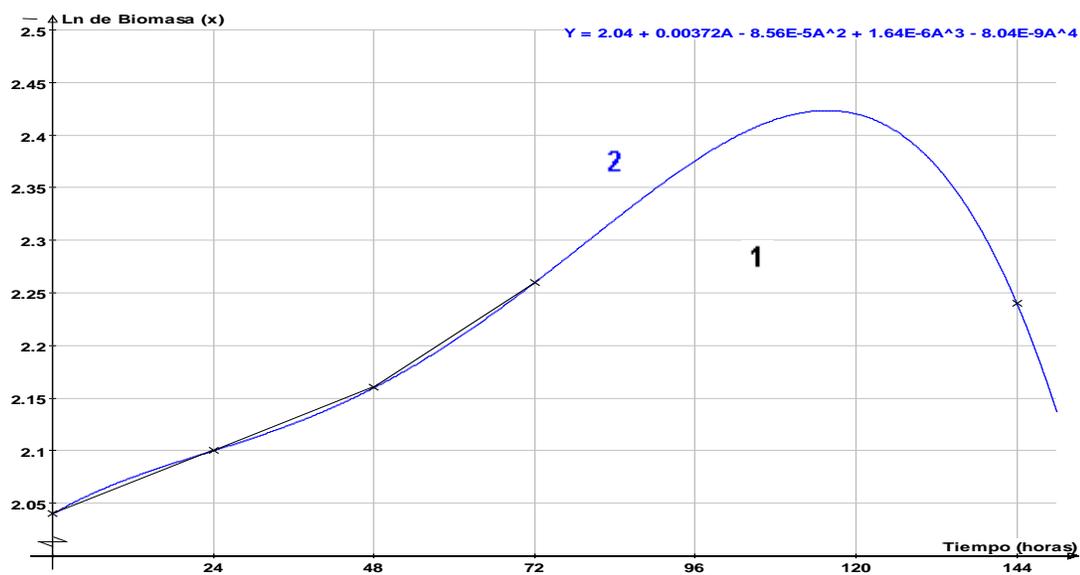


Fig. N° 15: Curva Ln de Biomasa mg/ml Vrs. Tiempo (horas) para la producción de vitamina B₂.

Curva N° 1 se obtiene graficando los resultados obtenidos experimentalmente.

Curva N° 2 se obtiene aplicando el método de regresión polinomial a los resultados obtenidos experimentalmente.

La figura N° 15 se observa el aumento de cada uno de los componentes celulares con relación al tiempo de 0 a 72 horas el microorganismo se reproduce a una velocidad que es la máxima en todas las fases de crecimiento esta se ve favorecida por la condiciones de aerobiosis, de 72 a 120 horas se observa la fase estacionaria y por agotamiento de nutrientes la fase de muerte a las 144 horas.

VELOCIDAD VOLUMÉTRICA DE BIOMASA POR PESO SECO.

$$\mu = \frac{\text{Ln}x_2 - \text{Ln}x_1}{t_2 - t_1} = \frac{d\text{Ln}x}{dt}$$

Donde:

μ : velocidad volumétrica (g/Lh)

x_2 : gramos de biomasa en tiempo final

x_1 : gramos de biomasa en tiempo inicial

t_1 : tiempo inicial

t_2 : tiempo final

Ejemplo para $t = 24$ horas

$$\mu = \frac{2.10 - 2.04}{24 - 0} = \frac{d\text{Ln}x}{dt}$$

$$\mu = 0.0025 \text{ g/Lh}$$

TABLA N° 13 : RESULTADOS DE VELOCIDAD VOLUMÉTRICA DE BIOMASA POR PESO SECO DURANTE EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE VITAMINA B₂.

Tiempo (h)	Velocidad volumétrica (g/Lh)
0	0
24	0.0025
48	0.0024
72	0.0031
144	0.0014

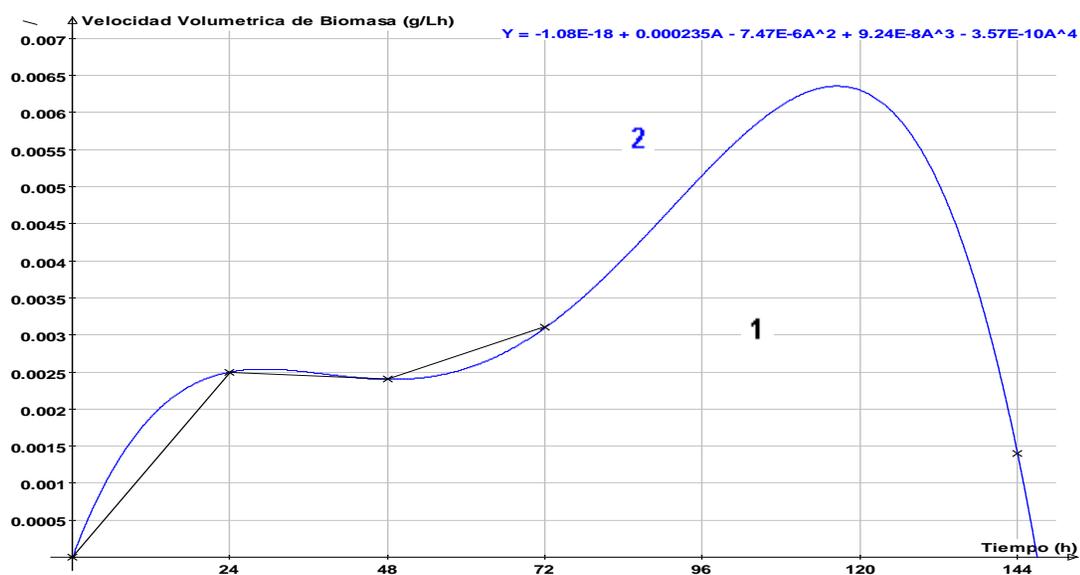


Fig. N° 16: Curva de Velocidad Volumétrica de Biomasa (g/Lh) Vrs. Tiempo (horas) para producción de vitamina B₂.

Curva N° 1 es el resultado obtenido a través de la aplicación de la fórmula de velocidad volumétrica a los datos experimentales.

Curva N° 2 se obtiene aplicando el método de regresión polinomial a los resultados obtenidos experimentalmente.

La figura N° 16 muestra el comportamiento cinético de generación de células microbianas con relación al tiempo, durante el proceso de producción de vitamina B₂. La fase exponencial se lleva a cabo de 0 a 72 horas; alcanzando el máximo valor de velocidad volumétrica a las 72 horas, la fase estacionaria inicia de 72 hasta 120 horas luego se muestra una declinación de la velocidad volumétrica que permanece constante hasta finalizar el periodo de análisis de 144 horas.

VELOCIDAD ESPECÍFICA DE BIOMASA POR EL MÉTODO DE PESO SECO

$$\mu^l = \frac{1}{x} \times \frac{dLnx}{dt}$$

Donde:

μ^l : velocidad específica

x: gramos de biomasa / litros de muestra analizada

$\frac{dLnx}{dt}$: velocidad volumétrica de biomasa

Ejemplo para t = 24 horas

$$\mu^l = \frac{1}{8.17} \times 0.0025 = 0.00030 \text{ g/Lh}$$

TABLA N° 14 : RESULTADOS DE VELOCIDAD ESPECÍFICA DE BIOMASA POR PESO SECO DURANTE EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE VITAMINA B₂.

Tiempo (h)	Velocidad específica de generación de células Microbianas (g/Lh)
0	0
24	0.00030
48	0.00028
72	0.00032
144	0.00015

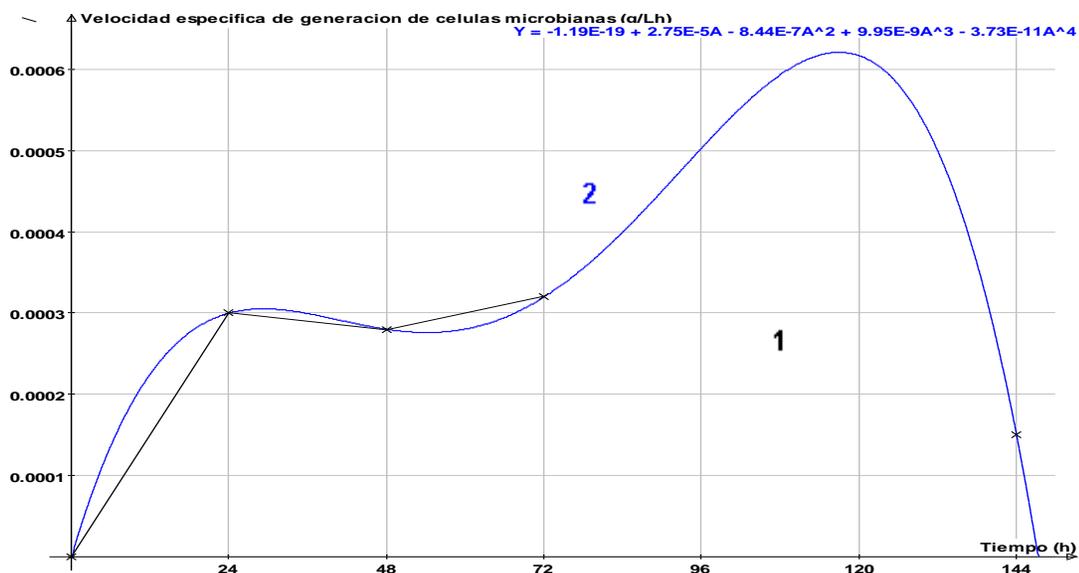


Fig. N° 17: Curva de Velocidad Específica de Biomasa (g/Lh) Vrs. Tiempo (horas) para producción de vitamina B₂.

Curva N° 1 es el resultado obtenido a través de la aplicación de la fórmula de velocidad específica a los datos experimentales.

Curva N° 2 se obtiene aplicando el método de regresión polinomial a los resultados obtenidos experimentalmente.

La figura N° 17 muestra el comportamiento cinético de generación de células microbianas para cada tiempo específico durante el proceso de producción de vitamina B₂. La fase exponencial se lleva a cabo de 0-72 horas; alcanzando el máximo valor de velocidad específica a las 72 horas, la fase estacionaria es relativamente corta durando 24 horas aproximadamente a partir de este tiempo y hasta las 120 horas se muestra una declinación en la velocidad específica que luego permanece constante hasta las 144 horas.

TABLA N° 15 : RESULTADOS DE CURVA ESTANDAR DE GLUCOSA MEDIANTE APLICACIÓN DEL MÉTODO FENOL-SULFÚRICO PARA CUANTIFICACIÓN DE AZUCARES TOTALES.

N° de tubo	ml de Solución de glucosa	ml de agua destilada	ml de Fenol al 80%	ml de Ácido Sulfúrico []	valor de Absorbancia	Concentración (mg/ml)
1	0,0	2,0	0,1	5	0,000	0,0000
2	0,1	1,9	0,1	5	0,012	0,0050
3	0,2	1,8	0,1	5	0,058	0,0100
4	0,4	1,6	0,1	5	0,176	0,0200
5	0,6	1,4	0,1	5	0,300	0,0300
6	0,8	1,2	0,1	5	0,412	0,0400
7	1,0	1,0	0,1	5	0,620	0,0500

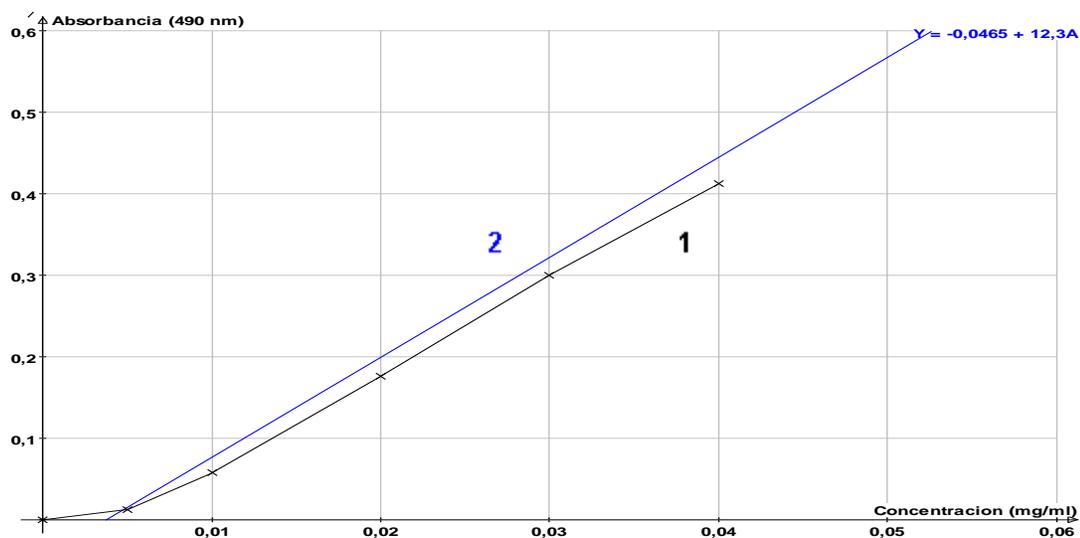


Fig. N° 18: Curva Estándar de Glucosa.

Curva N° 1 es el resultado obtenido de graficar los datos experimentales de estándares de azúcares.

Curva N° 2 se obtiene aplicando regresión lineal a la curva estándar de glucosa y la ecuación obtenida es $Y = 12.3X - 0.0465$

Al aplicar regresión lineal la ecuación obtenida es $Y = 12.3X - 0.0465$

Ejemplo: para $A = 0.388$, y si $Y = A$

$$x = \frac{y + 0.0465}{12.3}$$

$$x = \frac{Y + 0.0465}{12.3}$$

$$x = 0.0353 \text{ mg/ml}$$

TABLA N° 16 : RESULTADOS DE APLICACIÓN DE REGRECION LINEAL AL ANÁLISIS DE MUESTRAS POR MÉTODO FENOL-SULFÚRICO PARA CUANTIFICACIÓN DE AZUCARES TOTALES.

Nº Muestra	Tiempo (h)	Valor de Absorbancia L=490nm	Regresión Lineal $Y=12.3x-0.0465$ $X=(\text{mg/ml})$
1	0	0,388	0,0353
2	24	0,306	0,0287
3	48	0,208	0,0207
4	72	0,082	0,0104
5	144	0,271	0,0258

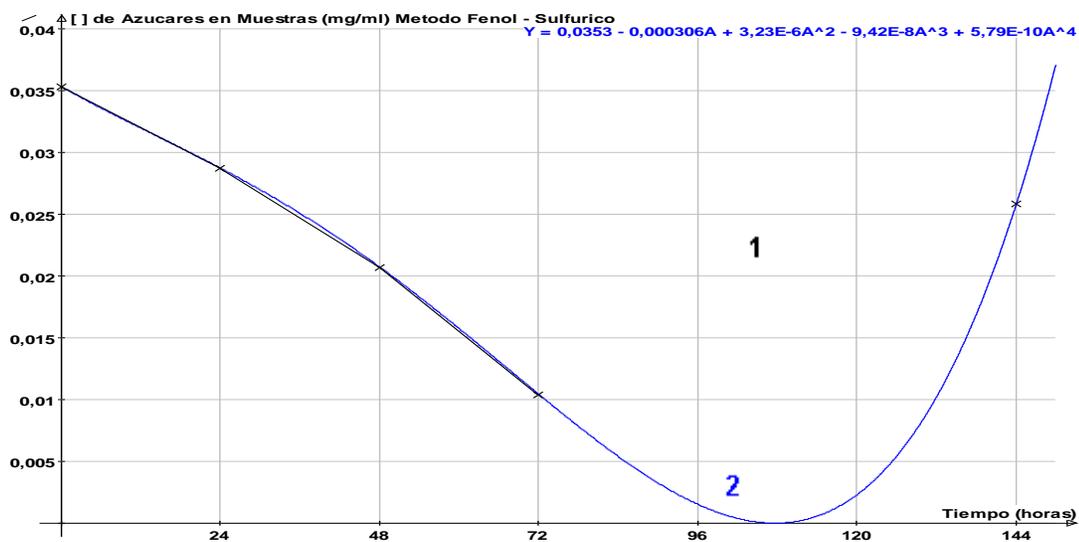


Fig. N° 19: Curva de Concentración de Azúcares en Muestra (mg/ml) Vrs. Tiempo (horas)

Curva N° 1 es el resultado obtenido de graficar los datos experimentales de estándares de azúcares

Curva N° 2 se obtiene aplicando regresión lineal a la curva estándar de glucosa y la ecuación obtenida es $Y = 12.3X - 0.0465$

Al aplicar la regresión polinomial se obtiene:

$$Y = 0.0353 - 0.000306 X + 3.23E-6 X^2 - 9.42E-8 X^3 + 5.79E-10 X^4$$

Para $t = 0$ y $t = X$

$$Y = 0.0353 - 0.000306 (0) + 3.23E-6 (0)^2 - 9.42E-8 (0)^3 + 5.79E-10 (0)^4$$

$$Y = 0.0353 \text{ mg/ml}$$

TABLA N° 17 : APLICACIÓN DE REGRECION POLINOMIAL A LOS RESULTADOS DEL ANALÍISIS DE MUESTRAS PARA CUANTIFICACIÓN DE AZUCARES TOTALES.

N° de Muestra	Tiempo (h)	Concentración (mg/ml)
1	0	0,0353
2	24	0,0287
3	48	0,0207
4	72	0,0104
5	144	0,0259

VELOCIDAD VOLUMÉTRICA DE CONSUMO DE SUSTRATO.

$$Q_s = \frac{S_2 - S_1}{t_2 - t_1} = -\frac{ds}{dt}$$

Donde:

Q_s : velocidad volumétrica de consumo de sustrato (g/Lh)

S_2 : concentración (g/L) de sustrato en tiempo final

S_1 : concentración (g/L) de sustrato en tiempo inicial

t_2 : tiempo final

t_1 : tiempo inicial

Ejemplo para $t = 24$ horas

$$Q_s = \frac{0.0287 - 0.0353}{24 - 0} = -\frac{ds}{dt}$$

$$Q_s = 0.00028 \text{ g/Lh.}$$

TABLA N° 18 : RESULTADOS DE VELOCIDAD VOLUMÉTRICA DE CONSUMO DE SUSTRATO DURANTE EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE VITAMINA B₂.

Tiempo (h)	Concentración (mg/ml)	Qs (g/Lh)
0	0,0353	0,00000
24	0,0287	-0,00028
48	0,0207	-0,00030
72	0,0104	-0,00035
144	0,0259	-0,00007

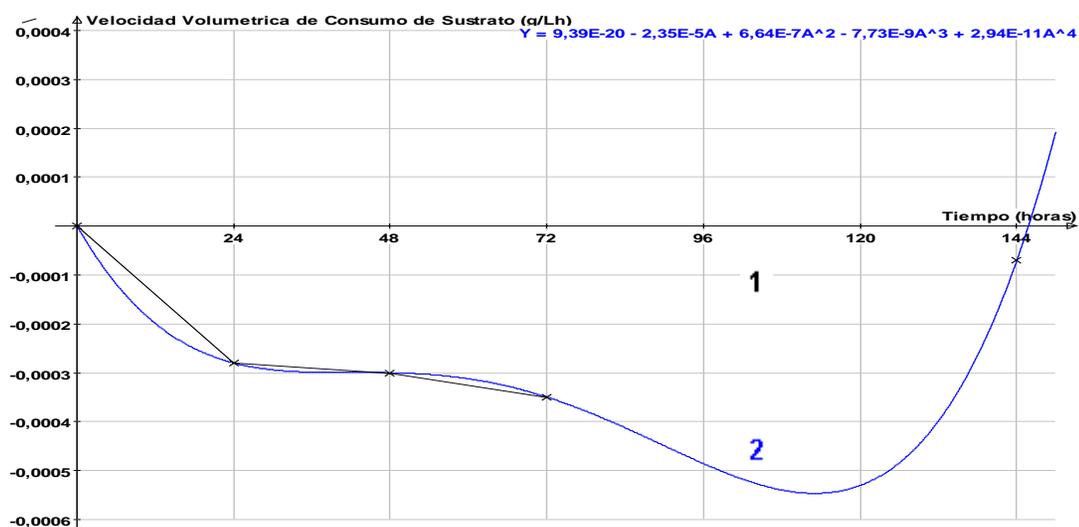


Fig. N° 20: Curva de Velocidad Volumétrica de Consumo de Sustrato (g/Lh) Vrs. Tiempo (horas) para la producción de vitamina B₂.

Curva N° 1 es el resultado obtenido a través de la aplicación de la fórmula de velocidad volumétrica a los datos experimentales.

Curva N° 2 se obtiene aplicando el método de regresión polinomial a los resultados obtenidos experimentalmente.

La figura N° 20 muestra el comportamiento en cuanto a la velocidad de consumo de sustrato en el medio de fermentación durante el proceso de producción de vitamina B₂. El grafico muestra que a partir de 0 horas la concentración de glucosa tiende a disminuir alcanzando el máximo consumo a las 72 horas, y manteniendo valores negativos hasta 144 horas.

VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CONSUMO DE SUSTRATO.

$$q_s = -\frac{1}{x} \times \left(-\frac{ds}{dt} \right)$$

donde:

q_s : velocidad especifica de consumo de sustrato (g/Lh)

$\frac{ds}{dt}$: velocidad volumétrica de consumo de sustrato

x: gramos de biomasa / litros de muestra

Ejemplo para t = 24 horas

$$q_s = -\frac{1}{8.17} \times (-0.00028)$$

$q_s = 0.000034$ g/Lh.

TABLA N° 19 : RESULTADOS DE VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CONSUMO DE SUSTRATO DURANTE EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE VITAMINA B₂.

Tiempo (h)	Concentración (mg/ml)	qS (g/Lh)
0	0,0353	0,000000
24	0,0287	0,000034
48	0,0207	0,000035
72	0,0104	0,000036
144	0,0259	0,000007

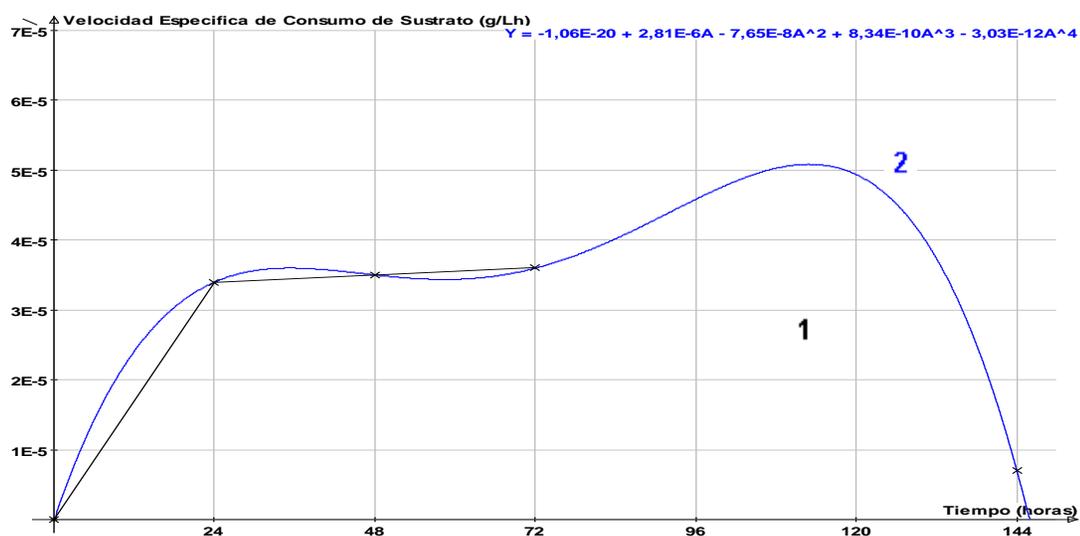


Fig. N° 21: Curva de Velocidad Específica de Consumo de Sustrato (g/Lh) Vrs. Tiempo (horas) para la producción de vitamina B₂.

Curva N° 1 es el resultado obtenido a través de la aplicación de la fórmula de velocidad específica a los datos experimentales.

Curva N° 2 se obtiene aplicando el método de regresión polinomial a los resultados obtenidos experimentalmente.

La figura N° 21 muestra la relación existente entre mg de sustrato consumido entre mg de biomasa que se forma en un litro de medio de fermentación. A partir de las 24 horas es mayor la cantidad de mg de sustrato consumido que los mg de biomasa que se forman obteniéndose la máxima velocidad específica de consumo de sustrato a las 72 horas de haber iniciado la fermentación.

CÁLCULO DE CONCENTRACIÓN DE VITAMINA B₂ POR MÉTODO ESPECTROFOTOMETRICO.

DATOS:

Longitud de onda utilizada: 445nm

Estándar utilizado: St de Riboflavina

$$\text{mg de riboflavina} = \text{mg estándar de riboflavina} \times \frac{AT - AT'}{AS - AS'}$$

Ejemplo:

mg estándar de riboflavina = 15mg

AT = 0.149

AT' = 0.101

AS = 0.526

AS' = 0.067

$$\text{mg de riboflavina} = 15\text{mg} \frac{(0.149 - 0.101)}{(0.526 - 0.067)}$$

mg de riboflavina = 1.57mg/L

TABLA N° 20 : RESULTADOS DE CONCENTRACIÓN DE VITAMINA B₂ DURANTE EL PROCESO DE PRODUCCIÓN.

Nº Muestra	Tiempo (h)	Concentración (mg/L)	Concentración (g/L)
1	0	1,64	0,00164
2	24	1,81	0,00181
3	48	2,07	0,00207
4	72	2,48	0,00248
5	144	1,51	0,00151

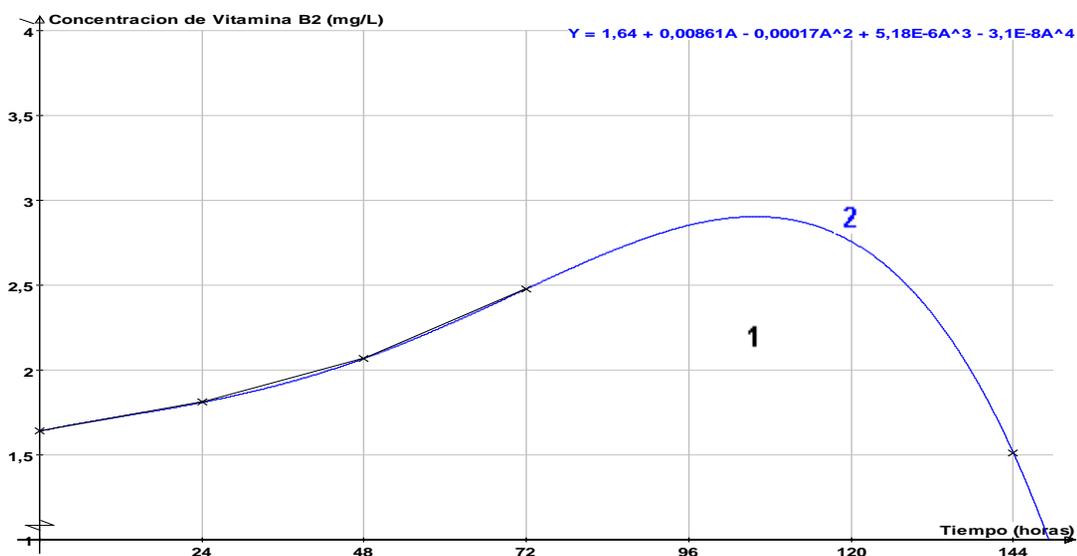


Fig. N° 22: Concentración de Vitamina B₂ (mg/L) Vrs. Tiempo (horas).

Curva N° 1 es el resultado obtenido a través de la aplicación de la fórmula $\text{mg de riboflavina} = \text{g estándar de riboflavina} \times \frac{AT - AT'}{AS - AS'}$ a los datos experimentales.

Curva N° 2 se obtiene aplicando el método de regresión polinomial a los resultados obtenidos experimentalmente.

La figura N° 22 muestra que a partir de las 24 a 72 horas se observa un incremento en la concentración de vitamina B₂ alcanzando su máximo valor a las 72 horas con una producción de 2.48 mg /L de medio.

VELOCIDAD VOLUMÉTRICA DE PRODUCCIÓN DE VITAMINA B₂.

$$Q_p = \frac{p_2 - p_1}{t_2 - t_1} = \frac{dp}{dt}$$

donde:

Q_p: velocidad volumétrica de producción de vitamina B₂ (g/Lh)

P₂: concentración (g/L) de vitamina B₂ (g/Lh)

P₁: concentración (g/L) de vitamina B₂ (g/Lh)

t₂: tiempo final

t₁: tiempo inicia

Ejemplo para t = 24 horas

$$Q_p = \frac{0.00181 - 0.00164}{24 - 0} = \frac{dp}{dt}$$

$$Q_p = 7.1E-6 \text{ g/Lh}$$

TABLA N° 21 : RESULTADOS DE VELOCIDAD VOLUMÉTRICA DE PRODUCCIÓN DE VITAMINA B₂.

Tiempo (h)	Concentración (mg/ml)	Qp (g/Lh)
0	0,00164	0,0000000
24	0,00181	0,0000071
48	0,00207	0,0000090
72	0,00248	0,0000117
144	0,00151	-0,0000009

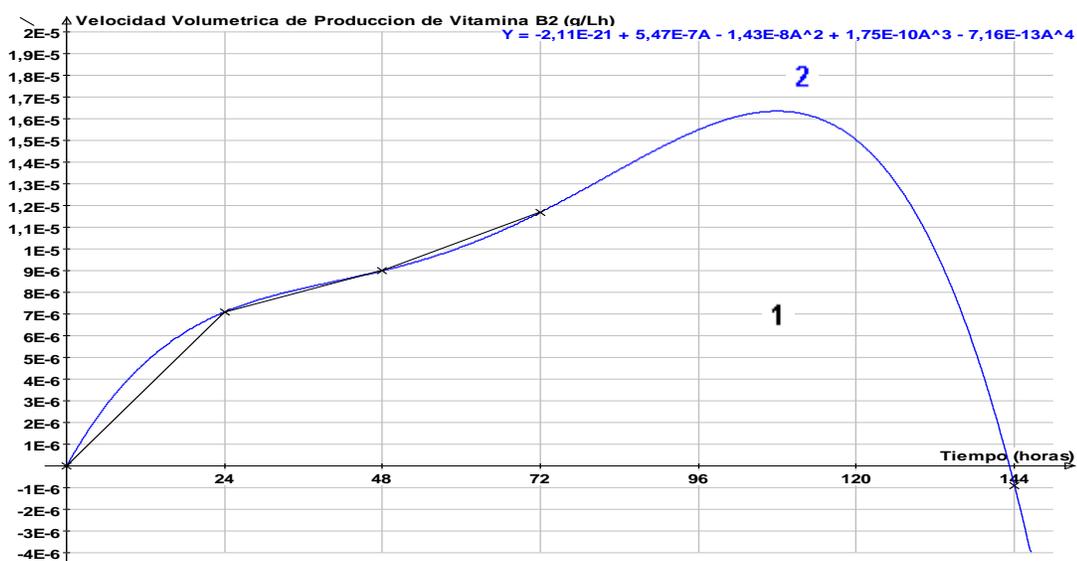


Fig. N° 23: Curva de Velocidad Volumétrica de producción de Vitamina (g/Lh) Vrs. Tiempo (horas) para la producción de Vitamina B₂.

Curva N° 1 es el resultado obtenido a través de la aplicación de la fórmula de velocidad volumétrica a los datos experimentales.

Curva N° 2 se obtiene aplicando el método de regresión polinomial a los resultados obtenidos experimentalmente.

La figura N° 23 muestra la tendencia de producción de vitamina B₂ expresada en (g/Lh) presente en las muestras en los diferentes tiempos evaluados. La velocidad volumétrica de producción aumenta desde las 24 a 72 horas alcanzando su máximo valor de producción a las 72 horas y luego disminuye hasta las 144 horas.

VELOCIDAD ESPECÍFICA DE PRODUCCIÓN DE VITAMINA B₂.

$$q_p = \frac{1}{x} \times \frac{ds}{dt}$$

donde:

q_p : velocidad específica de producción de vitamina B₂

x : gramos de biomasa / litros de muestra analizada

$\frac{ds}{dt}$: velocidad volumétrica de producción de vitamina B₂

Ejemplo para $t = 24$ horas

$$q_p = \frac{1}{8.17} \times (7.1 \text{ E} - 6)$$

$$q_p = 9.0\text{E}-7 \text{ g/Lh}$$

TABLA N° 22 : RESULTADOS DE VELOCIDAD ESPECÍFICA DE PRODUCCIÓN DE VITAMINA B₂.

Tiempo (h)	Concentración (mg/ml)	qp (g/Lh)
0	0,00164	0,0000000
24	0,00181	0,0000009
48	0,00207	0,0000010
72	0,00248	0,0000012
144	0,00151	-0,0000001

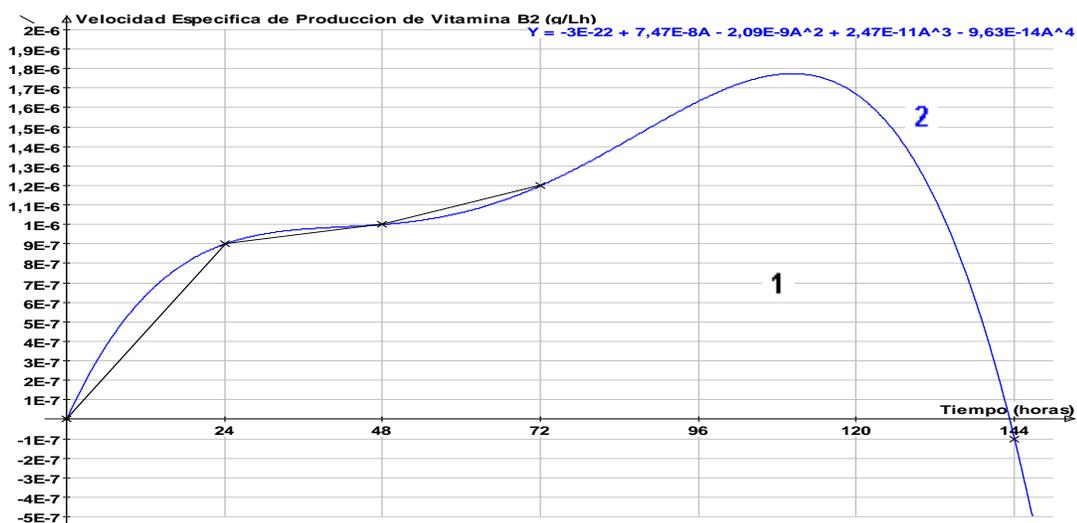


Fig. N° 24: Curva de Velocidad Específica de producción de Vitamina B₂ (g/Lh) Vrs. Tiempo (horas) para la producción de Vitamina B₂.

Curva N° 1 es el resultado obtenido a través de la aplicación de la fórmula de velocidad específica a los datos experimentales.

Curva N° 2 se obtiene aplicando el método de regresión polinomial a los resultados obtenidos experimentalmente.

La figura N° 24 muestra el comportamiento que experimenta la formación de producto para un tiempo específico. La velocidad específica de producción

aumenta a partir de las 24 horas a 72 horas alcanzando su máximo valor a las 72 horas y luego tiende a disminuir hasta las 144 horas.

RENDIMIENTO EN EL CULTIVO.

$$Y_{p/s} = \frac{dp}{-ds}$$

Donde:

$Y_{p/s}$: gramos de vitamina B₂ / gramos de sustrato consumido

dp: gramos de vitamina B₂

ds: gramos de sustrato consumido

Ejemplo para 0 horas

$$Y_{p/s} = \frac{(0.00181 - 0.00164)}{-(0.0287 - 0.0353)}$$

$Y_{p/s} = -0.0258$ gramos de vitamina B₂ / gramos de sustrato consumido.

TABLA N° 23 : RESULTADOS DE RENDIMIENTO DE VITAMINA B₂ EN EL MEDIO DE PRODUCCIÓN.

Tiempo (h)	g de producto/g de sustrato consumido	g/L de Producto	g/L de Sustrato
0	0,0258	0,00017	-0,007
24	0,0295	0,00043	-0,015
48	0,0337	0,00084	-0,025
72	-0,0138	-0,00013	-0,009
144	0,0258	0,00017	-0,007

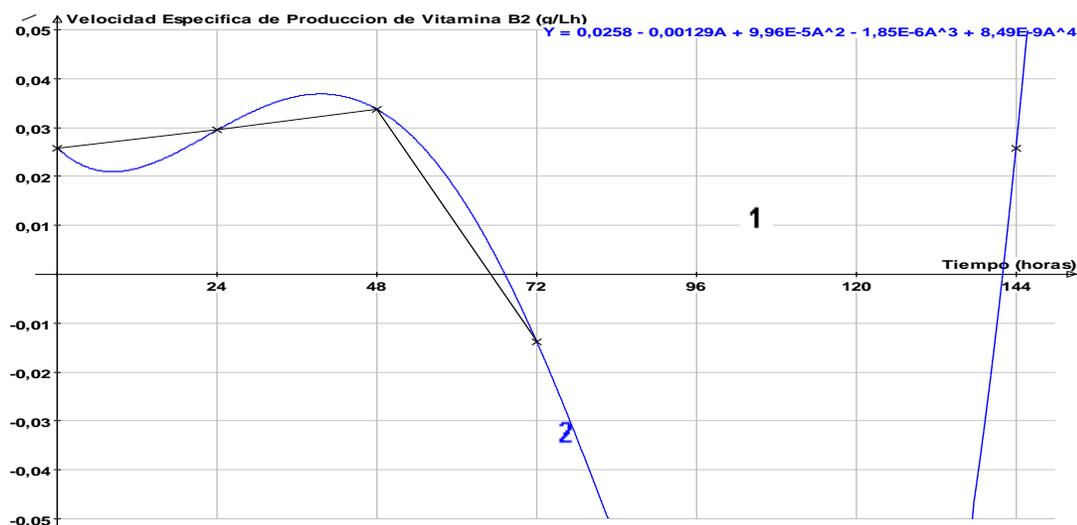


Fig. N° 25: Curva de rendimiento de producción de vitamina B₂ en el cultivo Vrs Tiempo (horas).

Curva N° 1 es el resultado obtenido a través de la aplicación de la fórmula de rendimiento a los datos experimentales.

Curva N° 2 se obtiene aplicando el método de regresión polinomial a los resultados obtenidos experimentalmente.

La figura N° 25 muestra la relación que existe entre la formación de producto y el consumo de sustrato. En las primeras 24 horas del proceso fermentativo la

producción de vitamina es mayor con relación a la cantidad de sustrato que se esta consumiendo manteniéndose esta tendencia hasta las 48 horas y luego a las 72 horas la cantidad de de sustrato que se esta consumiendo es superior a la cantidad de vitamina que se esta produciendo generando valores de rendimiento negativos

CAPITULO VI
CONCLUSIONES.

6.0 CONCLUSIONES

1. El agua de cocimiento de maíz enriquecida con aceite de soya es un medio de fermentación adecuado para la ***Saccharomyces cerevisiae***, por que permite adquirir los carbohidratos necesarios que son transformados en energía produciendo, durante la oxidación aeróbica el proceso de biosíntesis con el que se alcanza su máxima producción de riboflavina a las 72 horas, obteniendo un valor de 2.48 mg / L. en este periodo de tiempo.
2. ***Saccharomyces cerevisiae*** es un microorganismo productor de vitamina B₂ que bajo condiciones fermentativas apropiadas de temperatura ambiente, pH de 4.5, nutrientes como glicina y aceite de soya, producirán la vitamina B₂ a las 72 horas.
3. El proceso cinético para la obtención de vitamina B₂ se lleva acabo favorablemente en aerobiosis; La obtención de un rendimiento de vitamina B₂ se observa a las 72 horas.
4. La cantidad de levadura es un componente indispensable en el medio de fermentación y debe encontrarse en una relación de 10 g de levadura

adaptada por 24 horas en el medio de fermentación, por cada litro de medio de fermentación.

5. La biomasa obtenida en el caldo de fermentación alcanza un valor máximo de 9.63 g/L a las 72 horas, mostrando así, el desarrollo metabólico y los procesos bioquímicos de la ***Saccharomyces cerevisiae***.
6. En el caldo de fermentación los valores de pH se mantienen dentro del rango óptimo de (3.5 a 4.5 pH) en el que la ***Saccharomyces cerevisiae*** se desarrolla funcionalmente.
7. Los grados brix indican la presencia de los azúcares en los tres ensayos de fermentación, que el microorganismo productor utiliza como fuente de carbono para su desarrollo metabólico y así producir la vitamina B₂, por lo que en la grafica la curva de grados Brix inicio con 5.0 y disminuye a 4.2, representando el consumo de azúcares.
8. La fluorescencia observada en los ensayos de fermentación confirma la producción de vitamina B₂, alcanzando su máxima intensidad a las 72 horas el cual es el tiempo de máxima producción de riboflavina.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES.

7.0 RECOMENDACIONES

1. Que el agua de cocimiento de maíz debe ser sometido a un proceso apropiado que permita la mayor eliminación de sedimento alcalino presente para evitar que este interfiera en la determinación de biomasa.
2. Que durante todo el ensayo cinético de fermentación el medio de producción debe permanecer en constante agitación y aireación con un gas comprimido como lo es el oxígeno para optimizar el rendimiento de la vitamina B₂.
3. Que los fermentadores sean protegidos de la luz UV debido a que la luz descompone la vitamina B₂.
4. Que el agua de cocimiento de maíz enriquecido como se realizó en este estudio es un medio de producción de vitamina B₂ y puede ser utilizado para este fin.
5. Que los fermentadores deben ser no ferrosos, por que el hierro en una concentración mayor a 5 ppm afecta la producción de vitamina B₂.

6. Que en futuras investigaciones de la vitamina B₂ se deben utilizar como medios de fermentación otras aguas de desecho de la industria alimenticia, que cumplan con las condiciones necesarias para que la ***Saccharomyces cerevisiae*** u otro microorganismo se adapte y produzca riboflavina.
7. Que se sigan realizando investigaciones y se lleve a la práctica esta investigación ya que en nuestro país no se produce esta vitamina a nivel industrial y dependemos de proveedores extranjeros para la utilización de esta vitamina.
8. Que se continué la investigación de esta tesis para la extracción de la vitamina B₂ ya que se podría obtener cantidades de la vitamina, para su utilización.

BIBLIOGRAFIA.

1. Alas. García, A.E. “Caracterización Nutricional de Granos Básicos” Universidad de El Salvador, Facultad de Química y Farmacia. Diciembre 1980.
2. Brown, GM. y otros. 1989 Introducción a la Biotecnología. Editorial Acribia S.A., Zaragoza España. 108p.
3. Castellanos Rodríguez, B.H. Riumbaud “Producción de Proteínas Unicelulares, Utilizando Agua de Cocimiento de Maíz Como Medio de Cultivo y Estudio Cinético de *Cándida utilis*” Universidad de El Salvador, Facultad de Química y Farmacia. 2003.
4. Choto Granados, L.M. “Extracción del Aceite de Semilla de Soya y su aplicación en la Formulación de un tratamiento Capilar” Universidad de El Salvador, Facultad de Química y Farmacia. Marzo 1997.
5. Hernández Henríquez, R.M. “Ensayo de Obtención de Vitamina B₂ por Proceso de Fermentación Sumergida a partir de Jugo de la Cáscara de Piña Utilizando *Saccharomyces cerevisiae*”. Universidad de El Salvador, Facultad de Química y Farmacia. Marzo 1998.

6. Lieberman, M y otros. 1988 Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos Secretaria de Salud. Farmacopea NACIONAL DE MEXICO. Quinta Edición México DF. 860p.
7. Jagnow, G y otros. 1991 Biotecnología; Introducción con experimentos modelo. Editorial Acribia S.A., Zaragoza España. Trad. MO López. capítulo IV. 61-62, 140-144p.
8. Kirk, RE y otros 1961. Enciclopedia de Tecnología Química, Editorial Uteha, México. Tomo VII; 876p, X; 77p, XIV; 72p.
9. Remington G, 1987 Farmacia. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, 1987. 17 Edición, Tomo II 1391-1393p.
10. Rodríguez C. "Obtención de Alcohol Etílico a partir del Jugo de Maíz" Universidad de El Salvador, Facultad de Química y Farmacia. Septiembre 1986.
11. Scragg, A 1996. Biotecnología para ingenieros Sistemas Biológicos en Procesos Tecnológicos. 1ª edición Editorial Limusa México. Trad. L Huerta, 191 – 224p.

12. Ministry of Health and Welfare, THE PHARMACOPEIA OF JAPAN.
Eighth edition, part 2, 1971 english Edition Edición en Ingles por Ministry
of Health and Welfare 666-667p.
13. Wulf, G y otros. 1993 Biotecnología Manual de microbiología Industrial. 1ª
edición. Editorial Acribia S.A. Zaragoza España. capítulo V 73 – 125p.
14. <http://www.enbuenasmanos.com/articulos/muestra.asp?art=626>
15. <http://www.fao.org/docrep/T0395S/T0395S07.htm>
16. "http://es.wikipedia.org/wiki/Aceite_vegetal"
17. <http://www.google.com/u/unfao?q=riboflavina&hl=es&lr=&ie=UTF-8&domains=fao.org&siteSearch=fao.org&start=10&sa=N>.

ANEXOS 1

ANEXOS 1

Reactivos:

Medio de cultivo:

- Peptona comercial
- Aceite de soya
- D-Glucosa
- Sacarosa
- Glicina
- Hidrosulfito de Sodio. Calidad A.C.S.
- Ácido Acético glacial. Grado reactivo
- Ácido clorhídrico 6N
- Ácido sulfúrico. Grado reactivo
- Sulfato de zinc 10%
- Hidróxido de sodio 0.5N
- Fenol 80%
- Agua destilada
- Agua de cocción de Maíz

Microorganismo:

- Levadura (***Saccharomyces Cerevisiae***)

ANEXOS 2

Cristalería:

- Beaker: 10, 50, 100, 250 y 1000ml
- Probetas: 100, 500 y 1000 ml
- Pipetas volumetricas: 1, 5 y 10 ml
- Erlenmeyer: 100, 250 y 1000ml
- Kitazatos: 250 y 1000ml
- Tubos de ensayo: 10 y 20 ml
- Tubos de ensayo con tapón de rosca: 10 y 20 ml
- Balones volumétricos: 10, 25, 100 y 1000 ml
- Embudos grandes y medianos pyrex
- Agitadores de vidrio
- Vidrio de reloj
- Espátulas
- Mechero Fisher
- Frasco lavador
- Gradilla plástica
- Papel filtro micropore
- Mangueras de PVC estériles
- Papel aluminio.

ANEXOS 3

Equipo:

- Autoclave
- Stirrer / Hot plate CORNING PC 420
- Refrigeradora
- Balanza semianalítica Mettler PN 1210
- Balanza analítica Mettler
- Centrifugadora
- Espectrofotómetro 20D MILTON ROY COMPANY
- pHmetro METROHM 632
- Estufa Fisher HECONOTEMP
- Bomba de aire.
- Desecador.
- Cámara con lámpara ultra violeta.

ANEXOS 4

METODO ESPECTROFOTOMETRICO PARA RIBOFLAVINA. (12)

Carry out the operation by protecting from direct sunlight and using the light resistant apparatus. Weigh accurately about 0.015g of Riboflavin, previously dried, dissolve in 800 ml of diluted glacial acetic acid (1-400) while warming, cool, and add water to make exactly 100 ml, and use this solution as the sample solution. Dry Riboflavin Reference Standard at 105 C for 2 hours, weigh accurately about 0.015g, and prepare the Standard solution in the same manner as the preparation of the sample solution. Measure the absorbances of de sample solution and the Standard solution A_t and A_s using water as a blank at 445mu. Add 0.02g of sodium hydrosulfite to 5 ml of each solution, shake until decolorized, and immediately, measure the absorbances, A_t' and A_s' of each solution.

Amount (mg) of riboflavin ($C_{17}H_{20}N_4O_6$) = amount (mg) of Riboflavin Reference Standard $\times \frac{A_t - A_t'}{A_s - A_s'}$