

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



PROPUESTA DE EVALUACION DE LA CINETICA DE FERMENTACION
PARA LA OBTENCION DE VITAMINA B₁₂ UTILIZANDO LA CEPA DEL
GENERO *Propionibacterium freuderenchii*

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR
WILFREDO EDGARDO CASTILLO RODRIGUEZ
ELIGIO RODAS MEJIA

16 DE FEBRERO
DE 1841

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIATURA EN QUIMICA Y FARMACIA

OCTUBRE DE 2007

SAN SALVADOR, EL SALVADOR CENTRO AMERICA



©2004, DERECHOS RESERVADOS

Prohibida la reproducción total o parcial de este documento,
sin la autorización escrita de la Universidad de El Salvador

<http://virtual.ues.edu.sv/>

SISTEMA BIBLIOTECARIO, UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTORA

Dra. Maria Isabel Rodríguez

SECRETARIA GENERAL

Lic. Alicia Margarita Rivas de Recinos

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANO

Lic. Salvador Castillo Arévalo

SECRETARIA

MSc. Miriam del Carmen Ramos de Aguilar

COMITÉ DE TRABAJOS DE GRADUACION

COORDINADORA GENERAL

Licda. Maria Concepción Odette Rauda Acevedo

ASESORA DE AREA DE APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES

MSc. Sonia Maricela Lemus Martinez

ASESORA DE AREA DE ANALISIS DE ALIMENTOS: MICROBIOLOGICO

MSc. Maria Evelyn Sánchez de Ramos

DOCENTES DIRECTORAS

MSc. Maria del Carmen Guillen de Medrano

Licda. Maria Elsa Romero de Zelaya

AGRADECIMIENTOS

A NUESTROS DOCENTES DIRECTORES:

Licda. Maria Elsa Romero de Zelaya y MSc. Maria del Carmen Guillen de Medrano. Por su asesoria, tiempo, apoyo, paciencia, y dedicación para la realización de este trabajo

Agradecimiento especial a MSc. Tania Ethel Cuadra por su valioso aporte y colaboración en el desarrollo de esta investigación

A LA COORDINADORA GENERAL Y ASESORES DE AREAS

Licda. Maria Odette Rauda, MSc. Sonia Maricela Lemus, MSc Maria Evelyn Sanchez de Ramos. 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

Wilfredo y Eligio

DEDICATORIA

- A DIOS TODO PODEROSO
Quien fue mi constante apoyo en los momentos en que todo parecía perdido y por nunca soltarme de su mano

- A MIS PADRES
Wilfredo Antonio Castillo Ardón y Maria Silvia de Castillo por la paciencia y apoyo que me brindaron a ellos dedico este triunfo

- A MIS ABUELOS
Marta Alicia Meléndez por su amor incondicional y sabios consejos

- A MIS HERMANOS
Silvia Marisol Castillo y Vladimir Alberto Moran por todas las veces que estuvieron a mi lado en los momentos que más los necesitaba

- A MI COMPAÑERO DE TESIS
Eligio Rodas Mejía por compartir el mismo objetivo y su amistad de muchos años

- AL PERSONAL DE MICROBIOLOGIA
Los docentes por contribuir a mi formación profesional

- A MIS AMIGOS
A todos mis amigos quienes me acompañaron en toda mi carrera Rigoberto, Rafael, Ever, Mario, Juan Carlos Rodny, a mis Amigas Keny, Anabel, Gloria, Monica, Heydi, Amelia, Wendy, Claudia, Mirna, Vanessa a mi novia Brenda por su apoyo y a todas las personas que en toda mi carrera he conocido y formaron parte de mi vida en algún momento gracias y a quienes se encuentran formando parte de este logro... Gracias

Wilfredo Edgardo Castillo

DEDICATORIA

- A JEHOVA DIOS DE LOS EJERCITOS,
Que con su grande amor e infinita misericordia llena mi vida

- A MIS PADRES,
Carlos y Eloisa son el mejor regalo que DIOS me ha dado, gracias por su incondicional amor y apoyo para culminar mi carrera

- A MIS HERMANOS,
María, Berta, José, Rosa, Jesús mi éxito también es vuestro Gracias por cada momento que hemos compartido en la vida

- A MIS SOBRINOS,
Eduardito, Carlos, Enrique, Jonathan, Lucy, Karla, Natalia, Xochielt, David

- A MIS ABUELOS,
José (Q.D.D.G), Eligio (Q.D.D.G), Medarda, Anastasia

- A MIS TIOS,
Por su invaluable cariño y apoyo

- A MI COMPAÑERO DE TESIS,
Wilfredo Edgardo Castillo por compartir el mismo objetivo y su amistad de muchos años

- AL PERSONAL DE EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA
Por su paciencia y apoyo incondicional en el desarrollo de esta Investigación

- A MIS AMIGOS,
Roberto, Paulino, Joel, Silvia, Carolina, Rigo, Keny, Brenda y Nelson por Compartir durante muchos años una meta en común

Eligio Rodas Mejía

INDICE

CONTENIDO	PÀGIN
RESUMEN	
CAPITULO I	
1.0INTRODUCCION	xxii
CAPITULO II	
2.0OBJETIVOS	25
2.1. Objetivo General	25
2.2. Objetivo Específico	25
CAPITULO III	
3.0MARCO TEORICO	27
3.1 Biotecnología Microbiana	27
3.2 Microorganismos Industriales	28
3.2.1 De donde provienen la cepas industriales	28
3.2.2 Bacteria: Propionibacterium	30
3.2.3 Requisitos de un microorganismo industrial	31
3.2.4 Clases de productos Industriales	32
3.3 El Suero Definición Composición y Características	33
3.3.1 Definición	33
3.3.2 Composición	34
3.3.3 Características	34
3.3.4 Aprovechamiento del Suero	36
3.3.5 Por qué se debe aprovechar El Suero Lácteo	37

3.4 Agua de Cocimiento de Maíz	38
3.5 Vitaminas	39
3.5.1 Vitamina B ₁₂	40
3.5.2 Existencia y Significado Económico	41
3.5.3 Estructura y Función	43
3.5.4 Propiedades	46
3.5.5 Obtención Biotecnológica	46
3.6 Que es el Crecimiento Microbiano	49
3.6.1 Medición del Crecimiento Microbiano	50
3.6.2 Peso Seco Celular	50
3.6.3 Absorción	52
3.6.4 Peso Húmedo	52
3.6.5 Volumen de Celulas Empacadas	53
3.6.6 Numero de Celulas	53
3.6.7 Masa de un Componente Celular	53
3.6.8 Mediciones Físicas	54
3.7 Crecimiento en Cultivo Intermitente	54
3.8 Factores que Afectan la Rapidez de Crecimiento	57
3.9 Evaluación de la Cinética de Crecimiento Microbiano	57
3.9.1 Crecimiento de Microorganismos	58
3.9.1.1 Velocidad Volumétrica de Generación de Celulas	58
3.9.1.2 Velocidad Específica de Generación de Celulas	58

3.9.2 Consumo de nutrientes	59
3.9.2.1 Velocidad Volumétrica de Consumo de Sustrato	59
3.9.2.2 Velocidad Específica de Consumo de Sustrato	59
3.9.3 Formación de Producto	60
3.9.3.1 Velocidad Volumétrica de Formación de Producto	60
3.9.3.2 Velocidad Específica de Formación de Producto	60
3.9.4 Rendimiento en el Cultivo	61
CAPITULO IV	
4.0 DISEÑO METODOLOGICO	63
4.1 Tipo de Estudio	63
4.2 Investigación Bibliografica	63
4.3 Investigación de Campo	63
4.4 Parte Experimental	64
4.4.1 Medio de Crecimiento de la Cepa	64
4.4.2 Composición del Medio de Fermentación	65
4.4.3 Preparación del Biorreactor	66
4.4.4 Obtención del Sustrato	67
4.4.5 Proceso de Fermentación	68
4.4.6 Determinaciones Analíticas	69
4.4.6.1 Determinación de Biomasa por Peso Seco	69
4.4.6.2 Determinación de pH	70
4.4.6.3 Determinación de Grados Brix	71

4.4.6.4 Elaboración de Curva Estándar de Glucosa	72
4.4.6.5 Determinación de Azúcares Totales	73
4.4.6.6 Cuantificación de Vitamina B ₁₂	75
CAPITULO V	
5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	77
5.1 Resultado de Procesos Experimentales Ensayos A, B, B ₁ y C	78
5.2 Breve Análisis de los Procesos Fermentativos A, B, B ₁ y C	91
5.3 Velocidad Volumétrica de Biomasa por Peso Seco	93
5.4 Velocidad Específica de Biomasa por Peso Seco	96
5.5 Velocidad Volumétrica de Consumo de Sustrato	102
5.6 Velocidad Específica de Consumo de Sustrato	104
5.7 Calculo de la Concentración de Vitamina B ₁₂ a través del Método Espectrofotométrico	107
5.8 Velocidad Volumétrica de Producción de Vitamina B ₁₂	110
5.9 Velocidad Específica de Formación de Vitamina B ₁₂	112
5.10 Rendimiento en el Cultivo	114
CAPITULO VI	
6.0 CONCLUSIONES	121
CAPITULO VII	
7.0 RECOMENDACIONES	125
BIBLIOGRAFIA	
ANEXOS	

INDICE DE TABLAS

Tabla N°		PÁGINA
1:	Composición del Suero Dulce y del Suero Ácido	34
2:	Valores Medios de la Demanda Biológica de Oxígeno de Leche y Algunos Subproductos Lácteos	37
3:	Determinación de Azúcares Totales por El Método de Fenol-Sulfúrico	74
4:	Composición del Medio de Fermentación A	78
5:	Composición del Medio de Fermentación B	78
6:	Composición del Medio de Fermentación C	79
7:	Resultados de Biomasa en Ensayos A, B, B ₁ y C	80
8:	Resultados de pH en Ensayos A, B, B ₁ y C	81
9:	Resultados de Grados Brix en Ensayos A, B, B ₁ y C	83
10:	Resultados de Absorbancia en Muestras para la Determinación De Azúcares por el Método de Fenol- Sulfúrico	84
11:	Resultados de Concentración de Azúcares en Ensayos A, B, B ₁ y C	85
12:	Resultados de Absorbancia de Vitamina B ₁₂ en Ensayos A, B, B ₁ y C	87
13:	Resultados de Concentración de Vitamina B ₁₂ en Ensayos A, B, B ₁ y C	89

14: Resultados del Análisis de Muestras por el Método de Peso Seco Durante el Proceso de Producción de Vitamina B ₁₂	92
15: Resultados Velocidad Volumétrica de Biomasa por Peso Seco Durante el Proceso de Producción de Vitamina B ₁₂	94
16: Resultados Velocidad Especifica de Biomasa por Peso Seco Durante el Proceso de Producción de Vitamina B ₁₂	97
17: Resultados de Curva Estándar de Glucosa Mediante la Aplicación del Método Fenol- Sulfúrico para la Cuantificación de Azucares Totales	98
18: Resultado de la Aplicación de la Regresión Lineal al Análisis de Muestras por El Método Fenol-Sulfúrico para la Cuantificación de Azucares Totales	100
19: Aplicación de la Regresión Polinomial a los Resultados del Análisis de Muestras para la Cuantificación de Azucares Totales	101
20: Resultados Velocidad Volumétrica de Consumo de Sustrato Durante el Proceso de Producción de Vitamina B ₁₂	102
21: Resultados Velocidad Especifica de Consumo de Sustrato Durante el Proceso de Producción de Vitamina B ₁₂	105

22: Resultados de Concentración de Vitamina Durante el Proceso de Producción de Vitamina B ₁₂	108
23: Resultados Velocidad Volumétrica de Producción de Vitamina	110
24: Resultados Velocidad Especifica de Producción de Vitamina	113
25: Resultados de Rendimiento de Vitamina B ₁₂ en el Medio de Fermentación	115
26: Resultados de pH en el Proceso de Producción de Vitamina B ₁₂	116
27: Resultados Grados Brix Durante el Proceso de Producción de Vitamina B ₁₂	118
28: Procedimiento para Calcular Biomasa por El Método de Peso Seco en El Ensayo B	143
29: Procedimiento para Calcular Biomasa por El Método de Peso Seco en El Ensayo B ₁	143
30: Promedio de Biomasa en Ensayos B y B ₁	144
31: Promedio de Absorbancia en Determinación de Azucares Por El Método Fenol-Sulfúrico en B y B ₁	145
32: Promedio de pH de B y B ₁	146
33: Promedio de Grados Brix en B y B ₁	147

ANEXO N°	INDICE DE ANEXOS	PÁGINA
	1: Información Comercial de la Importación Acumulada de Vitamina B ₁₂ y Derivados en El Salvador	130
	2: Preparación del Medio 33 Agar Jugo de Tomate	132
	3: Medio de Conservación de la Cepa	134
	4: Calibración del pHmetro	136
	5: Cuantificación de Cianocobalamina	139
	6: Frotis de Cepa <i>Propionibacterium freudenreichii</i>	141
	7: Determinación de Biomasa por El Método de Peso Seco	143
	8: Promedio de Absorbancia en Determinación de Azúcares por El Método de Fenol- Sulfúrico en B y B ₁	145
	9: Promedio de pH de B y B ₁	146
	10: Promedio de Grados Brix de B y B ₁	147
	11: Condiciones de Anaerobiosis	148
	12: Aprovechamiento de Suero de Queso	150

FIGURA N°	INDICE DE FIGURAS	PÁGINA
	1: Aprovechamiento del Suero de Queso	150
	2: Estructura de la Vitamina B ₁₂	44
	2.1: Participación de B ₁₂ - Coenzima en la síntesis de Metionina	45
	2.2 Ciclo de crecimiento intermitente	55
	3: Proceso de Preparación del Biorreactor	66
	4: Proceso de Fermentación de Vitamina B ₁₂	68
	5: Determinación de Biomasa por Peso Seco	69
	6: Determinación de Grados Brix	71
	7: Elaboración de Curva Estándar de Glucosa	72
	8: Azúcares Totales Método Fenol- Sulfúrico	73
	9: Resultados Biomasa vrs Tiempo en Ensayos de Producción de Vitamina B ₁₂	80
	10: Resultados pH vrs Tiempo para Producción de Vitamina B ₁₂	82
	11: Resultados de Grados Brix vrs Tiempo para Ensayos de Producción de Vitamina B ₁₂	83
	12: Resultados de Concentración de Azúcar vrs Tiempo para Ensayos de Producción de Vitamina B ₁₂	86
	13: Resultados de Absorbancia de Vitamina vrs Tiempo para Ensayos de Producción de Vitamina B ₁₂	87

14: Resultados de Concentración de Vitamina B ₁₂ vrs Tiempo para Ensayos de Producción de Vitamina B ₁₂	89
15: Curva de Biomasa Ln X Vrs Tiempo para Ensayos de Producción de Vitamina B ₁₂	92
16: Curva de Velocidad Volumétrica de Biomasa vrs Tiempo para la producción de vitamina B ₁₂	95
17: Curva de Velocidad Específica de Biomasa vrs Tiempo para la producción de vitamina B ₁₂	97
18: Curva Estándar de Glucosa	99
19: Curva de Concentración de Azúcares en Muestras Vrs Tiempo Método Fenol – Sulfúrico	100
20: Curva de Velocidad Volumétrica Consumo de Sustrato vrs Tiempo para la producción de vitamina B ₁₂	103
21: Curva de Velocidad Específica de Consumo de Sustrato Vrs. Tiempo para la producción de vitamina B ₁₂ .	105
22: Concentración de Vitamina vrs Tiempo	108
23: Curva de Velocidad Volumétrica Producción de Vitamina vrs Tiempo para la producción de vitamina B ₁₂	111
24: Curva de Velocidad Específica de Producción de Vitamina Vrs. Tiempo para la producción de vitamina B ₁₂	113
25: Curva Rendimiento de Producción de vitamina B ₁₂ En el cultivo Vrs Tiempo	115

26: Curva pH vrs Tiempo para la producción de Vitamina B ₁₂ .	117
27: Curva Grados Brix vrs Tiempo en Producción Vitamina B ₁₂	118
28: Cuantificación de la Cianocobalamina	139
29: Frotis de la Cepa <i>Propionibacterium freudenreichii</i>	141

INDICE DE CUADROS

CUADRO N°:	PÀGINA
1: Colecciones de Cultivos que suministran Cultivos de Microorganismos Industriales	29
2: Métodos para la Cuantificación del Crecimiento de Poblaciones Microbianas	50
3: Servicio de Apoyo al Comercio Exterior Departamento de Información Comercial Importación Acumulada de Vitamina B ₁₂ y Derivados El Salvador 2005	130

ABREVIATURAS

ATCC : Colección Tipo de Cultivos Americanos

°C :Grados Centígrados

Lb.:Libras

C.S.P : Cantidad Suficiente Para

mL : Mililitros

TSA :Trypticase Soya Agar

t :Tiempo

g :Gramos

L :Litros

h :horas

rpm :Revoluciones por Minuto

DQO: Demanda química de oxígeno

nm :Nanómetros

µg :Microgramos

mg .Miligramos

M_x : Muestra

RS : Solución de Referencia

S_t .:Estándar

C : Concentración

Abs. : Absorbancia

RESUMEN

En el presente estudio de investigación damos a conocer el comportamiento cinético de fermentación para obtención de vitamina B₁₂ a través de procesos biotecnológicos de fermentación usando como microorganismo la cepa ***Propionibacterium freudenreichii*** ATCC 9617 y como fuente de carbono un residuo de la industria láctea como lo es el suero de leche el cual es un medio abundante y de bajo costo

Se experimento con tres medios de fermentación A, B y C cada uno con diferente composición y bajo las mismas condiciones experimentales de fermentación esto con el fin de poder seleccionar el medio mas adecuado para la producción de vitamina B₁₂

A cada una de las muestras se les determino pH, grados brix, biomasa (peso seco), azúcares totales (fenol - sulfúrico) y producción de vitamina B₁₂

En la evaluación de la cinética microbiana el medio de fermentación B presento una mejor cinética microbiana obteniéndose un rendimiento máximo a las 120 horas de iniciado el proceso de fermentación durante la etapa de aerobiosis de 11,2 mg de Vitamina B₁₂ sin purificar por cada litro de suero

Recomendamos que se sigan realizando investigaciones en la producción de vitamina B₁₂ para ya no depender de proveedores externos para la adquisición de esta materia prima que es tan importante para la formulación de diversos productos farmacéuticos y así contribuir en el bienestar y la salud de la población Salvadoreña

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCION

La microbiología industrial originalmente empezó con los procesos de fermentación alcohólica, posteriormente, se desarrollaron los procesos microbianos para la producción de metabolitos o productos farmacéuticos como antibióticos, vitaminas, enzimas y otros.

Con esta investigación damos a conocer el comportamiento cinético de fermentación para producción de vitamina B₁₂ usando como fuente de carbono un residuo de la industria láctea como lo es el suero de leche el cual es un medio complejo, nutritivo y de bajo costo

Que actualmente en el país no está recibiendo un uso apropiado y su mal descarte conduce a aún daño al medio ambiente.

El estudio cinético realizado mostró resultados favorables por lo que podemos empezar a pensar en producir vitamina B₁₂ en el país y de esa manera con el tiempo no necesitar la importación de esta materia prima.

El microorganismo que se uso para el estudio cinético de producción de vitamina B₁₂ es el ***Propionibacterium freudenreichii*** ATCC 9617 y el medio de propagación de la cepa es medio 33 agar jugo de tomate

Una vez que se obtuvo el crecimiento favorable de la cepa se procedió a inocular el medio de fermentación previamente seleccionado el cual contiene suero de leche como fuente de carbono, agua de cocimiento de maíz como fuente de nitrógeno y Cloruro de Cobalto (CoCl₂) el cual ayuda a la formación estructural de la vitamina.

Durante el proceso de fermentación se retiró una muestra por día y se colocaron en refrigeración para posteriores análisis a cada una de ellas se les determinó: biomasa, pH, grados brix, azúcares totales y producción de vitamina B₁₂.

Con los resultados experimentales se procedió a realizar los cálculos necesarios para conocer el comportamiento cinético mostrado por el microorganismo en el medio seleccionado y también el tiempo óptimo de producción del metabolito y de esta manera poder concluir si es o no factible la utilización del suero de leche de vaca como sustrato para la obtención de vitamina B₁₂.



CAPITULO II

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

2.1.1 Evaluar la cinética de fermentación para la obtención de vitamina B₁₂ utilizando la cepa del genero ***Propionibacterium freuderenchii***

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Realizar el proceso de obtención de vitamina B₁₂ a través de la cinética microbiana

2.2.2 Utilizar lacto suero como medio de cultivo en la obtención de vitamina B₁₂ a través de un proceso fermentativo

2.2.3 Determinar por medio de la cinética microbiana los datos experimentales biomasa, azúcares totales y consumidos, grados brix, pH y rendimiento obtenido durante la cinética de crecimiento y producción de vitamina B₁₂

2.2.4 Describir la influencia de las etapas de anaerobiosis y aerobiosis en el proceso experimental de obtención de vitamina B₁₂

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1 BIOTECNOLOGIA MICROBIANA ⁽²⁾

Biología es la disciplina que se refiere al uso de los organismos vivos o de sus productos en procesos industriales a gran escala. La biología microbiana es ese aspecto se refiere a los procesos en los que intervienen microorganismos. La biología microbiana, a veces llamada microbiología industrial es un antiguo campo que ha sido rejuvenecido en años recientes debido a la adición de técnicas de ingeniería genética. La microbiología industrial originalmente empezó con los procesos de fermentación alcohólica, por ejemplo la fabricación de cerveza o de vino. Posteriormente, se desarrollaron los procesos microbianos para la producción de metabolitos y productos farmacéuticos, por ejemplo los antibióticos, producción de aminoácidos, para la producción de enzimas y aditivos alimentarios y sustancias químicas industriales, como el butanol y el ácido cítrico.

La biología microbiana se divide en dos fases

1. Tecnología microbiana tradicional, que implica la fabricación a gran escala, por microorganismos, de productos que normalmente son capaces de fabricar. En esos procesos biotecnológicos la tarea principal del microbiólogo es modificar el organismo o el proceso para que se obtenga el rendimiento más alto del producto que se desea.
2. Tecnología microbiana con organismos alterados mediante procesos de ingeniería, la cual comprende el uso de microorganismos en los cuales se ha

insertado genes extraños. En esta nueva tecnología, el microbiólogo industrial trabaja estrechamente asociado con el ingeniero genético en el desarrollo de un organismo adecuado, para no solamente producir un producto nuevo, de interés, sino que pueda ser cultivado en la gran escala necesaria para su explotación comercial.

3.2 MICROORGANISMOS INDUSTRIALES⁽²⁾

No todos los microorganismos tienen un uso industrial. En tanto que los microbios aislados en la naturaleza presentan el crecimiento celular como su propiedad fisiológica más importante, se han seleccionado cuidadosamente los microorganismos industriales, porque fabrican uno o más productos específicos. Aún en el caso de un microorganismo industrial, aislados mediante las técnicas tradicionales, se transforma en un organismo "altamente" modificado antes de ingresar a la industria. Los microorganismos industriales son, en un grado considerable, especialistas metabólicos capaces de producir específicamente y con un alto rendimiento metabolitos, particulares. A fin de obtener esta elevada especialización metabólica, las cepas industriales se alteran genéticamente ya sea por mutación o por recombinación.

3.2.1 DE DÓNDE PROVIENEN LAS CEPAS INDUSTRIALES⁽²⁾

La fuente de todas las cepas de microorganismos industriales es el ambiente natural. Pero a través de los años, a medida que los procesos industriales se

han ido perfeccionando, diversas cepas industriales se han ido depositando en colecciones de cultivos. Cuando se patenta un nuevo proceso industrial, al solicitante de la patente se le pide que deposite una cepa capaz de llevar a cabo ese proceso en una colección de cultivo reconocida. Hay varias colecciones de cultivos que sirven como almacén de cultivos microbianos (tabla N^o1) Aunque estas colecciones de cultivos pueden servir como fuentes accesibles de cultivos, se debe comprender que la mayor parte de las empresas industriales se rehúsan a depositar sus mejores cultivos en la colecciones de cultivos.

Cuadro N^o1: COLECCIONES DE CULTIVOS QUE SUMINISTRAN CULTIVOS DE MICROORGANISMOS INDUSTRIALES⁽²⁾

Abreviatura	Nombre	Localidad
ATCC	American Type Culture Collection	Rockville, MD, EUA
CBS	Centraalbureau voor Schimelcultur	Baarn, Holanda
CCM	Czechoslovak Department of Agriculture	J.E.Purkine, Brno, Checoslovaquia
CDDA	Canadian Department of Agriculture	Ottawa, Canada
CIP	Collection of the Institute Pasteur	Paris, Francia
CMI	Commonwealth Mycological Institute	Kew, Reino Unido
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen	Gottingen, Republica Federal de Alemania
NCTC	National Collection of Type Cultures	Londres, Reino Unido
Se han mencionado solo algunas de las colecciones generales de cultivos. Muchas Universidades e institutos de investigación conservan colecciones de grupos de microbios específicos.		

3.2.2 PROPIONIBACTERIUM₍₈₎

Bacterias del ácido propiónico (genero propionibacterium) fueron descubiertas como constituyentes del queso suizo (Emmentaler), donde su producción fermentativa de CO₂ origina los agujeros característicos; la presencia de ácido propiónico es en parte responsable del sabor especial del queso. Aunque éste ácido lo producen algunas otras bacterias, es una característica que distingue al género. Las bacterias en este grupo son Gram-positivas, pleomorfas, bacilos no esporulados, no móviles y anaeróbicos. Fermentan ácido láctico, carbohidratos y polihidroxi alcoholes produciendo ácido propiónico, ácido succínico, ácido acético y CO₂.

Sus requerimientos nutricionales son complejos y por lo general crecen con lentitud

La mayor parte de las bacterias del ácido propiónico también fermentan lactato con producción de propionato, acetato y CO₂. La fermentación anaeróbica del ácido láctico a propionato es interesante por que el ácido láctico mismo es un producto final de fermentación para muchas bacterias. Las bacterias de ácido propionico son así capaces de obtener energía anaerobicamente a partir de un sustrato que otras bacterias están produciendo llevando a cabo una fermentación secundaria

La fermentación inicial de lactosa a ácido láctico en la formación de requesón la realizan los organismos homofermentativos. Después de que se drena el

requesón (proteína y grasa), las bacterias ácido propiónicas se desarrollan con rapidez y generalmente alcanzan números de 10^8 por gramo.

3.2.3 REQUISITOS DE UN MICROORGANISMO INDUSTRIAL₍₂₎

- Debe producir la sustancia de interés, pero hay mucho más de fondo. El organismo se debe poder obtener en cultivo puro, ser estable genéticamente, y desarrollarse en cultivos a gran escala.
- El organismo industrial debe crecer rápidamente y fabricar el producto que se desea un periodo relativamente corto. El crecimiento rápido y la formación del producto corto plazo son deseables por diversas razones:1) un equipo de gran escala, costoso, no permanecerá mucho tiempo ocupado; el producto se forma rápidamente.2) Si el organismo crece con rapidez, hay menos probabilidad de que se presente una contaminación en el fermentado.3) Si el organismo crece con rapidez, será más fácil controlar los factores ambientales en el fermentador.
- Un requisito importante para un microorganismo industrial es que no debe ser peligroso para el ser humano o para animales y plantas de interés económico.
- Otro requisito importante para un microorganismo industrial es que se deben poder retirar las células microbianas del medio de cultivo con relativa facilidad.

- Finalmente, un microorganismo industrial debe ser susceptible de manipulación genética. En la biotecnología microbiana tradicional se han obtenido incrementos en el rendimiento mediante cambios genéticos, sobre todo por medio de mutación y selección.
- También se prefiere que un organismo industrial sea capaz de recombinación genética tanto por tratamiento sexual como por alguna clase de proceso parasexual. La recombinación genética permite la incorporación de un genoma único de rasgos genéticos de más de un organismo.

3.2.4 CLASES DE PRODUCTOS INDUSTRIALES₍₂₎

- Las células microbianas mismas pueden ser el producto deseado. Este es el caso de la levadura cultivada que puede servir como alimento y en panadería, y de los hongos comestibles cultivados.
- Enzimas producidas por microorganismos y que puede ser el producto que se desea. Varias enzimas importantes de uso comercial se producen en gran escala por procesos microbianos, incluyendo enzimas digestoras de almidón (amilasas), de proteínas (proteasas, renina) y de grasas (lipasas).
- Metabolitos microbianos. Constituyen algunos de los productos industriales de mayor importancia.

Estos metabolitos pueden ser productos de fermentación relativamente muy importantes, por ejemplo el alcohol, el ácido acético o el ácido láctico; factores de crecimiento claves como los aminoácidos, o las vitaminas; o agentes activos farmacológicamente como los antibióticos, esteroides o los alcaloides. Los agentes farmacológicamente activos están por lo general en la categoría de metabolitos secundarios. Los metabolitos secundarios son compuestos que no se producen durante la primera fase de crecimiento, sino cuando el cultivo entra en la fase estacionaria. Los metabolitos secundarios son algunos de los productos de mayor importancia y de interés industrial y es importante comprender su naturaleza para el desarrollo de nuevos procesos.

3.3 EL SUERO: DEFINICIÓN, COMPOSICIÓN Y CARACTERÍSTICAS ⁽¹³⁾

3.3.1 DEFINICION

.El suero es la parte líquida que queda después de separar la cuajada al elaborar el queso. También se puede definir como el líquido resultante de la coagulación de la leche en la fabricación del queso tras la separación de la mayor parte de la caseína y la grasa.

En la producción de mantequilla o de caseína a partir de leche desnatada también se obtiene un suero, por lo que una definición mas general del mismo seria el líquido formado por parte de los componentes de la leche (lactosa, sales minerales, vitaminas solubles, proteínas solubles y algo de grasa) que resulta de diversos procesos de elaboración de productos lácteos.

3.3.2 COMPOSICION

La composición del suero varia con la leche utilizada y con el tipo de queso a fabricar. Además, depende del sistema de coagulación:

Por coagulación al cuajo se obtiene un suero dulce, que apenas contiene calcio. Su pH es de 6,0 a 6,6.

Por acidificación se obtiene un suero ácido con un pH más bajo (4,3-4,7).

La tabla N^o 1 nos da la composición de ambos tipos de suero.

Tabla N^o1: COMPOSICIÓN DEL SUERO DULCE Y DEL SUERO ÁCIDO ⁽¹³⁾

Componentes	Suero dulce (%)	Suero ácido (%)
Humedad	93-94	94-95
Grasa	0,2-0,7	0,04
Proteínas	-0,8-1,0	0,8-1,0
Lactosa	4,5-5,0	4,5-5,0
Sales Minerales	0,05	0,4

3.3.3 CARACTERISTICAS GENERALES ⁽¹⁾

El suero es un producto derivado de las industrias lácteas, integrado por valiosos componentes, cuya obtención y oportuno aprovechamiento resultaría favorable para aquellas empresas que obtengan beneficios con la industrialización de esta materia prima, evitando de esta manera la pérdida de elementos constitutivos del suero, con alto valor nutritivo e industrial.

El suero constituye aproximadamente el 90% del volumen de la leche y contiene la mayor parte de los compuestos hidrosolubles de esta. El suero de leche, dependiendo del grado de acidez, se divide en tres tipos: suero dulce, pH. Mayor a 5.8; suero medio ácido con pH entre 5.8 y 5.0; y Suero ácido con pH menor a 5.0

La cantidad de suero lácteo disponible es muy considerable, ya que representa más del 80% de la leche utilizada en quesería. Cuanto más fresco sea el suero sometido a transformación industrial tanto mejor es el rendimiento y la calidad de los productos elaborados a partir del mismo.

El suero es un líquido que fermenta rápidamente pues el contenido acuoso es elevado: hay que prever su correspondiente tratamiento para poder conservarlo. La concentración al vacío y la deshidratación son métodos excelentes desde el punto de vista técnico, pero generalmente demasiado costosos para ser aplicados con fines industriales. Hay otro método que está siendo muy utilizado para la conservación del suero pues resulta más económico, y consiste en la fabricación de jarabe o almíbar de suero, que se obtiene reduciendo el suero a la séptima parte aproximadamente de su volumen inicial

El suero también es rico en vitaminas del complejo B y en vitamina C.

Las proteínas que quedan en el suero son la lactoalbúmina y la lactoglobulina.

3.3.4 APROVECHAMIENTO DEL SUERO ⁽¹³⁾

El suero es considerado, en general, como un subproducto molesto de difícil aprovechamiento. La fig. N^o 1 (ANEXO 11) nos presenta algunos de sus posibles aprovechamientos. En primer lugar, es práctica común separar la grasa y los finos de caseína que aún pueda contener.

De esta forma, se recuperan dos productos valiosos, y a la vez el suero queda en mejores condiciones para su posterior aprovechamiento.

Los productos que tradicionalmente se han obtenido a partir del suero han sido:

1. Suero en polvo, a base de concentrar los sólidos por evaporación y secado.
2. Suero en polvo desmineralizado, donde se eliminan previamente las sales minerales por intercambio iónico o por electrodiálisis.
3. Lactosa, obtenida por concentración, cristalización y separación.
4. Concentrados proteínicos, obtenidos por ultrafiltración del suero.

En la actualidad, se están haciendo otros aprovechamientos, tales como la producción de alcohol, Vitamina B₁₂ (el suero es muy rico en esta Vitamina), jarabes de glucosa y galactosa, lactosil, urea, amoniaco, lactatos, Ingrediente en la preparación de helados, Abono, Alimento para ganado, específicamente para ganado porcino, Como componente del medio de cultivo para la extracción de penicilina y otros antibióticos, Usado en la producción de enzimas microbianas y proteína unicelular, etc.

3.3.5 POR QUE SE DEBE APROVECHAR EL SUERO LACTEO ⁽⁹⁾

En general se puede decir que todos los productos y su productos lácteos poseen una elevada carga de contaminación, y para ver el grado de contaminación que genera no se toma en cuenta su composición química, si no que el verdadero valor significativo es la D.B.O., es decir, la " demanda biológica de oxígeno", que se expresa en miligramos de oxígeno exigidos para la destrucción, por oxidación microbiana, de las materias orgánicas contenidas en un litro de líquido. Es por ello que al aprovechar el suero lácteo industrialmente se evita la preocupación inherente a la evacuación de este de las fábricas, ya que pueden contaminar las aguas donde se vierte, por lo que generalmente está prohibido hacerlo, y, dada la masa de suero que se va reuniendo, puede llegar un momento en que sea más caro tratar de eliminarlo que operar su eficiente industrialización.

Tabla N^o 2: VALORES MEDIOS DE LA DEMANDA BIOLOGICA DE OXIGENO DE LA LECHE Y ALGUNOS SUBPRODUCTOS LACTEOS ⁽¹³⁾

LECHE COMPLETA	100,000 mg de oxígeno
LACTOSUERO	40,000 mg de oxígeno
AGUAS RESIDUALES	
Leche de consumo	1,000 mg de oxígeno
Mantequería	2,500 mg de oxígeno
Quesería	6,000 mg de oxígeno

Observando los valores de D.B.O. requeridos, se deduce fácilmente que el lactosuero es fundamentalmente el responsable del grado de polución de los efluentes lácteos.

3.4 AGUA DE COCIMIENTO DE MAÍZ

Es un residuo que deriva de la actividad normal del hombre en el proceso de nixtamalización del grano de maíz; el proceso consiste en mezclar una parte de maíz integral con dos partes de cal a aproximadamente al 1 por ciento. La mezcla se calienta a 80⁰C durante un lapso de 20 a 45 minutos 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 con agua. Este proceso se verifica sobre todo en zonas rurales.

La utilización de las aguas residuales derivadas del proceso de nixtamalización se basan en su contenido como lo es sobrantes propios del maíz, así como resto de cal; también se pueden aprovechar la cantidad de sustancias orgánicas incluyendo proteínas, carbohidratos y lípidos liberados del grano de maíz durante la cocción.

Para este estudio la utilización que se le da será como componente del medio de fermentación en función de proporcionar el nitrógeno necesario para que el microorganismo produzca la vitamina B₁₂.

3.5 VITAMINAS ⁽²⁾

Las vitaminas se usan como complementos de la alimentación humana y de los animales las vitaminas son compuestos que son eficaces en pequeña cantidad, no suministran energía y no se utilizan como elementos estructurales del organismo, pero que son esenciales para la transformación de energía y para la regulación del metabolismo de las unidades estructurales.⁽⁵⁾

La producción de vitaminas ocupa el segundo lugar, solamente después de los antibióticos, en términos de ventas totales en productos farmacéuticos; representan más de 700 millones de dólares por año. La mayor parte de las vitaminas se fabrican comercialmente por síntesis química. No obstante para algunas de ellas la síntesis resulta demasiado complicada, afortunadamente se pueden fabricar por fermentación microbiana. La vitamina B₁₂ y la riboflavina son las más importantes en esta clase de vitaminas.

La vitamina B₁₂ solo se sintetiza en la naturaleza por microorganismos. Los animales satisfacen sus requerimientos de esta vitamina por la ingestión de alimentos o por la absorción de la vitamina producida en el intestino del animal por microorganismos intestinales. Los humanos, sin embargo, deben obtener la vitamina B₁₂ de los alimentos o como complemento vitamínico, ya que aun cuando lo sintetizan los microorganismos del intestino grueso, no pasa de ahí al torrente sanguíneo. Las cepas microbianas utilizadas se han seleccionado específicamente por su alto rendimiento de esta vitamina. Miembros del género

propionibacterium dan rendimientos de esta vitamina de 19 a 23 mg/litro en un proceso en dos etapas, en tanto que otra bacteria,

Pseudomona denitrificans, produce 60 mg/Litro en un proceso de una sola etapa en el que se utiliza melaza de azúcar de remolacha como fuente de carbono. La vitamina B₁₂ contiene cobalto como parte indispensable de su estructura y los rendimientos de la vitamina aumentan considerablemente al adicionar cobalto al medio de cultivo.

3.5.1 VITAMINA B₁₂ ⁽⁶⁾

La vitamina B₁₂ es un complejo de cobalto cristalino de color rojo sintetizado por microorganismos. Pertenece a un grupo de compuestos denominados corrinoïdes. Todos los corrinoïdes contienen cuatro anillos reducidos de pirrol unidos en un anillo macrocíclico por enlaces entre las posiciones α ; tres de estos enlaces están formados por grupos metilideno =C– y el cuarto por una unión C-C. Los corrinoïdes actúan como catalizadores en ciertos reordenamientos de cadenas de carbonos. La vitamina B₁₂ es esencial para la formación normal de la sangre, ciertos procesos metabólicos fundamentales, funciones neurales y para el crecimiento y mantenimiento humano, animal y microbiano. Los requerimientos humanos son muy pequeño, casi 1 μ g por día.

La vitamina B₁₂, al igual que otras vitaminas, no se encuentra sola sino como una familia de compuestos estrechamente relacionados, la mayoría de los cuales carecen de actividad biológica en los animales.

La vitamina B₁₂ está presente en los alimentos en cantidades muy pequeñas. La fuente dietéticas principales son de origen animal. Se encuentran en grandes cantidades en los productos lácteos y en hígado, riñones y cerebro, y además en el intestino y en las heces porque es sintetizada por las bacterias intestinales. El material vegetal, en general, contiene poca vitamina B₁₂ o nada.

La vitamina B₁₂ se vende con los siguientes nombres comerciales

Bevantine-12, Berubigen, Betalin-12cristalina, beta-Twelve-ora, Depinar, Dodecavite, Dedex, Endoglobin, Hepcovite, Normocytin, poyamin, RubraminPC, Sytobex, Vibalt, vitron-c-plus, vi-Twel y Tulag.

3.5.2 EXISTENCIA Y SIGNIFICADO ECONÓMICO ⁽¹⁴⁾

En 1926, G.R.Minot y W.B.Murphy determinaron que la anemia perniciosa humana se curaba con extractos de hígado, un descubrimiento por el que recibieron el Premio Nobel de medicina en 1934. Independientemente, E.L.Ricke y L.Smith aislaron la vitamina B₁₂ (cianocobalamina) es una vitamina que es sintetizada en la naturaleza exclusivamente por los microorganismos; es necesaria para los animales y está presente en cada tejido animal a concentraciones muy bajas(por eje.,1ppm en el hígado). Aunque la sustancia aislada de los tejidos es cianocobalamina, en las células solamente está presente en forma de coenzima (adenosil o metilcobalamina), no apareciendo la cianocobalamina hasta la etapa de recuperación del producto. Las necesidades

en vitamina B₁₂ de los animales quedan cubiertas por los alimentos que toman o por absorción de vitamina B₁₂ producido por los microorganismos del intestino. Sin embargo, el hombre obtiene la vitamina B₁₂ solamente de los alimentos, ya que la B₁₂ sintetizada por los microorganismos en el intestino grueso no puede ser asimilada.

Las concentraciones de vitamina B₁₂ que están presentes en los tejidos animales son demasiado bajas para su uso en la producción comercial. Los fangos activos del tratamiento de las aguas residuales contienen 4-10mg B₁₂/Kg., pero su aislamiento a partir de estas fuentes es caro, debido a los problemas de separarla de varios análogos de la vitamina B₁₂. La síntesis química tampoco es práctica ya que requiere 70 etapas de reacción. La vitamina B₁₂ fue obtenida primero comercialmente como un subproducto de la fermentación de estreptomicetos para la producción de los antibióticos estreptomicina, cloranfenicol o neomicina, con un rendimiento de aproximadamente 1mg/L.

A medida que la demanda de vitamina B₁₂ aumentó, se han desarrollado procesos de fermentación con cepas de mayor rendimiento.

La producción comercial se lleva a cabo en la actualidad enteramente por fermentación. El Salvador actualmente importa el cien por ciento de Vitamina B₁₂ y sus derivados de países como México, Estados Unidos y Canadá alcanzando valores anuales hasta de \$400,000 (ANEXO 1)

Las compañías productoras de vitamina B₁₂ más importantes son:

Farmitalia S.p.A. (Italia); Glaxo Lab, Ltd (Inglaterra); Rhone-Poulenc,

S.A (Francia); Roussel UCLAF (Francia); Merck&Co., Inc.(Estados Unidos); G.Richter Pharmaceutical Co y Chinoin (ambas húngaras).

La producción mundial anual de vitamina B₁₂ se estima que es de 12,000Kg. Aproximadamente 3,500Kg de cianocobalamina, 2,000kg de hidroxicobalamina, 1,000Kg de coenzima B₁₂ y una pequeña cantidad de metilcobalamina son producidas para la industria farmacéutica; el resto va a la industria de alimentación animal. Para piensos de cerdos y pollos, se añaden 10-15mg de vitamina B₁₂ por tonelada de pienso, ya que la proteína animal puede ser reemplazada con proteína vegetal menos cara si la proteína vegetal se fortifica con vitamina B₁₂

3.5.3 ESTRUCTURA Y FUNCION ⁽⁵⁾

Hasta 1957 no se dilucidó totalmente la compleja estructura de la cobalamina. Su núcleo central consta de cuatro anillos y pirrólicos sustituidos, que conducen, del mismo modo que en la porfirina de la hemoglobina o de la clorofila, a la formación de un sistema de cuatro anillos de orden superior gracias a puentes de carbono y a un átomo central de cobalto unido al átomo de nitrógeno del anillo de piridina. Mientras que tanto la porfirina como la clorofila tienen entre todos los anillos un átomo de C "metínico" como ligando con un doble enlace y por lo tanto un sistema de dobles enlaces conjugados, este no existe entre los anillos I y IV de la cobalamina, que se unen directamente y cuyos dobles enlaces ya no conducen por tanto en el anillo de corrina a la

formación de un sistema cerrado. Este anillo de corrina sustituido en la parte exterior con los grupos acetamida y propionilamida constituye la "cobinamida", que en la cobalamina se une a su vez a la 3- fósforribosa por una cadena lateral prolongada. El C- terminal de esta ribosa está unido a un átomo de nitrógeno de la base 5,6-dimetil-benzimidazol, mientras el otro átomo de nitrógeno del anillo de imidazol se une por enlace coordinado al átomo central de cobalto del anillo de corrina (perpendicularmente a su superficie). Se forma así una estructura molecular espacial. Por el otro extremo de este eje vertical, el cobalto se une a un grupo ciano; la vitamina B₁₂ es por lo tanto una ciano-cobalamina. A partir de ellas se forma la vitamina B₁₂-coenzima ya que el cobalto se une por la desoxirribosa a la adenina (3-"desoxiadenosina"). (Figura. N^o2). Como grupo activo, la vitamina B₁₂, coenzima puede catalizar reacciones diversas de distintas enzimas que tengan en común el cambio de posición

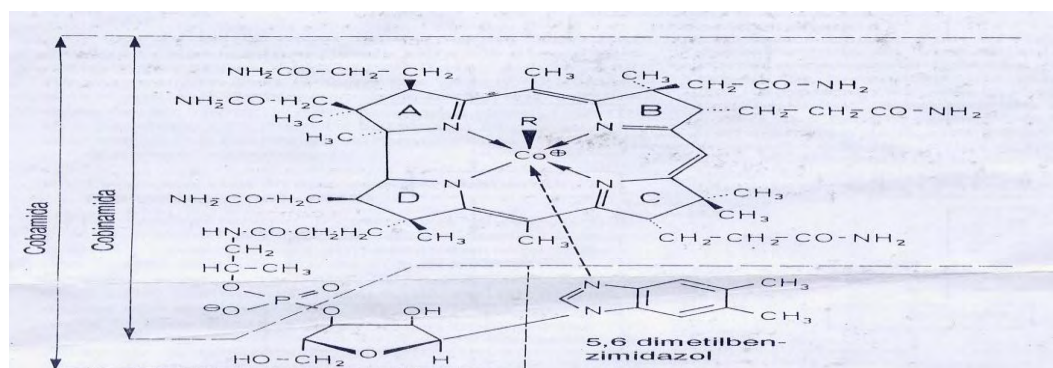


Figura N^o 2: Estructura de la vitamina B₁₂

O el transporte de fragmentos C1 en forma de grupos CH₃. Un ejemplo importante es la transformación del metilmanoli-CoA de la descarboxilación del

propionil-CoA en ácido succínico gracias a la metilmalonil-CoA-mutasa, que transfiere el grupo CO-SCoA al grupo metilo del metilmalonil-CoA. Así se posibilita la degradación total de cadenas impares de ácidos grasos o de hidrocarburos. Además la B12-coenzima participa en la síntesis de metionina a partir de la homocisteína transportando junto con el ácido tetrahidrofólico un grupo metilo al grupo -SH de la homocisteína (Fig N^o2.1)

En la síntesis de metano por las bacterias del metano, el grupo -CH₃ unido al ácido tetrahidrofólico es captado de sustratos por la vitamina B12-coenzima y liberado como metano tras su reducción con hidrogeno

Por ello la cianocobalamina se encuentra enriqueciendo el fango en descomposición en el que se forma el metano y puede ser aislada a partir de él. Finalmente, la vitamina B12 constituye también el coenzima de la ribonucleótido-reductasa, que transforma las unidades que componen el ácido ribonucleico (RNA) en las del ácido desoxirribonucleico (DNA).

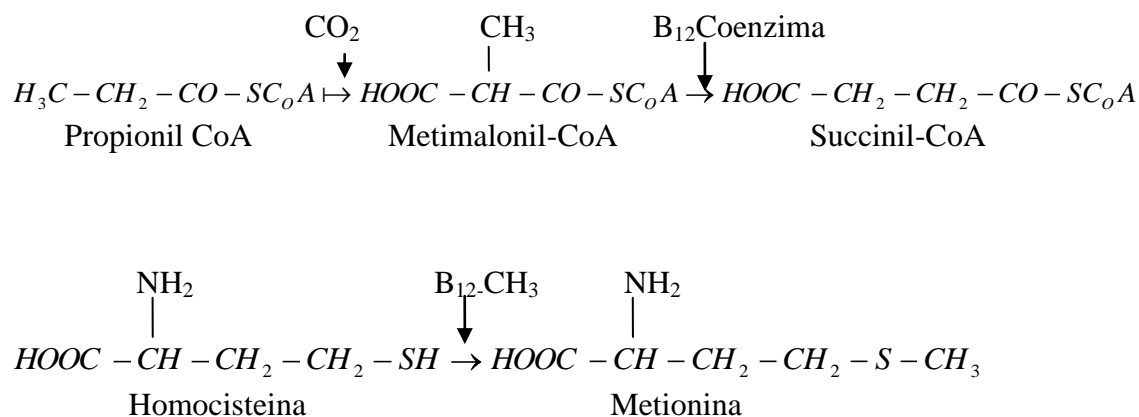


Figura N^o 2.1: Participación de la B₁₂ – coenzima en la síntesis de metionina

3.5.4 PROPIEDADES ⁽⁶⁾

La vitamina B₁₂ cristaliza a partir de agua o de agua-acetona en forma de prismas rojos. Se oscurece entre 210 y 220°C, pero no funde abajo de 300°C. Los cristales secados al aire contienen entre 10 y 12% de agua de cristalización. La vitamina B₁₂ se disuelve sólo en disolventes altamente polares como el agua (solubilidad de casi 1.2%), el metanol, los ácidos alifáticos inferiores, los fenoles, la dimetilformamida, el sulfoxido de dimetilo y el amoniaco líquido. No es soluble en acetona, éter ni benceno. Las otras cobalaminas cristalizan en forma semejante y tienen estabilidad térmica similar.

3.5.5 OBTENCIÓN BIOTECNOLÓGICA ⁽⁵⁾

Aunque al principio se emplearon otros microorganismos y procesos fermentativos en la obtención de cobalamina, actualmente se consiguen preparados puros de esta importante vitamina mediante principios fermentativos desarrollados especialmente para ello con cepas microbianas seleccionadas con las que se obtienen rendimientos máximos. También está mucho más al alcance de la mano evitar la presencia de sustancias secundarias que pudieran dificultar su elaboración. Los preparados brutos enriquecidos con vitamina B₁₂ se obtienen también ahora como valiosos suplementos para piensos a partir de las células de otras fermentaciones. Se trata sobre todo de los restos de micelio de cepas de *Streptomyces* que se han empleado previamente en la obtención de antibióticos (estreptomina, tetraciclina y otros) y residuos de la

fermentación del butano y de la acetona, ya que las células de *Clostridium* presentan un contenido de cobalamina relativamente grande.

En las fermentaciones de cobalamina se emplearon hoy en día sobre todo la bacteria de ácido propiónico ***Propionibacterium shermanii*** y ***Propionibacterium freudenreichii***, que fermentan azúcar a ácido propiónico en anaerobiosis o en presencia de pequeñas cantidades de oxígeno. Como la síntesis del ácido propiónico también transcurre con la participación de la enzima metilmalonil-CoA-transferasa que contiene, cobalamina, pero en sentido contrario según se deduce del esquema de la figura 4. 14, la bacteria del ácido propiónico tienen un contenido de cobalamina especialmente elevado. Pero para obtener cobalamina también se cultivan ***Streptomyces olivaceus***, ***Bacillus megaterium*** y ***Pseudomonas denitrificans*** en medio de cultivo intensamente aireados. La vitamina B₁₂ coenzima es un ejemplo típico de molécula de estructura compleja, cuya obtención sólo es posible por métodos biotecnológicos. Su biosíntesis tiene lugar en tres etapas principales:

1. Síntesis del anillo de corrina
2. Introducción del cobalto
3. Adición de la fosforribosa, del benzimidazol y de la desoxiadenosina.

Hay que añadir nitrato de cobalto al caldo de cultivo hasta alcanzar la concentración óptima para la síntesis de cobalamina que es de 5mcg por ml. El sustrato principal es la glucosa, aún que se añaden suplementos a base de extractos de malta, aceite de soja o bagazos de la destilación alcohólica. Como

fuente de nitrógeno se emplean harina de soja, pectona, hidrolizado de caseína o extractos de levadura además de sales de NH_4 . Se añaden sales inorgánicas según las necesidades. Durante la esterilización no se pueden calentar los sustratos demasiado tiempo o a una temperatura excesiva, porque se inactivarían las sustancias necesarias en la síntesis de la cobalamina. Los suplementos de 5, 6-dimetilbenzimidazol, porfobilinogeno, (un precursor del anillo corrin), L-treonina y L-metionina aumentan los rendimientos. La adición de harina calcárea actúa en la neutralización de los ácidos orgánicos formados.

en el tanque de mezcla los componentes del sustrato se mezclan con agua, esterilizan y enfrían y se llenan con ellos los tanque de fermentación que estarán aireados y esterilizados en mayor o menor grado dependiendo de la especie bacteriana empleada, se inoculan y se incuban a $18-21\text{ }^\circ\text{C}$. La

duración del cultivo y el rendimiento depende del microorganismo. Las bacterias del ácido propiónico fermentan primero 3 días anaerobiamente, después 3-4 días aeróbicamente y alcanza unos rendimientos de $19-23\text{mg. l}^{-1}$

Las fermentaciones con ***Basillus megaterium***, ***Pseudomonas denitrificans*** y ***Streptomyces olivaceus*** duran seis horas, 2 y 3-4 días respectivamente con una producción de 15mg. l^{-1} ∅ Tras el fin de la fermentación el caldo de cultivo puede emplearse para la elaboración bien de concentrados, bien de cristales de vitamina B_{12} . Los concentrados se obtienen por evaporación y secado. Para la elaboración de preparados puros se acidifica la suspensión de bacterias con H_2SO_4 y Na_2SO_3 aún de pH de 5,0 para estabilizar la cobalamina y extraerla de

las células. Después se filtran las células y se purifica la solución con carbón activo. Después de concentrarlo por evaporación, el coenzima se transforma en cianocobalamina añadiendo disolventes orgánicos y se cristaliza tras ser purificado por cromatografía en columna

3.6 QUE ES EL CRECIMIENTO MICROBIANO ⁽¹¹⁾

La microbiología comprende el estudio de una amplia variedad de sistemas vivientes “inferiores” que incluyen virus, bacterias, algas, hongos simples como las levaduras y los mohos así como los hongos superiores altamente diferenciados más grandes como las “setas”.

En un medio de apoyo para el crecimiento adecuado, los microorganismos unicelulares aumentan de tamaño y, por último se dividen en dos por un proceso de fisión binaria o gemación. De hecho, una célula microbiana no viable se define como aquella que, incubada en medio de apoyo para el crecimiento por un periodo suficientemente largo, es incapaz de aumentar su tamaño o de multiplicarse. Es importante entender que una célula que aparentemente no crece, aun puede ser viable, pero el medio es incapaz de apoyar el crecimiento debido a la disminución de un nutriente esencial, la presencia o producción de materiales tóxicos o un cambio en el medio físico, como la disminución de oxígeno, pH o temperatura. A menudo, las células pueden vivir en este estado sin crecimiento particularmente como esporas o quistes, por periodos largos.

3.6.1 MEDICION DEL CRECIMIENTO MICROBIANO ⁽¹¹⁾

Existen muchos métodos para la determinación del crecimiento de células microbianas entre los cuales podemos mencionar: peso seco, absorción, peso húmedo, volumen de células empacadas, número de células, masa de componente celular, mediciones físicas

Cuadro N^o2: MÉTODOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL CRECIMIENTO DE POBLACIONES MICROBIANAS⁽¹¹⁾

METODOS	FUNDAMENTO	OBSERVACIONES
Recuento en celda	Conteo directo del número de células	Requiere células individuales y medio limpio
Recuento en placa	Conteo del número de colonias	Requiere células individuales influencia de las condiciones de incubación
N.M.P	Estadístico	Requiere células individuales y medio limpio
Peso seco	Medición directa	No admite sólidos en el medio
Turbidimetría	Transmisión de la luz	Requiere células individuales y medio limpio
Volumen empacado	Centrifugación	Poco preciso

3.6.2 PESO SECO CELULAR ⁽¹¹⁾

El método más usado para medir el crecimiento microbiano es secar volúmenes conocidos de cultivo celular lentamente hasta obtener un peso constante.

Cuando se tratan de células que sedimentan rápidamente como levaduras, esto usualmente implica centrifugación ($4-6 \times 10^3$ rpm). Luego, las células concentradas se colocan en un horno a 90°C durante unas 20 horas o a 105°C durante 6 a 10 horas, hasta que hayan alcanzado un peso constante.

Para células bacterianas difíciles de concentrar por centrifugación, la muestra de cultivo se filtra a través de membranas hidrofílicas con un tamaño de poro de $0.2\mu\text{m}$.

Las células, retenidas en el filtro, se lavan con solución salina isotónica y los filtros se colocan en un horno a 90°C o a 150°C hasta obtener un peso constante. El peso de las células secas usualmente se expresa en términos de $\text{g} \times 1^{-1}$.

En determinaciones de peso seco celular existen fuentes de errores importantes debido a la absorción de humedad atmosférica por las células secas y los tubos de centrífuga o las membranas durante el enfriamiento. Esto se puede evitar al enfriar en un desecador o mediante la determinación de la cantidad de agua absorbida por las membranas o tubos y con la corrección adecuada del peso seco medido. La presencia de sólidos en el medio, los cuales se encuentran frecuentemente en muchos medios industriales importantes, requiere que el peso seco medido sea corregido con respecto al peso de los sólidos.

La desventaja principal de estos métodos es que son lentos y requieren de muestras relativamente grandes del cultivo.

3.6.3 ABSORCION ⁽¹¹⁾

A menudo se saca ventaja del hecho de que en una celda espectrofotométrica, las células microbianas desvían la luz de modo que la cantidad de ésta que llega al detector del espectrofotómetro, está relacionada directamente con el número de células presentes en la muestra del cultivo de acuerdo con la ley de Beer. Por lo general se emplean longitudes de onda alrededor de 600nm. Es importante entender que como la absorbancia es afectada por el tamaño y la forma de las células, la relación entre la absorbancia y el número de células cambia si el tamaño y la forma de estas cambian durante el crecimiento del cultivo.

Es común que la absorción de la luz por una suspensión de células se relacione con el peso seco celular. Esto se lleva a cabo al medir tanto la absorbancia como el peso seco de muestras de cultivo y graficar uno contra el otro. La pendiente de esta grafica producirá un coeficiente que relacione la absorbancia con el peso seco celular que puede usarse para experimentos posteriores con el mismo organismo criado en condiciones similares.

3.6.4 PESO HUMEDO ⁽¹¹⁾

Este quiere decir simplemente la centrifugación o filtración de muestras del cultivo seguida por el pesado directo. Aunque es un método extremadamente rápido, es importante estandarizar correctamente el procedimiento ya que se

mide el agua tanto intracelular como extracelular, lo cual puede ocasionar errores considerables.

3.6.5 VOLUMEN DE CÉLULAS EMPACADAS ⁽¹¹⁾

Mediante la centrifugación de muestras del cultivo en tubos de centrífuga graduados se puede determinar rápidamente el volumen de células empacadas (VCE). Este método es muy inexacto, especialmente cuando se miden pequeños cambios en la población celular.

3.6.6 NUMERO DE CÉLULAS ⁽¹¹⁾

El crecimiento se puede determinar también en términos del número de células por litro. El número total de células se puede medir colocando muestras de cultivo adecuadamente diluidas sobre porta objetos de microscopios graduados como los de Helber o los hematocitómetros y contando el número de células con la ayuda de un microscopio.

Aunque este método es relativamente rápido y exacto no distingue entre células viables y no viables, también muy agotador, sin embargo se cuenta con contadores de células automáticos.

3.6.7 MASA DE UN COMPONENTE CELULAR ⁽¹¹⁾

En el caso donde se dificulte el uso de otros métodos, la cantidad de un componente celular, la cual es una cantidad constante del peso seco total, se puede usar para estimar la concentración de células o de biomasa. Se han usado

componentes como el nitrógeno, proteína, RNA, DNA y TPA celulares. Pueden surgir dificultades ya que varía la cantidad de estos componentes en la célula, a menudo considerablemente, durante el crecimiento de las células, especialmente cuando las condiciones de éste son diferentes.

3.6.8 MEDICIONES FISICAS ⁽¹¹⁾

El crecimiento de las células microbianas va acompañado siempre de generación de calor. Recientemente se demostró que hay una relación directa entre la cantidad de calor producido y la cantidad de biomasa. Este método es directo, no requiere de muestreo y es instantáneo pero es mas adecuado para biorreactores a gran escala puesto que la cantidad de calor generado en escala pequeña puede ser demasiado pequeña para ser medida adecuadamente.

Para cultivos aerobios es posible medir la rapidez de captación de oxígeno, ya que se ha demostrado esta directamente relacionada con la concentración de biomasa. Es obvio que este método no es adecuado para cultivos anaerobios

3.7 CRECIMIENTO EN CULTIVO INTERMITENTE ⁽¹¹⁾

El cultivo por lotes o intermitente representa el crecimiento en un sistema cerrado puesto que no se añade medio nuevo al cultivo.

Cuando un medio de crecimiento adecuado se inocula con células, tiene lugar una secuencia de eventos característicos llamados ciclo de crecimiento el cual

se puede describir por medio de una grafica del peso seco celular (x) ($g\ 1^{-1}$) contra el periodo de incubación en horas (h).

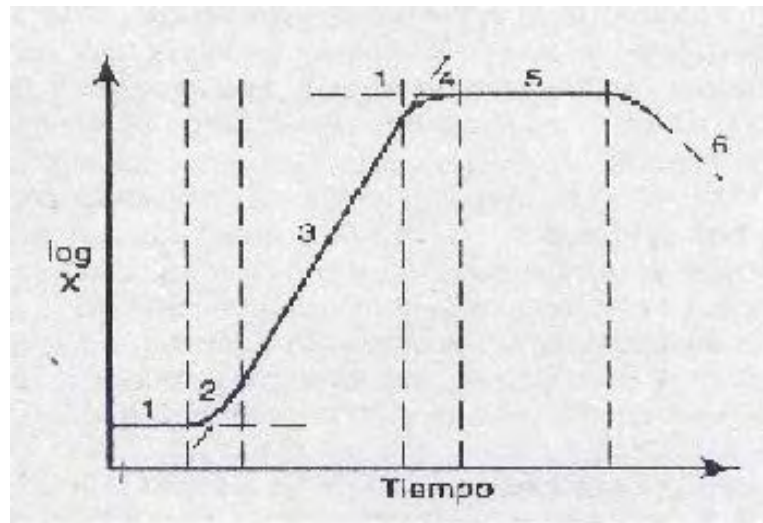


Fig. 2.2: Ciclo de crecimiento intermitente. Fases de crecimiento 1 latencia ; 2 aceleracion; 3 exponencial; 4 desaceleración; 5 estacionaria; 6 declinacion.

El ciclo de crecimiento se puede dividir en varias fases distintas

1. Fase latencia. Inmediatamente despues de la inoculación no es posible que exista crecimiento aparente duarante algun tiempo. La longitud de la fase lag es variable y depende de los antecedentes previos de crecimiento de las células. Representa un periodo de adaptacion para el crecimiento en un medio nuevo y significa la sintesis de las enzimas requeridas para la evolucion en este medio.

2. Fase exponencial o fase log. Frecuentemente se habla de esta como la fase de “crecimiento equilibrado”, donde la síntesis de todos los constituyentes celulares aumentan a una rapidez constante, de modo que la población de células, se duplica y continúa duplicándose a intervalos regulares. Esta no es una verdadera fase de crecimiento equilibrado o estado estacionario, ya que los nutrientes son consumidos constantemente (la concentración del sustrato varía con el tiempo) y los productos finales del metabolismo se acumulan. En consecuencia, el medio cambia continuamente
3. Fase estacionaria. Esta se caracteriza por ningún crecimiento neto. De hecho, el crecimiento puede estar ocurriendo, pero está equilibrado por la rapidez de muerte o lisis celular. Las células pueden permanecer viables por periodos largos en esta fase con existencia de metabolitos endógenos, oxidación y almacenamiento de polímeros, proteínas, etc. Es común que la población entre a la fase estacionaria como resultado de la disminución de algún nutriente esencial, formación de productos tóxicos o de un cambio en medio físico.
4. Fase de declinación. Durante la fase estacionaria la rapidez de desaparición (muerte) puede volverse más alta que la rapidez de crecimiento, en cuyo caso disminuye la densidad de células

5. Fases de aceleración y desaceleración. Estas se mencionan ocasionalmente en las publicaciones. La fase de desaceleración es importante porque el crecimiento está “equilibrado” y la rapidez de crecimiento varía en función de la concentración de sustrato residual en cultivos limitados por el sustrato.

3.8 FACTORES QUE AFECTAN LA RAPIDEZ DE CRECIMIENTO ⁽¹¹⁾

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

3.9 EVALUACION DE LA CINETICA DE CRECIMIENTO MICROBIANO ⁽¹¹⁾

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.

3.9.1 CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS ⁽¹¹⁾

3.9.1.1 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 volumetrica (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

3.9.1.2 VELOCIDAD ESPECIFICA DE GENERACION DE CÉLULAS MICROBIANAS POR PESO SECO

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

donde:

μ' : velocidad especifica

x : gramos de biomasa / litros de muestra analizada

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

3.9.2 CONSUMO DE NUTRIENTES

3.9.2.1 VELOCIDAD VOLUMETRICA DE CONSUMO DE SUSTRATO

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

donde:

Q_s : velocidad volumetrica de consumo de sustrato (g / L.h)

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

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

t_2 : tiempo final

t_1 : tiempo inicial

Las unidades son : gramos de sustrato consumido
Litroxhora

3.9.2.2 VELOCIDAD ESPECIFICA 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/L.h)

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

x : gramos de biomasa / litros de muestra analizada

Las unidades son : gramos de sustrato consumido
gramos de biomasa xhora

3.9.3 FORMACION DE PRODUCTO

3.9.3.1 VELOCIDAD VOLUMETRICA DE FORMACION DE PRODUCTOS

$$Q_p = \frac{P_2 - P_1}{t_2 - t_1} = \frac{dp}{dt}$$

donde:

Q_p : velocidad volumetrica de produccion de vitamina B₁₂ (g / L.h)

P_2 : Concentracion (g/L) de vitamina B₁₂

P_1 : Concentracion (g/L) de vitamina B₁₂

t_2 : tiempo final

t_1 : tiempo inicial

Las unidades son : $\frac{\text{gramos de producto formado}}{\text{Litro x hora}}$

3.9.3.2 VELOCIDAD ESPECIFICA DE FORMACION DE PRODUCTOS

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

donde:

dp : velocidad especifica de produccion de vitamina B₁₂

x : gramos de biomasa / litros de muestra analizada

dp/dt : velocidad volumetrica de produccion de vitamina B₁₂

Las unidades son : $\frac{\text{gramos de producto formado}}{\text{gramos de biomasa x hora}}$

3.9.4 RENDIMIENTO EN EL CULTIVO

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

donde

$Y_{P/S}$: gramos de vitamina B₁₂ / gramos de sustrato consumido

dp : gramos de vitamina B₁₂

-ds : gramos de sustrato consumido

Las unidades son : $\frac{\text{gramos de producto}}{\text{gramos de sustrato consumido}}$

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 TIPO DE ESTUDIO

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

Retrospectivo porque toma en cuenta investigaciones ya antes realizados;

Prospectivo porque es una base para futuras investigaciones acerca del tema.

Fue analítico-experimental ya que se obtuvieron datos experimentales que posteriormente fueron analizados.

La investigación se llevo acabo en tres etapas: Investigación bibliografica, investigación de campo y parte experimental

4.2 INVESTIGACION BIBLIOGRAFICA

- Biblioteca de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador (UES)
- Biblioteca de las Ingenierías de la Universidad de El Salvador (UES)
- Biblioteca de la Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer (USAM)
- Biblioteca de la Universidad Nueva San Salvador (UNSSA)

4.3 INVESTIGACION DE CAMPO

La cepa a utilizar en la investigación cinética de producción de vitamina B₁₂ pertenece al género propionibacterium ***Propionibacterium freudenreichii*** ATCC 9617 la cual fue importada desde México. (ANEXO 6)

El sustrato a utilizar en la investigación es el suero de leche proveniente de Sensuntepeque en el departamento de Cabañas el cual proviene de leche tratada por métodos artesanales para la obtención de queso y es transportado a bajas temperaturas hasta el lugar de trabajo

En cuanto al medio de crecimiento de la cepa y medio de fermentación algunos componentes de estos tuvieron que ser importados desde México en cantidad suficiente para realizar el ensayo como es el caso del extracto de levadura y el cloruro de cobalto.

4.4 PARTE EXPERIMENTAL

El microorganismo que se usará para el estudio cinético de producción de vitamina B₁₂ será la cepa del *Propionibacterium freudenreichii* ATCC9617 proporcionada por ATCC™ (The Global Bioresource Center)

La cual fue importada desde México y es una bacteria Gram-positiva, bacilo no esporulado, no móviles, anaeróbico y temperatura de crecimiento de 30 °C

4.4.1 MEDIO DE CRECIMIENTO. ATCC: 33 AGAR JUGO DE TOMATE

1-Tryptona (BD211705)	10.0g
2- Extracto de levadura	10.0g
3- Jugo de tomate filtrado (pH.7.0)	0.2L
4- Agar	11.0g
5- Agua destilada hasta	1.0L

Ajustar pH hasta 7.2 autoclavar a 121°C por 15 minutos .Condiciones de crecimiento: anaerobiosis, temperatura 30 °C e incubar por 48 horas.

Procedimiento de preparación del medio ATCC: 33 agar jugo de tomate

(Ver anexo 2)

Medio de conservación de la cepa (ver anexo 3)

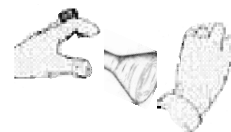
4.4.2 COMPOSICION DEL MEDIO DE FERMENTACIÓN

MEDIO BASAL

1. Extracto de levadura	15.0g/L
2. Sólidos macerados de maíz	3.15g/L
3. CoCl ₂ (s)	0.01g/L
4. Inoculo de <i>Propionibacterium freuderenchi</i>	0.10L
5. Suero de leche c.s.p	1.0L

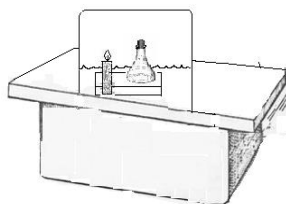
Ajustar pH a 7.2 y autoclavar 121°C x15minutos x15 libras de presión cantidad de inoculo por litro de sustrato es de 100mL. Condiciones de fermentación 84 horas en anaerobiosis y 84 horas en aerobiosis todo el proceso de fermentación el biorreactor deberá permanecer protegido de la luz cubierto con papel carbón.

4.4.3 PREPARACIÓN DEL BIORREACTOR



1. Se usaran como biorreactor 18 erlenmeyers de 250mL con tapón de hule higiénicamente lavados con abundante agua y jabón y luego desinfectados con alcohol isopropílico

2. A cada Biorreactor se le adicionara la cantidad de 112.5mL de medio de fermentación será tapado con torunda de algodón y luego esterilizado en autoclave a 121°C por 15 minutos ya estéril cada Biorreactor será inculado asépticamente



3. Posteriormente se le crearán condiciones de anaerobiosis para cada erlenmeyer Ver ANEXO (11)

4. Luego se colocara los erlenmeyers sellados en el agitador o shaker eléctrico por el tiempo asignado a cada uno

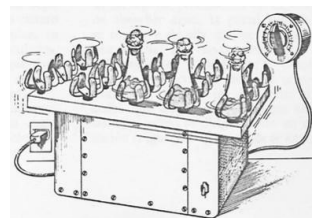
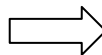


Fig. N° 3: Proceso de preparación del Biorreactor (18)

4.4.4 OBTENCIÓN DEL SUSTRATO

El sustrato que se va utilizar procede de la leche de vaca (suero de leche), la cual posterior ordeño del animal sano ha sido sometida a la acción de la caseína (cuajo), para la obtención del queso y luego tratado para obtener la crema todo ello por métodos artesanales caseros el suero será proporcionado por quesería artesanal del municipio de Sensuntepeque en el departamento de Cabañas.

El suero previamente pasteurizado a 62⁰C durante 30 minutos será transportado en recipientes apropiados y a bajas temperaturas hasta el Laboratorio de Microbiología de La Universidad de El Salvador, Facultad de Química y Farmacia

4.4.5 PROCESO DE FERMENTACIÓN

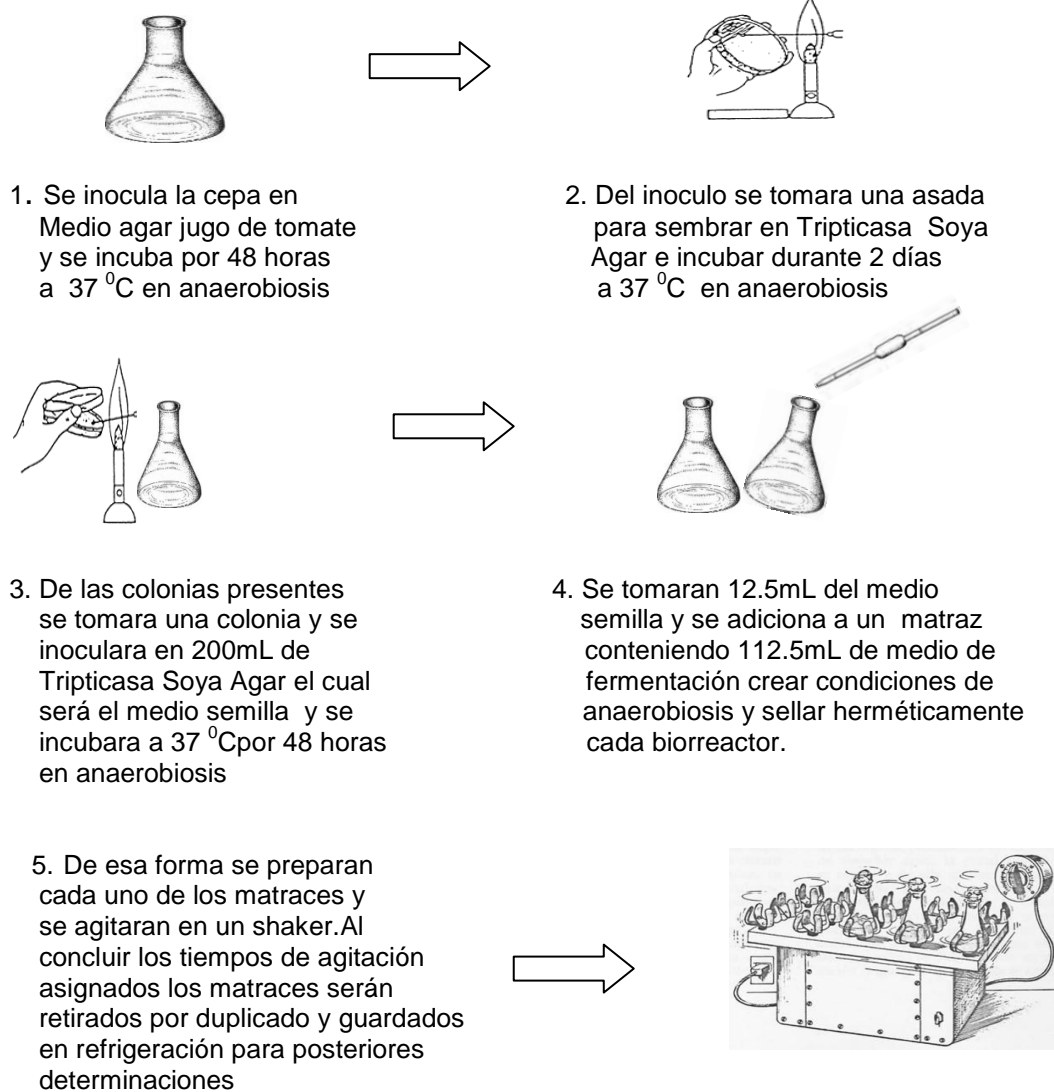
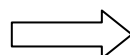
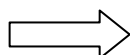


Fig. N° 4: Proceso de Fermentación de vitamina B₁₂ (18)

4.4.6 DETERMINACIONES ANALITICAS ⁽³⁾

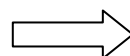
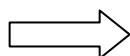
4.4.6.1 DETERMINACIÓN DE BIOMASA POR EL MÉTODO DE PESO SECO



1. Secar el papel filtro a 75 °C por 2 horas y enfriar por 30 min en un desecador

2. Pesar el papel previamente secado en balanza analítica

3. Filtrar 50 mL de medio de fermentación recibir el filtrado en erlenmeyer de 125 mL y guardar en refrigeración para posteriores determinaciones



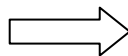
4. Lavar el papel filtro Conteniendo la biomasa Con 3 porciones de 5mL de agua esteril

5. Colocar el papel filtro sobre una placa de petri

6. Secar el papel filtro a 75 °C por 2 horas y enfriar por 30min en un desecador



7. Pesar el papel filtro Conteniendo la Biomasa en balanza analítica y por diferencia de peso determinar biomasa



Proceder de igual manera para las muestras recolectadas a las 0, 24,48 y 72 horas hasta completar las 168 horas que dura el proceso de fermentación

Fig. N° 5: Determinación de Biomasa por el método de peso seco ⁽³⁾

4.4.6.2 DETERMINACION DE pH ⁽⁴⁾

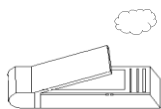
Medir una alícuota de 20mL del filtrado obtenido en el proceso de determinación de crecimiento celular y transferirlo a un beaker de 30mL

Llevar a una temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ la alícuota con ayuda de un baño de hielo. Ajustar el aparato de acuerdo a (Anexo 4), a continuación lavar los electrodos y recipientes varias veces con agua destilada dejando que los electrodos escurran el agua y secar el recipiente con papel absorbente.

Ajustar la temperatura con el control, a la que tiene la solución de prueba. Enjuagar los electrodos y el recipiente con la solución de prueba, posteriormente llenar el recipiente con esta solución y efectuar la determinación de pH. Repetir el procedimiento con una segunda muestra. La diferencia no deberá ser mayor a 0.05.

Repetir este procedimiento para las demás muestras, leer por duplicado cada muestra.

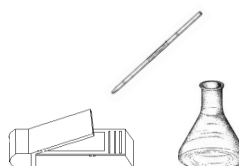
4.4.6.3 DETERMINACION DE GRADOS BRIX ⁽³⁾



1. Limpiar el porta muestra del Brixometro usando algodón impregnado con alcohol



2. Verificar si el Brixometro esta calibrado usando una gota de agua estéril



3. Colocar una gota del filtrado obtenido en la determinación de biomasa en el porta muestra



4. Proceder a realizar la lectura de grados Brix orientando el brixometro hacia la luz para observar mejor la escala

Fig. N° 6: Determinación de Grados Brix ⁽³⁾

4.4.6.4 ELABORACIÓN DE LA CURVA ESTÁNDAR DE GLUCOSA ⁽³⁾

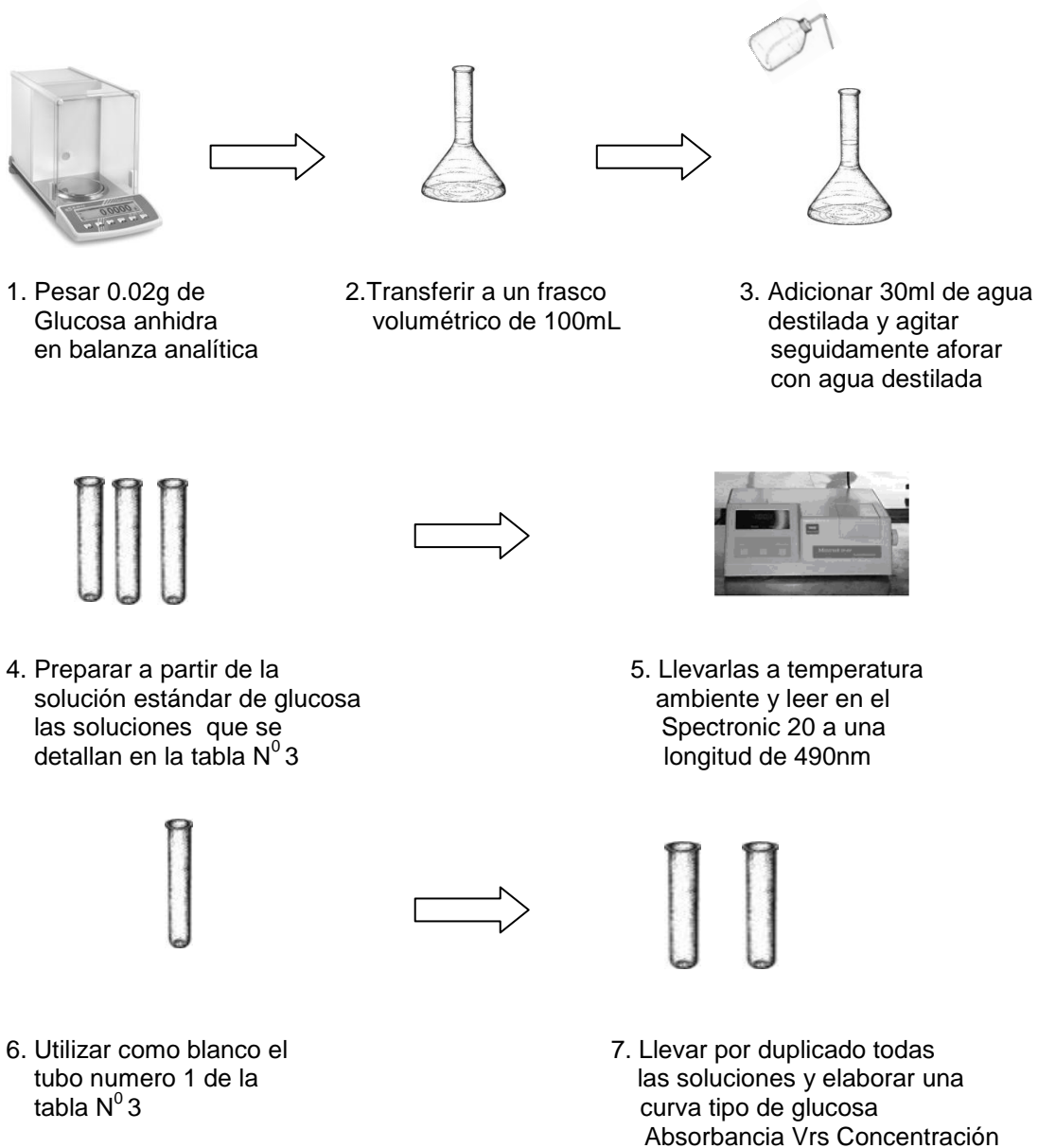


Fig. N^o 7: Elaboración de la curva estándar de glucosa

4.4.6.5 DETERMINACIONES DE AZUCARES TOTALES (FENOL -SULFURICO)⁽³⁾

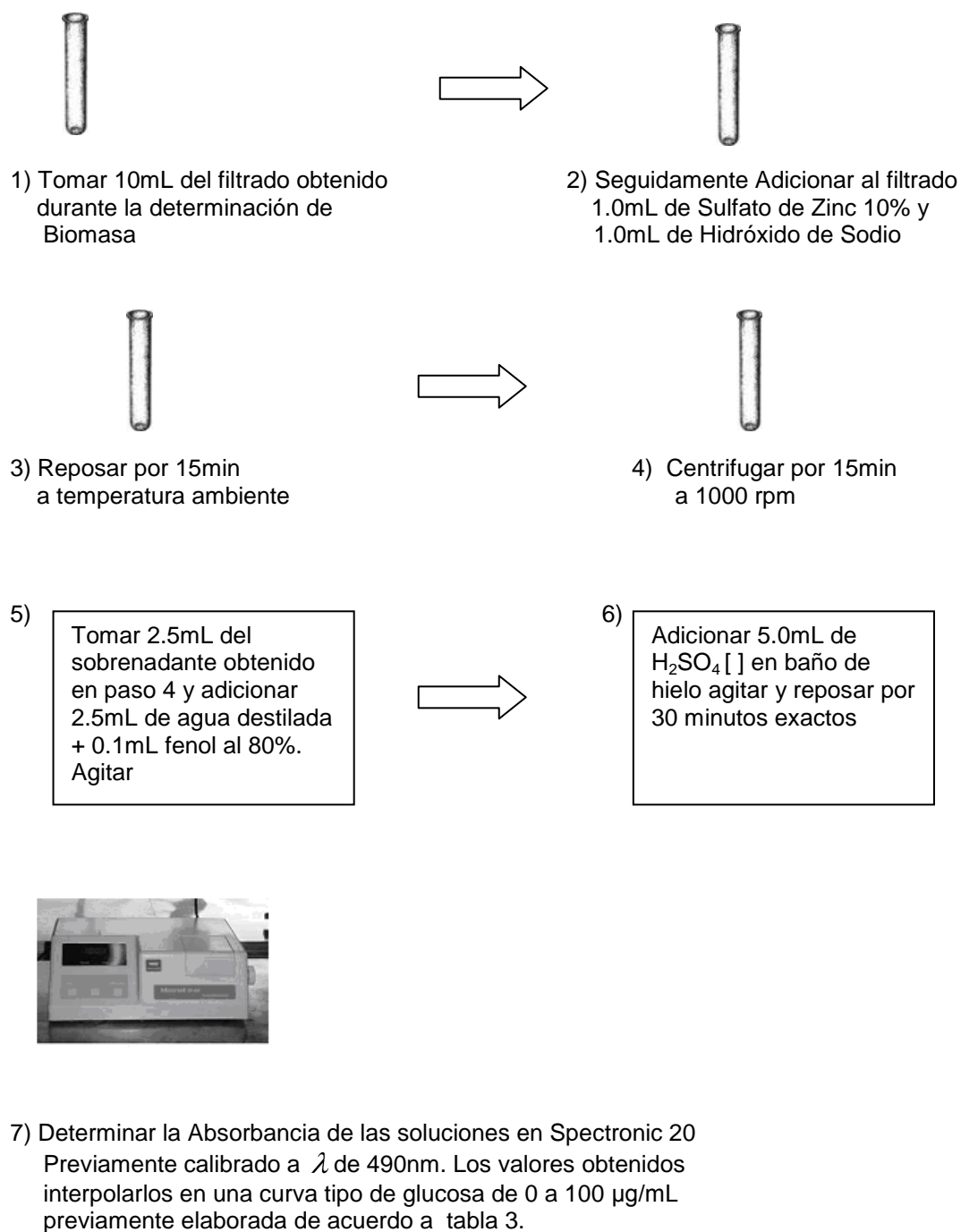


Fig. N° 8: Azucares Totales método de (Fenol -Sulfúrico)

Tabla N° 3: DETERMINACION DE AZUCARES TOTALES POR EL METODO DE FENOL - SULFURICO

Tubo	Sol. de sacarosa o de glucosa (mL)	H ₂ O estéril (mL)	Fenol 80%(mL)	H ₂ SO ₄ Concentrado(mL)
1	0.0	2.0	0.1	5.0
2	0.1	1.9	0.1	5.0
3	0.2	1.8	0.1	5.0
4	0.4	1.6	0.1	5.0
5	0.6	1.4	0.1	5.0
6	0.8	1.2	0.1	5.0
7	1.0	1.0	0.1	5.0

Nota: Una vez agregado el Acido Sulfúrico por las paredes en un baño de hielo dejar reposar por 30 minutos

CUANTIFICACIÓN DE CIANOCOBALAMINA (B₁₂)⁽¹²⁾ (ANEXO 5)

La Cuantificación de vitamina B₁₂ se realizó de acuerdo al procedimiento descrito para el ensayo en la monografía oficial de Cianocobalamina de la Farmacopea Japonesa.

Ensayo:

Transfiera 30_{mg} de Cianocobalamina exactamente pesados y colocarlo en frasco volumétrico de 1 litro con adición de agua destilada. diluir hasta volumen y mezcle.

Disolver en cantidad exactamente pesada el USP Cianocobalamina RS en agua destilada, y diluir cuantitativamente y despacio en agua destilada para obtener una solución estándar que posea una concentración de 30 μ g por mL, seguidamente determine la absorbancia de ambas soluciones en celdas de 1cm mostrando un máximo de absorbancia cerca de 361nm con un espectrofotómetro adecuado, usando agua como blanco.

Calcular la cantidad, en mg, de C₆₃H₈₈CoN₁₄O₁₄P de Cianocobalamina usando la fórmula siguiente:

$$C_{Mx} = \left(\frac{A_{Mx}}{A_{St}} \right) C_{St}$$

En donde C_{Mx} es la concentración en mg por mL, de USP Cianocobalamina en la solución estándar y A_{Mx} y A_{St} son las absorbancia de la solución de Cianocobalamina y de la solución estándar, respectivamente

CAPITULO V

RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

Para el análisis de resultados obtenidos durante el proceso de producción de vitamina B₁₂ se presenta la composición de cada uno de los medios de fermentación que han sido estudiados experimentalmente con la finalidad de seleccionar el más idóneo para la obtención de vitamina B₁₂

A continuación se presentan las gráficas comparativas del comportamiento cinético con respecto al tiempo de las variables siguientes crecimiento celular (biomasa), pH, grados Brix, azúcares, vitaminas cuyos datos provienen del proceso experimental de fermentación A, B, B₁ y C.

Una vez seleccionado el proceso de fermentación mas apropiado se realiza el análisis de resultados para ello se hace uso del programa Equation Grapher versión 3.2 (19661988) (MF Sost International) que consta de dos programas integrados; analizador de la regresión y graficador de la ecuación, acá se hace especial uso del graficador de la ecuación y modelos polinómicos que este presenta; a través de los cuales se puede evaluar las variables cinéticas en cualquier tiempo que sea de interés.

5.1 RESULTADOS DEL PROCESO EXPERIMENTAL ENSAYOS A, B, B1 Y C

Los medios de fermentación A, B, B₁ y C fueron tratados bajo las mismas condiciones experimentales de fermentación

TABLA N° 4: COMPOSICION DEL MEDIO DE FERMENTACIÓN A

N°	Componentes del Medio	g/L
1	Extracto de Levadura	15.00g
2	Macerado de Maíz	3.15g
3	D-glucosa	5.00g
4	Cloruro de cobalto	0.01g
5	Suero de Leche c,s,p	1.000 L

Ajustar pH a 7.2 y autoclavar 121°C x15min x15Lb de presión cantidad de inóculo por litro de sustrato es de 100mL. Condiciones de fermentación 84 horas en anaerobiosis y 84 horas en aerobiosis todo el proceso de fermentación. El biorreactor permanece protegido de la luz cubierto con papel carbón.

TABLA N° 5: COMPOSICION DEL MEDIO DE FERMENTACION B

N°	Componentes del Medio	g/L
1	Extracto de Levadura	15.00g
2	Macerado de Maíz	3.15g
3	Cloruro de cobalto	0.01g
4	Suero de Leche c.s.p	1.000 L

Ajustar pH a 7.2 y autoclavar 121°C x15min x15Lb de presión cantidad de inculo por biorreactor de 125mL de sustrato es 12.5mL. Condiciones de fermentación 84 horas en anaerobiosis y 84 horas ⁽⁶⁾ en aerobiosis todo proceso de fermentación. El biorreactor permanece protegido de la luz.

PROCESO FERMENTATIVO B1

La composición y condiciones de fermentación para B1 son iguales que B

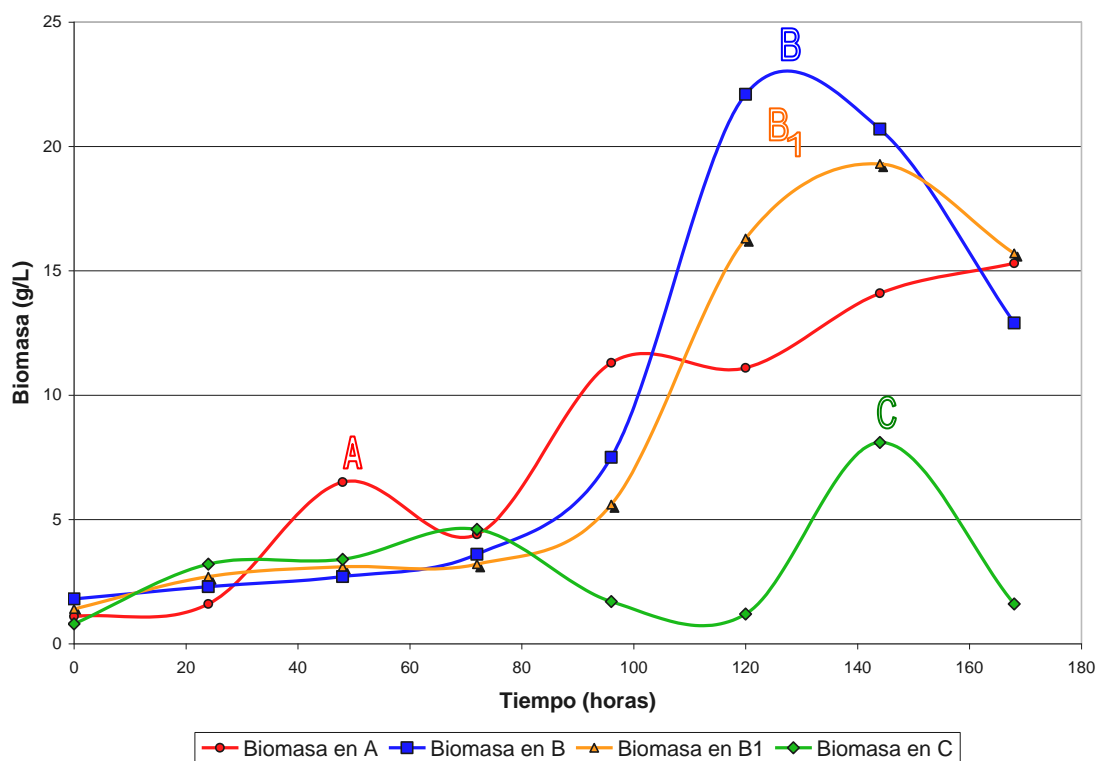
TABLA N° 6: COMPOSICION DEL MEDIO DE FERMENTACION C

Nº	Componentes del Medio	g/L
1	Macerado de Maíz	3.15g
2	Cloruro de cobalto	0.01g
3	Suero de Leche c.s.p	1.000 L

Ajustar pH a 7.2 y autoclavar 121°C x15min x15Lb de presión cantidad de inculo por biorreactor de 125mL de sustrato es 12.5mL. Condiciones de fermentación 84 horas en anaerobiosis y 84 horas en aerobiosis todo el proceso de fermentación. El biorreactor permanece protegido de la luz cubierto con papel carbón.

TABLA N° 7: RESULTADOS DE BIOMASA EN ENSAYOS A, B, B₁ Y C

N° Muestra	Tiempo (horas)	Biomasa en A (g/L)	Biomasa en B (g/L)	Biomasa en B1(g/L)	Biomasa en C (g/L)
1	0	1.1	1.8	1.4	0.8
2	24	1.6	2.3	2.7	3.2
3	48	6.5	2.7	3.1	3.4
4	72	4.4	3.6	3.2	4.6
5	96	11.3	7.5	5.6	1.7
6	120	11.1	22.1	16.3	1.2
7	144	14.1	20.7	19.3	8.1
8	168	15.3	12.9	15.7	1.6

Fig. N° 9: Curva de resultados de Biomasa (g/L) Vrs Tiempo (horas) para ensayos de producción de vitamina B₁₂

La figura N° 9 muestra el comportamiento cinético comparativo en cuanto a generación de células microbianas de las fermentaciones A, B, B₁ y C pudiéndose observar que la fermentación B y B₁ presentan un crecimiento que describe mejor la cinética microbiana en sus diferentes fases: adaptación, exponencial, estacionaria y muerte. No ocurriendo lo mismo en A y C donde su cinética es desordenada e inestable

TABLA N° 8: RESULTADOS DE pH EN ENSAYOS A, B, B₁ Y C

N° Muestra	Tiempo (horas)	pH en A	pH en B	pH en B ₁	pH en C
1	0	7.2	7.2	7.2	7.2
2	24	5.9	6.9	6.7	6.9
3	48	4.9	6.5	6.4	7.0
4	72	5.4	6.4	6.3	6.5
5	96	5.2	7.3	6.9	6.3
6	120	6.9	7.1	7.3	6.3
7	144	7.4	7.7	7.9	8.4
8	168	5.9	5.3	5.3	7.1

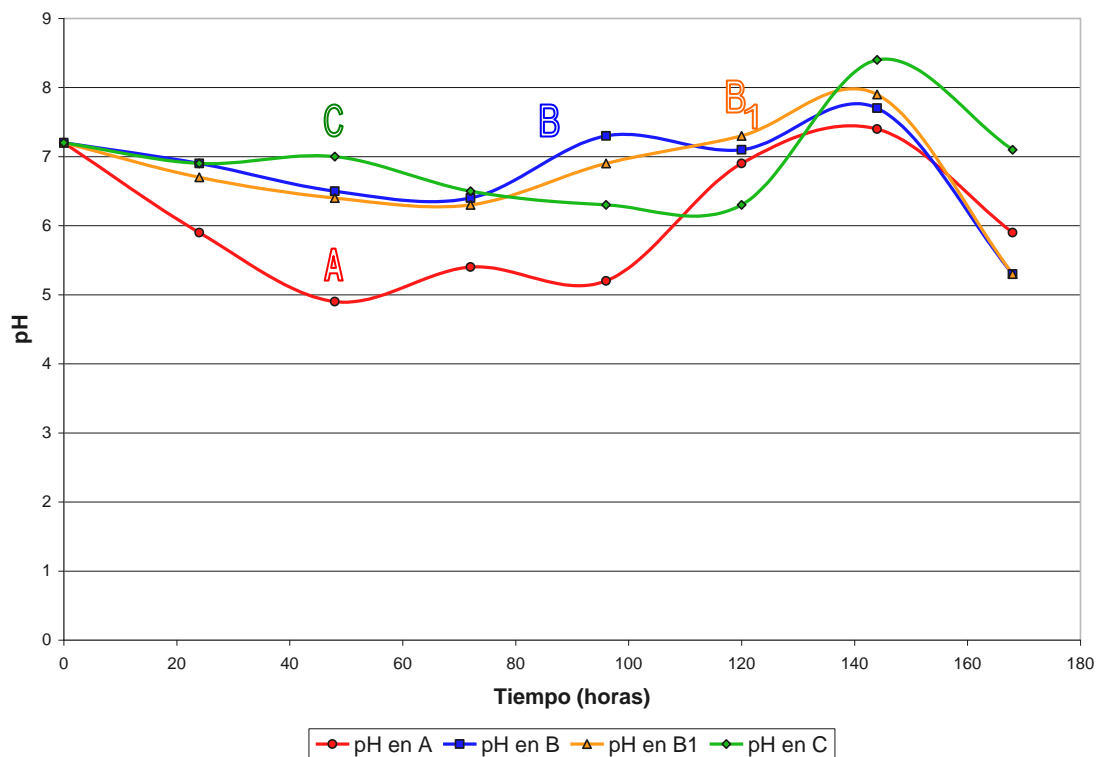


Fig. N° 10: Curva de resultados de pH Vrs Tiempo (horas) para ensayos de producción de vitamina B₁₂

La figura N° 10 muestra las diferentes curvas de pH obtenidas en las fermentaciones. Las condiciones iniciales de pH para los diferentes ensayos son iguales pudiéndose observar que el rango de pH de las fermentaciones B y B₁ se mantienen durante la mayor parte de la fermentación dentro del rango óptimo de crecimiento de la bacteria el cual es de 6.5 a 7.2 hasta las 120 horas cuando el valor de pH tiende a la alcalinidad no así en A cuyo pH se mantiene fuera del rango la mayor parte del tiempo de fermentación

TABLA N° 9: RESULTADOS DE GRADOS BRIX EN ENSAYOS A, B, B1 Y C

N° Muestra	Tiempo (horas)	Brix en A	Brix en B	Brix en B1	Brix en C
1	0	7.4	6.8	6.4	4.4
2	24	5.0	6.0	6.2	4.6
3	48	5.2	5.2	5.2	4.2
4	72	5.4	5.2	5.4	4.4
5	96	6.4	6.0	5.8	4.0
6	120	7.0	6.2	5.4	4.0
7	144	6.0	7.0	6.8	4.0
8	168	4.4	6.4	6.2	2.0

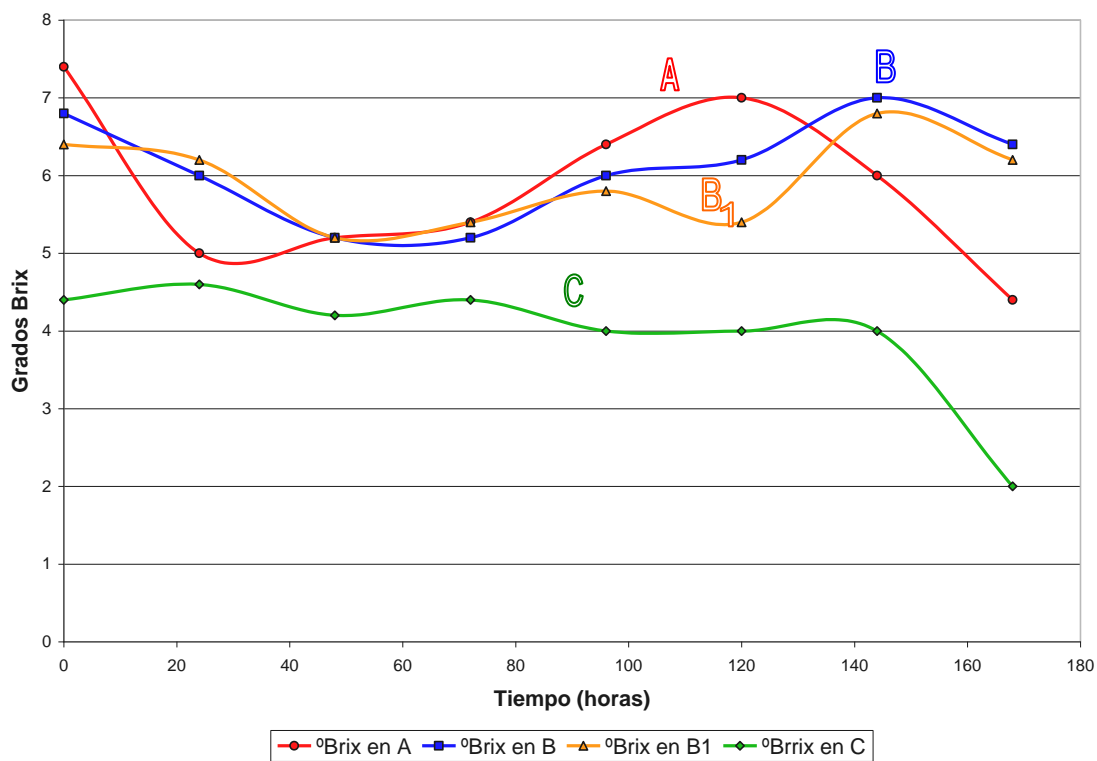


Fig. N° 11: Curva de resultados de Grados Brix Vrs Tiempo (horas) para ensayos de producción de vitamina B₁₂

En la figura N° 11 se observa el comportamiento comparativo de grados Brix de los diferentes ensayos notándose que en los ensayos B y B₁ durante etapa de anaerobiosis los grados Brix tienden a disminuir desde la hora inicial hasta las 72 horas aproximadamente y muestran un incremento a partir de las 96 horas que es cuando inicia la etapa de aerobiosis es de especial interés hacer ver que en el ensayo C los grados brix permanecen constantes desde (96-144) horas que es tiempo que representa la etapa de aerobiosis.

TABLA 10: RESULTADOS DE ABSORBANCIA EN MUESTRAS PARA LA DETERMINACION DE AZUCARES POR FENOL-SULFURICO

N° de muestras	Tiempo (h)	Absorbancia de A $\lambda=490\text{nm}$	Absorbancia de B $\lambda=490\text{nm}$	Absorbancia de B ₁ $\lambda=490\text{nm}$	Absorbancia de C $\lambda=490\text{nm}$
1	0	0.028	0.027	0.029	0.021
2	24	0.044	0.046	0.048	0.017
3	48	0.021	0.022	0.025	0.009
4	72	0.017	0.025	0.023	0.005
5	96	0.065	0.028	0.025	0.005
6	120	0.089	0.016	0.018	0.004
7	144	0.057	0.034	0.031	0.047
8	168	0.007	0.045	0.048	-0.01

Ejemplo: para ensayo fermentativo C a las cero horas la absorbancia mostrada es de 0.021

La ecuación lineal de la curva Standard de glucosa (Fig.Nº18) es
 $Y = 11.6X - 0.0465$

Datos:

Si ; la absorbancia = 0.021, y si $Y = Absorbancia$

Al despejar X se tiene:

$$X = \frac{Y + 0.0465}{11.6} \times \text{FactorDilución}$$

$$X = \frac{0.021 + 0.0465}{11.6} \times 10$$

$$X = 0.058 \text{ mg/mL}$$

TABLA Nº 11: RESULTADOS DE CONCENTRACION DE AZUCARES EN ENSAYOS A, B, B1 Y C

Nº Muestra	Tiempo (horas)	Azúcar A (mg/mL)	Azúcar B (mg/mL)	Azúcar B1 (mg/mL)	Azúcar C (mg/mL)
1	0	0.064	0.063	0.065	0.058
2	24	0.078	0.080	0.081	0.055
3	48	0.058	0.059	0.062	0.048
4	72	0.055	0.062	0.060	0.044
5	96	0.096	0.064	0.062	0.044
6	120	0.117	0.054	0.056	0.044
7	144	0.089	0.069	0.067	0.081
8	168	0.046	0.079	0.081	0.031

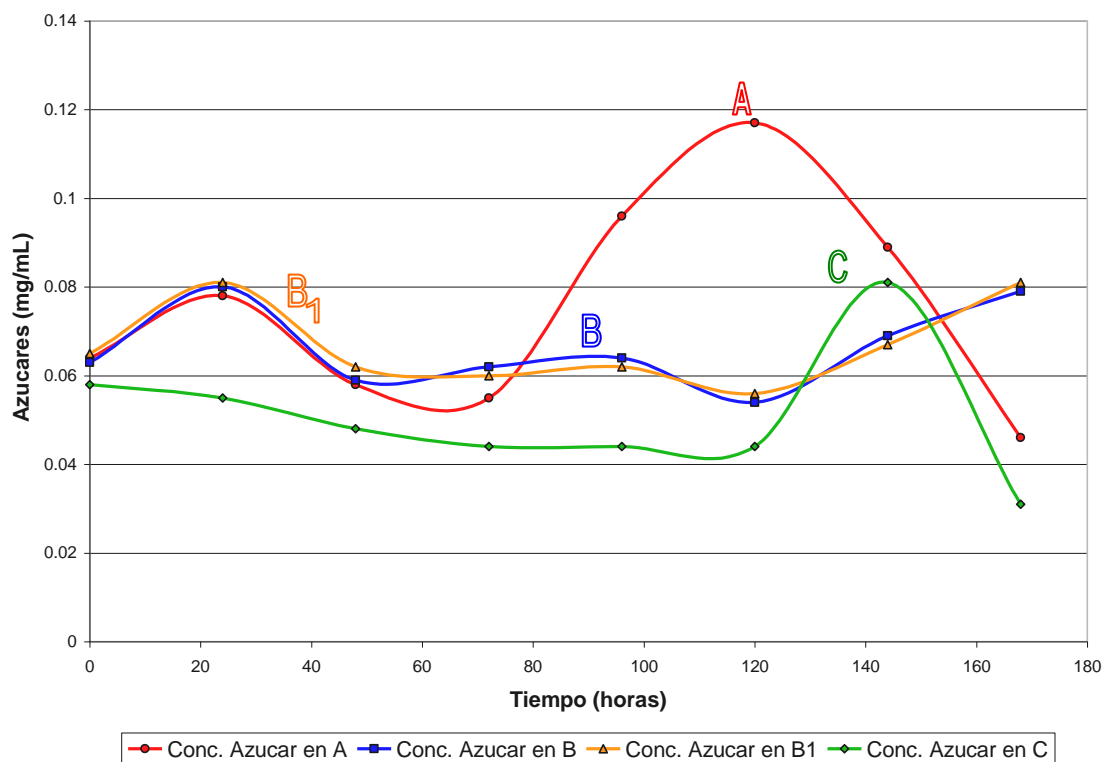


Fig. N° 12: Curva de resultados de concentración de Azúcar (mg/mL) Vrs Tiempo (horas) para ensayos de producción de vitamina B₁₂

La figura N° 12 nos muestra el comportamiento de la concentración de azúcar obtenida por el método de fenol-sulfúrico de los diferentes ensayos con respecto al tiempo es de notar que durante las primeras 24 horas la cepa tiende a desdoblarse la lactosa presente en el medio. Es bien notable como en el intervalo de tiempo de (24 a 48) horas el microorganismo utiliza los azúcares libres presentes en el medio para obtener su fuente de energía y durante la etapa exponencial en las fermentaciones de B el crecimiento no se ve influenciado de manera directa con el sustrato. Aunque su comportamiento es

diferente en la fermentación A se cree que este es debido a la complejidad del medio de fermentación.

TABLA N° 12: RESULTADOS DE ABSORBANCIA DE VITAMINA B₁₂ EN ENSAYOS A, B, B1 Y C

N° Muestra	Tiempo (horas)	Abs. Vit B12 en A	Abs. Vit B12 en B	Abs. Vit B12 en B1	Abs Vit B12 en C
1	0	0.254	0.088	0.098	0.164
2	24	0.598	0.147	0.135	0.302
3	48	0.39	0.148	0.132	0.504
4	72	0.31	0.142	0.12	0.632
5	96	0.272	0.192	0.178	0.668
6	120	0.369	0.268	0.188	0.726
7	144	0.202	0.167	0.218	0.177
8	168	0.190	0.2	0.19	0.128

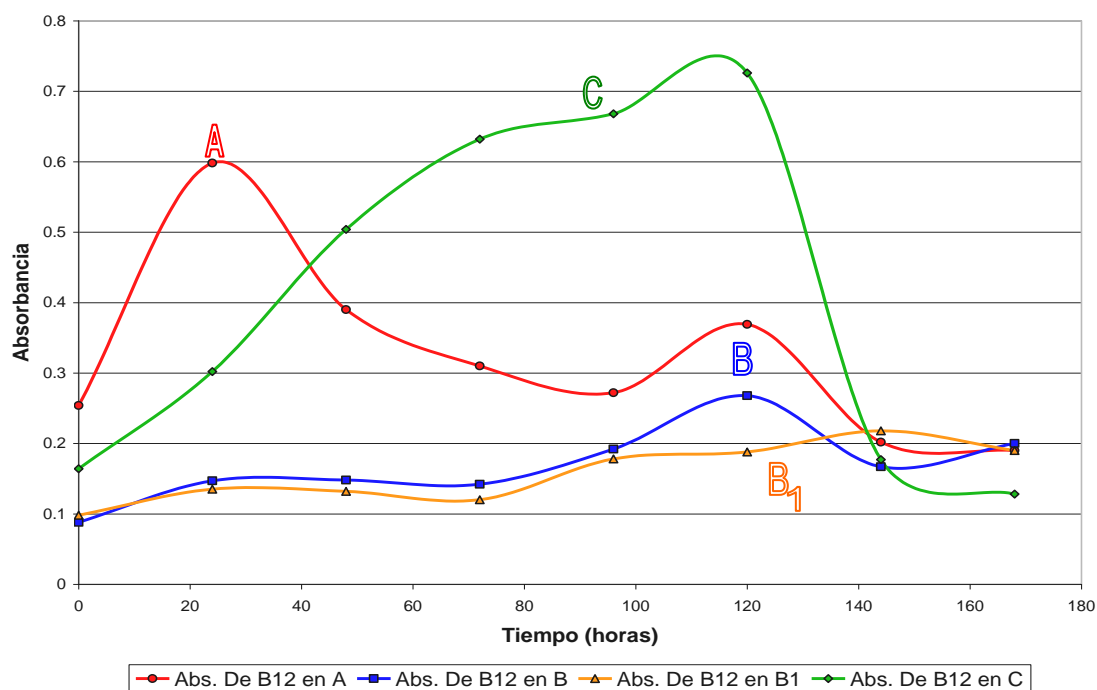


Fig. N° 13: Curva de resultados de absorbancia de Vitamina Vrs Tiempo En horas para ensayos de producción de vitamina B₁₂.

Ejemplo de cálculo de la concentración de vitamina B₁₂ a través de método espectrofotométrico para ensayo fermentativo A, a las cero horas.

DATOS:

Longitud de onda utilizada: 361nm.

Standard utilizado: Vitamina B₁₂ (materia prima)

Concentración del Standard: 30µg/mL

Absorbancia del Estándar: 0.696

Ejemplo:

Absorbancia de Muestra a las cero horas: 0.254

$$C_{Mx} = \left(\frac{A_{Mx}}{A_{St}} \right) C_{St}$$

$$C_{Mx} = \left(\frac{0.254}{0.696} \right) 30 \frac{\mu g}{mL} = 10.948 \frac{\mu g}{mL}$$

$$C_{Mx} = 10.948 \frac{\mu g}{mL} \times \left(\frac{1mg}{1000\mu g} \right)$$

$$C_{Mx} = 0.0109 \frac{mg}{mL} \text{ De Vitamina B}_{12}$$

TABLA N° 13: RESULTADOS DE CONCENTRACION DE VITAMINA B12 EN ENSAYOS A, B, B1 y C

N° Muestra	Tiempo (horas)	Vit. B ₁₂ en A (mg/mL)	Vit. B ₁₂ en B (mg/mL)	Vit. B ₁₂ en B1 (mg/mL)	Vit. B ₁₂ en C (mg/mL)
1	0	0.011	0.004	0.004	0.007
2	24	0.026	0.006	0.006	0.013
3	48	0.017	0.006	0.006	0.022
4	72	0.013	0.006	0.005	0.027
5	96	0.012	0.008	0.008	0.029
6	120	0.016	0.012	0.01	0.031
7	144	0.009	0.007	0.009	0.022
8	168	0.008	0.009	0.008	0.006

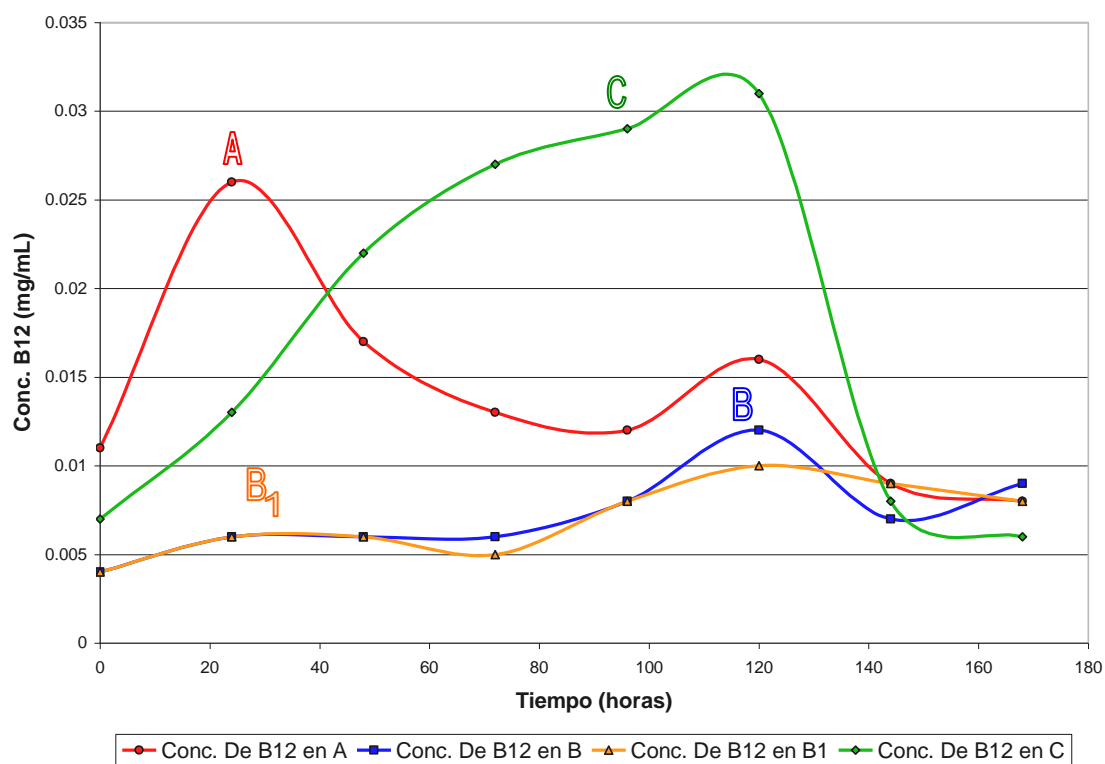


Fig. N° 14: Curva de resultados de Concentración de Vitamina Vrs Tiempo (horas) para ensayos de producción de vitamina B₁₂.

En la figura N° 14 se muestra la concentración de vitamina B12 con respecto al tiempo de los diferentes ensayos. C presenta una producción acelerada y constante desde cero horas hasta alcanzar su máximo valor a las 120 horas 31mg/L en A la mayor concentración de vitamina se obtiene durante las primeras 24 horas de fermentación y luego esta tiende a disminuir producto mismo de la degradación de la vitamina

En B y B1 durante el periodo de anaerobiosis la producción de vitamina permanece sin variaciones considerables mostrando incrementos muy pequeños a partir de la etapa de aerobiosis se observa un mayor incremento obteniéndose el máximo valor a las 120 horas el cual es de 12mg/L.

5.3 BREVE ANÁLISIS DE PROCESOS FERMENTATIVOS A, B, B₁ Y C

Como se observó anteriormente el comportamiento cinético de fermentación de manera gráfica donde se hace una comparación de cada una de las variables como lo es pH, Grados Brix, azúcares etc. con respecto a cada medio de fermentación el cual presenta una composición distinta del otro por ejemplo en C. Su composición es la más simple de todas la fuente de carbono proviene de la lactosa presente en el suero.

En el ensayo B además de lo que contiene C en su composición posee extracto de levadura en cantidad de 1,5 (g/L) el cual viene a favorecer el crecimiento celular. En el ensayo A además de la composición en C lleva extracto de levadura en cantidad de 1,5(g/L) y además glucosa anhidra en relación de 5(g/L) .En el proceso fermentativo A la fuente de carbono que el microorganismo utiliza no proviene exclusivamente de la lactosa sino también de la glucosa libre presente en el medio , el microorganismo comienza su fase de crecimiento consumiendo los azúcares simples presentes en el medio lo que origina un crecimiento acelerado y desordenado en Biomasa al agotar los azúcares simples el microorganismo empezará a consumir los disacáridos lo cual no es apropiado para esta investigación ya que se persigue la utilización de los componentes propios del suero de leche como lo es la lactosa, sales minerales , vitaminas y proteínas entre otros.

TABLA N° 14: RESULTADOS DEL ANALISIS DE MUESTRAS POR EL METODO DE PESO SECO DURANTE EL PROCESO DE PRODUCCION DE VITAMINA B₁₂ (ANEXO 7)

N° de Mx	Tiempo (h)	Biomasa en mg/ml	Ln X
1	0	1.60	0.47
2	24	2.49	0.91
3	48	2.90	1.06
4	72	3.40	1.22
5	96	6.57	1.88
6	120	19.19	2.95
7	144	20.01	2.99
8	168	14.32	2.66

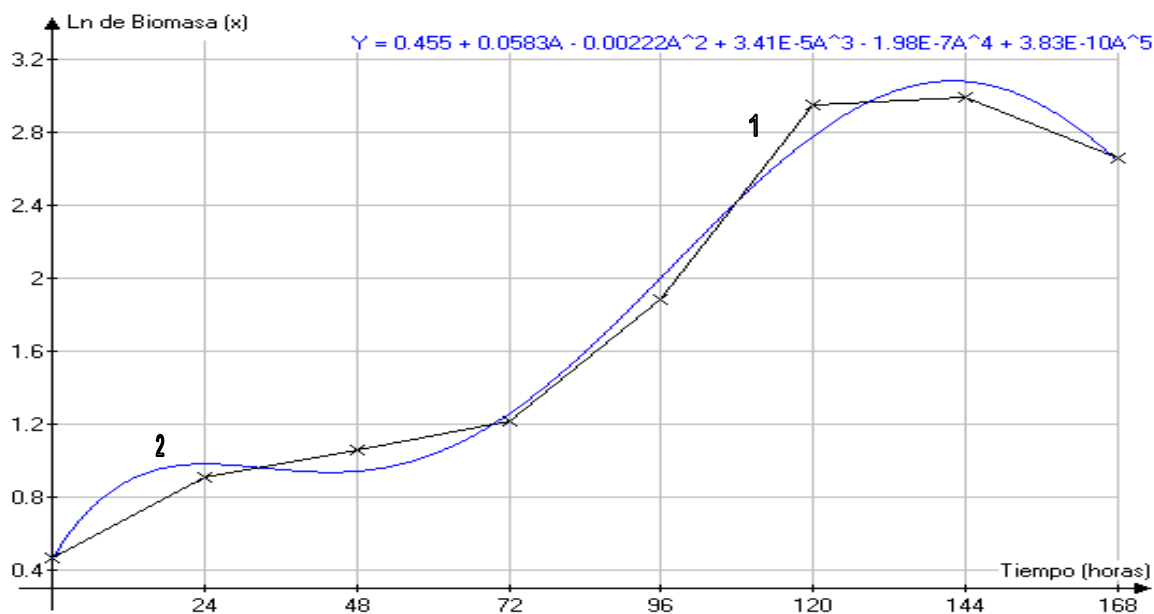


Fig. N° 15: Curva de peso seco Ln X Vrs Tiempo (horas) para la producción de vitamina B₁₂.

- Curva N° 1 se obtiene graficando los resultados experimentales
- Curva N° 2 se obtiene aplicando el método de regresión polinomial a los resultados obtenidos experimentalmente

La Figura N° 15 muestra el aumento ordenado de cada uno de los componentes celulares con relación al tiempo de 0 a 72 horas se observa que el microorganismo se duplica de una forma lenta esto debido a la naturaleza del medio y condiciones de anaerobiosis ya que en los primeros días de fermentación la bacteria necesita desdoblar lactosa para obtener una fuente de energía y así poder multiplicarse y de 72 a 120 horas el microorganismo se reproduce a una velocidad que es la máxima de todas las fases de crecimiento esta se ve favorecida por la aerobiosis y 120 a 144 horas se observa la fase estacionaria por agotamiento de nutrientes seguido esto de una fase de muerte de 144 a 168 horas

5.3 VELOCIDAD VOLUMÉTRICA DE BIOMASA POR PESO SECO ⁽¹¹⁾

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

μ : velocidad volumetrica (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

$$\mu = \frac{0.91 - 0.47}{24 - 0} = \frac{dL_{nx}}{dt}$$

$$\mu = 0.018(g/Lh)$$

TABLA N° 15: RESULTADOS DE VELOCIDAD VOLUMETRICA DE BIOMASA POR PESO SECO DURANTE EL PROCESO DE PRODUCCION DE VITAMINA B₁₂

Tiempo (h)	Velocidad Volumétrica (g/Lh)
0	0.000
24	0.018
48	0.012
72	0.010
96	0.015
120	0.021
144	0.018
168	0.013

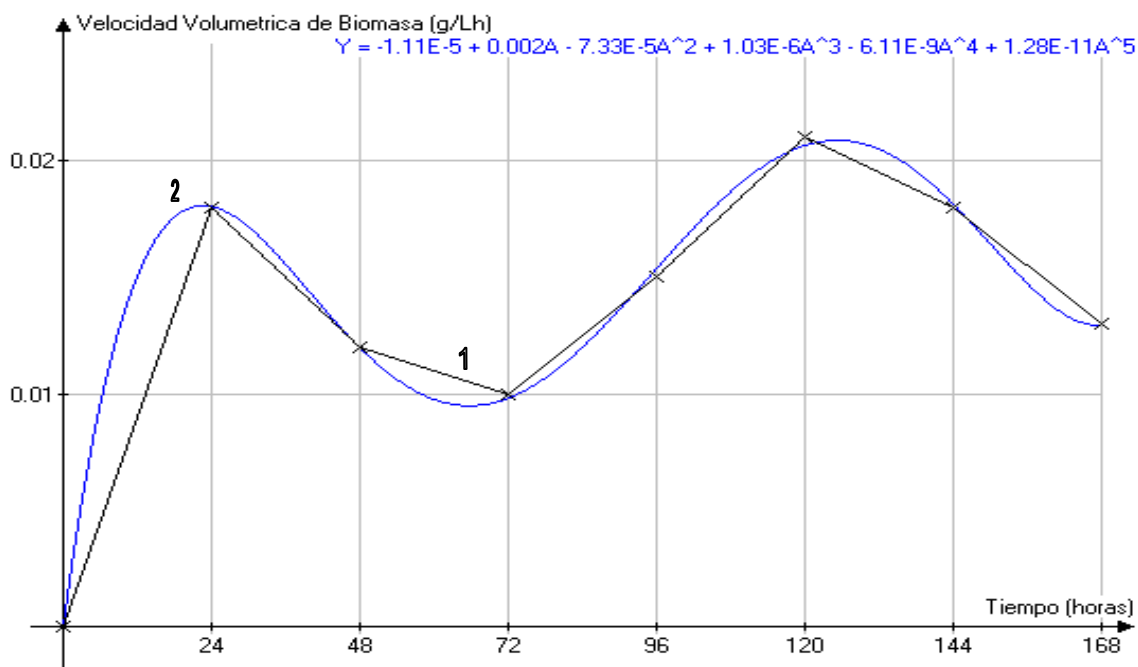


Fig. N° 16: Curva de Velocidad Volumétrica de Biomasa (g/Lh)
Vrs Tiempo (horas) para la producción de vitamina B₁₂

- Curva N° 1 es el resultado obtenido a través de la aplicación de la fórmula de velocidad volumétrica de biomasa a los datos experimentales
- Curva N° 2 se obtiene aplicando el método de regresión polinomial a los resultados obtenidos experimentalmente

La Fig. N° 16 muestra el comportamiento del crecimiento celular microbiano con relación al tiempo. El incremento ordenado de cada componente celular en un medio complejo a partir de una célula pura se ve claramente afectado por las etapas mismas del proceso fermentativo notándose que cada etapa describe su propia cinética; la etapa de anaerobiosis que va de 0 horas hasta las 72 horas aproximadamente con tendencia a muerte celular en dicho tiempo nos muestra un punto crítico sobre el tiempo que debe durar dicha etapa sin provocar la

muerte total de las células la cual es 72 horas e inmediatamente proceder a entrar a una etapa de oxigenación la cual es muy necesaria para poder obtener el metabolito esperado en una cantidad apropiada

5.4 VELOCIDAD ESPECÍFICA DE BIOMASA POR EL MÉTODO DE PESO SECO ⁽¹¹⁾

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

Donde :

μ' : velocidad específica

x: gramos de biomasa / litros de muestra analizada

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

Ejemplo para t = 24 horas

$$\mu' = \frac{1}{2.49} \times 0.018 = 0.01125 \text{ g / Lh.}$$

$$\mu' = 0.007 \text{ g / Lh}$$

TABLA N° 16: RESULTADOS DE VELOCIDAD ESPECIFICA DE BIOMASA POR PESO SECO DURANTE EL PROCESO DE PRODUCCION DE VITAMINA B₁₂

Tiempo (h)	Velocidad especifica de generación de células microbianas (g/Lh)
0	0.000
24	0.007
48	0.004
72	0.003
96	0.002
120	0.001
144	0.001
168	0.001

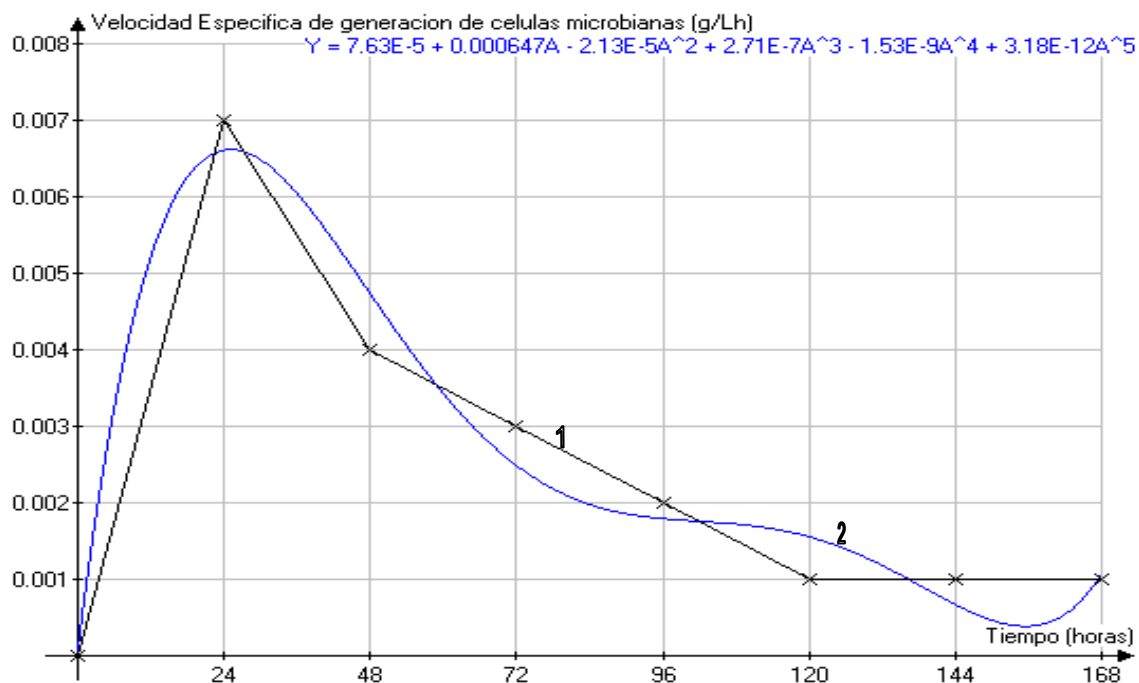


Fig. N° 17: Curva de Velocidad Especifica de Biomasa (g/Lh) Vrs Tiempo (horas) para la producción de vitamina B₁₂

- Curva N° 1 es el resultado obtenido a través de la aplicación de la fórmula de velocidad específica de biomasa a los datos experimentales
- Curva N° 2 se obtiene aplicando el método de regresión polinomial a los resultados obtenidos experimentalmente

La Fig. N° 17 se observa el comportamiento cinético de generación de células microbianas para cada tiempo específico durante el proceso de producción de vitamina B₁₂. La fase exponencial se lleva a cabo de 0 a 24 horas; alcanzando el máximo valor de velocidad específica a las 24 horas, la fase estacionaria es relativamente corta durando 6 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 finalizar el periodo de análisis de 168 horas

TABLA N° 17: TABLA DE RESULTADOS DE CURVA ESTANDAR DE GLUCOSA MEDIANTE LA APLICACIÓN DEL METODO FENOL- SULFURICO PARA LA CUANTIFICACION DE AZUCARES TOTALES

N° de estándar	mL de solución de glucosa	mL de agua destilada	mL de Fenol al 80%	mL de H ₂ SO ₄	lectura de la Absorbancia	Concentración (mg/mL)
1	0.0	2.0	0.1	5.0 R	0.000	0.0000
2	0.1	1.9	0.1	5.0 E	0.012	0.0053
3	0.2	1.8	0.1	5.0 P	0.058	0.0106
4	0.4	1.6	0.1	5.0 O	0.176	0.0212
5	0.6	1.4	0.1	5.0 S	0.300	0.0318
6	0.8	1.2	0.1	5.0 O	0.412	0.0424
7	1.0	1.0	0.1	5.0	0.620	0.0530

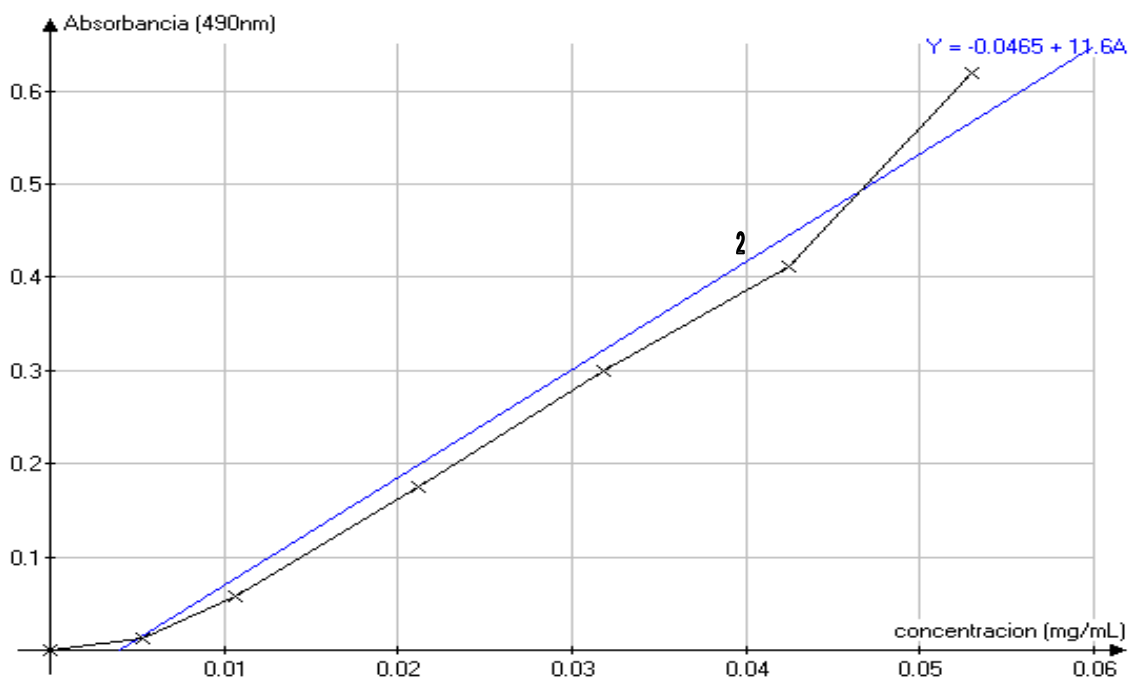


Fig. N° 18: Curva estándar de glucosa

- Curva N° 2: Representa la curva idealizada de glucosa y la ecuación obtenida es $Y = 11.6X - 0.0465$

Al aplicar regresión lineal la ecuación obtenida es $Y = 11.6X - 0.0465$

Ejemplo: para $A = 0.028$, y si $Y = A$

Al despejar X se tiene:

$$X = \frac{Y + 0.0465}{11.6}$$

$$X = \frac{0.028 + 0.0465}{11.6}$$

$$X = 0.0064 \text{ mg/mL}$$

TABLA N° 18: RESULTADOS DE LA APLICACIÓN DE LA REGRESION LINEAL AL ANALISIS DE MUESTRAS POR EL METODO DE FENOL SULFURICO PARA LA CUANTIFICACION DE AZUCARES TOTALES.

N° de muestras	Tiempo (horas)	Lectura de la Absorbancia $\lambda=490\text{nm}$ (ANEXO 8)	Regresión Lineal $Y = 11.6x - 0.0465$ $X = (\text{mg/mL})$	Factor de dilución	Concentración (mg/mL)
1	0	0.028	0.0064	10	0.0642
2	24	0.047	0.0081	10	0.0806
3	48	0.0235	0.0060	10	0.0603
4	72	0.024	0.0061	10	0.0608
5	96	0.0265	0.0063	10	0.0629
6	120	0.017	0.0055	10	0.0547
7	144	0.0325	0.0068	10	0.0681
8	168	0.0465	0.0080	10	0.0802

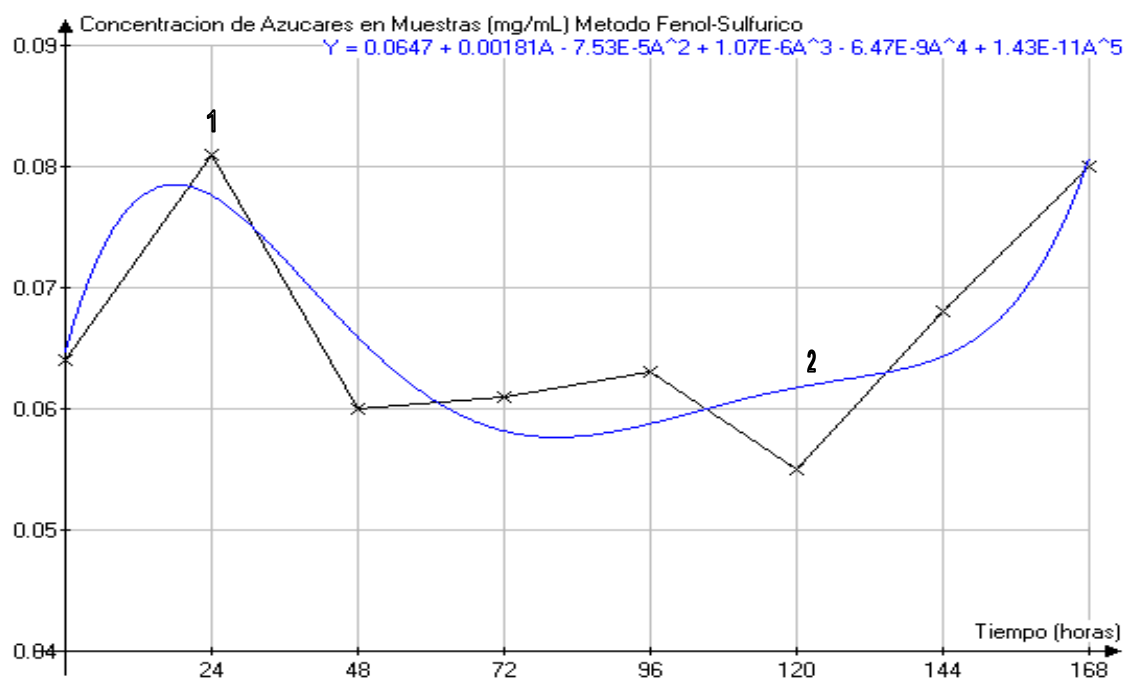


Fig. N° 19: Curva de concentración de azúcares en Muestras Vrs Tiempo (h) Método Fenol – Sulfúrico

- Curva N° 1 es el resultado obtenido de los datos experimentales
- Curva N° 2 se obtiene aplicando el método de regresión polinomial a los resultados obtenidos experimentalmente

Al aplicar la regresión polinomial se obtiene:

$$Y = 0.0647 + 0.00181X - 7.53E - 5X^2 + 1.07E - 6X^3 - 6.47E - 9X^4 + 1.43E - 11X^5$$

Para un t=0 y si t= x

$$Y = 0.0647 + 0.00181(0) - 7.53E - 5(0)^2 + 1.07E - 6(0)^3 - 6.47E - 9(0)^4 + 1.43E - 11(0)^5$$

$$Y = 0.0647$$

TABLA N° 19: APLICACIÓN DE LA REGRESIÓN POLINOMIAL A LOS RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE MUESTRAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE AZUCARES TOTALES

N° de muestras	Tiempo (h)	Concentración (mg/mL)
1	0	0.065
2	24	0.077
3	48	0.066
4	72	0.058
5	96	0.058
6	120	0.061
7	144	0.062
8	168	0.077

5.5 VELOCIDAD VOLUMÉTRICA DE CONSUMO DE SUSTRATO ⁽¹¹⁾

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

Q_s : velocidad volumetrica de consumo de sustrato (g / L.h)

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

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

t_2 : tiempo final

t_1 : tiempo inicial

Ejemplo para t =24 horas

$$Q_s = \frac{0.077 - 0.065}{24 - 0} = - \frac{dS}{dt}$$

$$Q_s = 0.0005 \text{ g/Lh}$$

TABLA N° 20: RESULTADOS DE VELOCIDAD VOLUMETRICA DE CONSUMO DE SUSTRATO DURANTE EL PROCESO DE PRODUCCION DE VITAMINA B₁₂

Tiempo (h)	Concentración (mg/mL)	Q_s (g/Lh)
0	0.065	0.000
24	0.077	5.00E-04
48	0.066	2.08E-05
72	0.058	-9.72E-05
96	0.058	-7.29E-05
120	0.061	-3.33E-05
144	0.062	-2.08E-05
168	0.077	7.14E-05

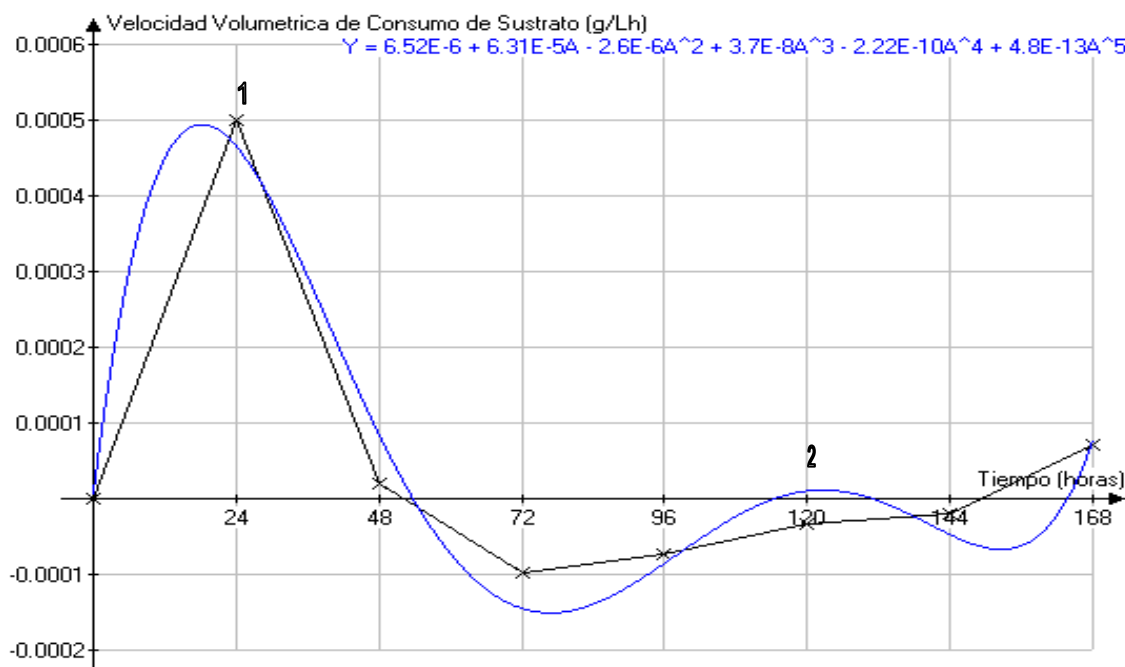


Fig. N° 20: Curva de Velocidad Volumétrica Consumo de Sustrato (g/Lh) Vrs Tiempo (horas) para la producción de vitamina B₁₂

- 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 Fig. N° 20 nos muestra el comportamiento que sigue la cepa *Propionibacterium freudenreichii* en cuanto a velocidad de consumo de sustrato en el medio de fermentación para producción de vitamina B₁₂. El valor de Q_s en el intervalo de tiempo de 0 a 24 horas es positivo lo que indica que la bacteria durante este tiempo desdobla lactosa a azúcar simple (glucosa) aumentando su concentración en el medio de fermentación. La gráfica muestra que a partir de las 24 horas la concentración de glucosa tiende a disminuir

notablemente ocurriendo el máximo consumo de sustrato a las 72 horas y manteniendo valores negativos hasta un poco más de las 144 horas.

En otras palabras desde las 24 hasta las 144 horas aproximadamente es mayor la cantidad de sustrato consumido (glucosa) a la que se ha generado con respecto a las primeras 24 horas de iniciada la fermentación sustrato necesario para el incremento de los componentes celulares y metabolismo propio de la bacteria

5.6 VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CONSUMO DE SUSTRATO ⁽¹¹⁾

$$q_s = -\frac{1}{x} \times -\frac{ds}{dt}$$

donde

q_s : velocidad especifica de consumo de sustrato(g/L.h)

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

x : gramos de biomasa / litros de muestra analizada

Ejemplo para t = 24 horas

$$q_s = -\frac{1}{2.49} \times (0.0005)$$

$$q_s = -2.01E-04 \text{ g/Lh}$$

TABLA N° 21: RESULTADOS DE VELOCIDAD ESPECIFICA DE CONSUMO DE SUSTRATO DURANTE EL PROCESO DE PRODUCCION DE VITAMINA B₁₂

Tiempo (h)	Concentración (mg/mL)	q _s (g/Lh)
0	0.065	0.0000
24	0.077	-2.01E-04
48	0.066	-7.20E-06
72	0.058	2.86E-05
96	0.058	1.11E-05
120	0.061	1.70E-06
144	0.062	1.00E-06
168	0.077	-5.00E-06

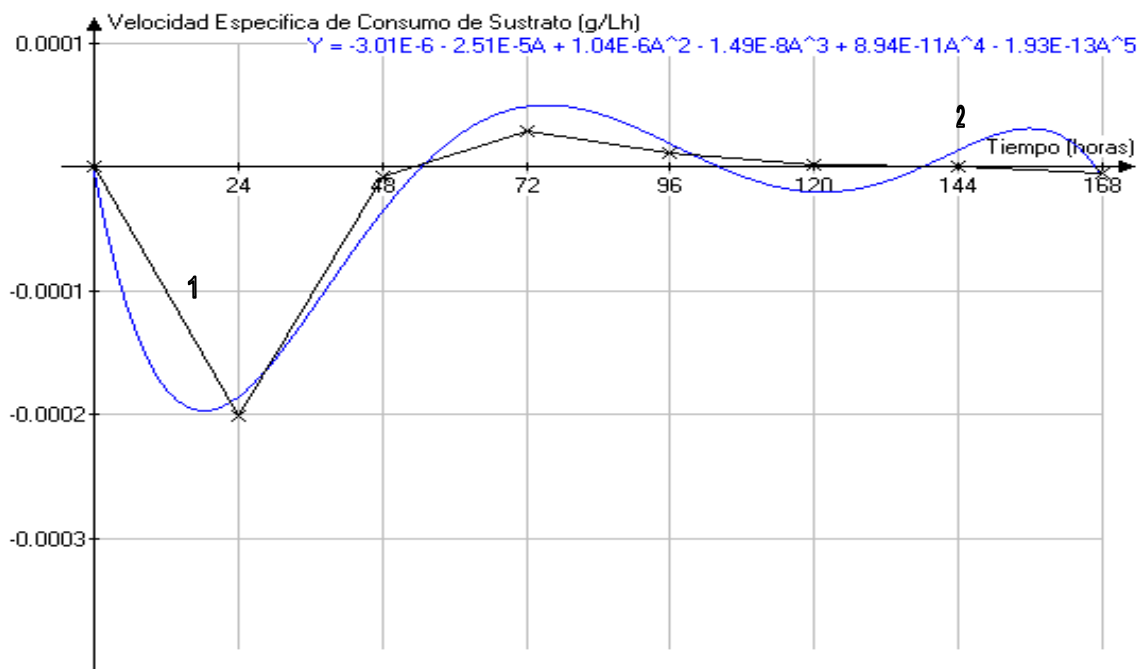


Fig. N° 21: Curva de Velocidad Específica de Consumo de Sustrato (g/Lh) Vrs Tiempo (horas) para la producción de vitamina B₁₂.

- 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 21 nos describe la relación existente entre mg de sustrato consumido / mg de biomasa que se forman en un litro de medio de fermentación para un tiempo específico. En las primeras 24 horas los mg de sustrato consumido son menores que los mg de biomasa que se forma esto debido a la actividad principal de la bacteria de desdoblar lactosa a azúcares simples para posterior utilización de fuente de energía para su reproducción

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. Lo que indica que en dicho tiempo los mg de sustrato consumido han alcanzado su máximo valor con respecto a los mg de biomasa que se han formado.

5.7 CALCULO DE LA CONCENTRACIÓN DE VITAMINA B₁₂ POR EL MÉTODO ESPECTROFOTOMETRICO ⁽¹²⁾

DATOS:

Longitud de onda utilizada: 361nm.

Standard utilizado: Vitamina B₁₂ (materia prima)

Concentración del Standard: 30µg/mL

Absorbancia del Estándar: 0.696

Ejemplo:

Absorbancia de Muestra a las cero horas: 0.088

$$C_{Mx} = \left(\frac{A_{Mx}}{A_{St}} \right) C_{St}$$

$$C_{Mx} = \left(\frac{0.09}{0.696} \right) 30 \frac{\mu g}{mL} = 3.879 \frac{\mu g}{mL}$$

$$C_{Mx} = 3.879 \frac{\mu g}{mL} \times \left(\frac{1mg}{1000\mu g} \right)$$

$$C_{Mx} = 3.879E - 03 \frac{mg}{mL}$$

TABLA N° 22: RESULTADOS DE CONCENTRACION DE VITAMINA DURANTE EL PROCESO DE PRODUCCION DE VITAMINA B₁₂.

Tiempo (h)	Absorbancia	Concentración (mg/mL)	Concentración (g/L)	Concentración (mg/100mL)
0	0.09	0.0039	0.0039	0.39
24	0.14	0.0060	0.0060	0.6
48	0.14	0.0060	0.0060	0.6
72	0.13	0.0056	0.0056	0.56
96	0.19	0.0082	0.0082	0.82
120	0.26	0.0112	0.0112	1.12
144	0.19	0.0082	0.0082	0.82
168	0.20	0.0086	0.0086	0.86

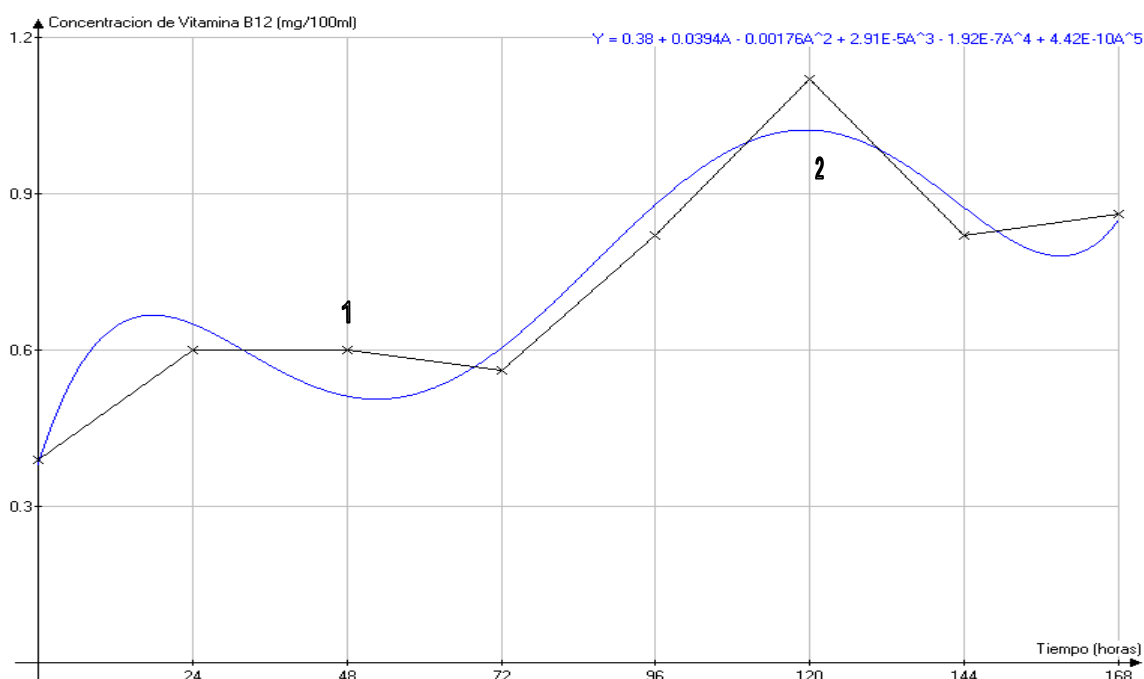


Fig. N° 22: Concentración de Vitamina B₁₂ (mg/100ml) Vrs Tiempo (horas)

- Curva N° 1 nos muestra el comportamiento del microorganismo en la obtención de Vitamina B₁₂ expresado en (mg/100mL) calculada a través del método espectrofotométrico.
- Curva N° 2 se obtiene aplicando el método de regresión polinomial a los resultados obtenidos experimentalmente

La Figura N° 22 muestra el comportamiento de producción de vitamina B₁₂ en mg/100ml por parte del microorganismo *Propionibacterium freudenreichii* usando suero lácteo como medio de cultivo puede verse que inicialmente ya se tiene una concentración de vitamina B₁₂ en el medio de fermentación la cual se ve incrementada en un 65% en las primeras 24 horas de iniciada la fermentación. De 24 a 72 horas no se observa un incremento significativo en la concentración de vitamina B₁₂

lo que es debido a las condiciones propias de fermentación que es de anaerobiosis pero a partir de las 72 a 120 horas se ve un notable incremento en la concentración alcanzando su máximo valor a las 120 horas con una producción de 1.12 mg de vitamina B₁₂/ 100ml de medio. Obteniéndose dicho resultado en el momento preciso que la generación de células microbianas finaliza la fase exponencial y entra en fase estacionaria momento a partir del cual ya no hay mas incremento en la concentración de vitamina B₁₂ presente en el medio de fermentación.

5.8 VELOCIDAD VOLUMÉTRICA DE PRODUCCIÓN DE VITAMINA B₁₂ (11)

$$Q_p = \frac{P_2 - P_1}{t_2 - t_1} = \frac{dp}{dt}$$

Q_p : velocidad volumetrica de produccion de vitamina B₁₂ (g / L.h)

P_2 : Concentracion (g/L) de vitamina B₁₂ en un tiempo final

P_1 : Concentracion (g/L) de vitamina B₁₂ en un tiempo inicial

t_2 : tiempo final

t_1 : tiempo inicial

Ejemplo para t = 24 horas

$$Q_p = \frac{0.0060 - 0.0039}{24 - 0} = \frac{dp}{dt}$$

$$Q_p = 8.80E - 05 \text{ g / Lh}$$

TABLA N° 23: RESULTADOS DE VELOCIDAD VOLUMETRICA DE PRODUCCION DE VITAMINA

Tiempo (h)	Concentración (mg/mL)	Qp(g/Lh)
0	0.0039	0.000000
24	0.0060	8.80E-05
48	0.0060	4.40E-05
72	0.0056	2.40E-05
96	0.0082	4.50E-05
120	0.0112	6.10E-05
144	0.0082	3.00E-05
168	0.0086	2.80E-05

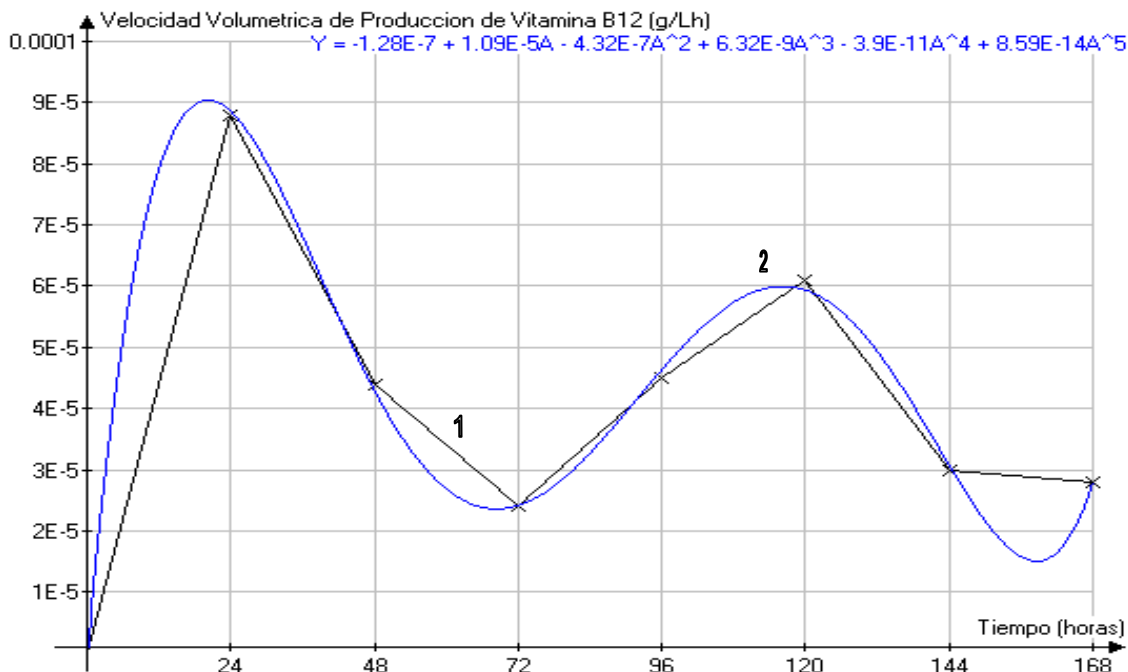


Fig. N° 23: Curva de Velocidad Volumétrica Producción de Vitamina (g/Lh) Vrs Tiempo (horas) para la producción de vitamina B₁₂

- 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 representa la tendencia de producción de vitamina B₁₂ expresada en g/Lh presentes en las muestras analizadas en los diferentes tiempos. A las 24 horas se observa la máxima velocidad volumétrica de producción de Vitamina la cual esta relacionada de manera directa al tiempo en que se desdobra la máxima cantidad de lactosa por el microorganismo de 24 a 72 horas la Q_p disminuye con tendencia a cero lo que indica un punto crítico en la etapa de anaerobiosis y el momento oportuno de oxigenar el medio para

iniciar la segunda etapa de fermentación que es la de aerobiosis logrando de esta manera incrementar nuevamente el valor de Q_p obteniéndose un segundo máximo valor a las 120 horas lo que nos indica que es en la finalización de la etapa exponencial e inicio de la fase estacionaria el momento en el cual se alcanza la mayor concentración de vitamina y a partir de este momento ya no existe un incremento notable en la producción y la cepa entra en fase de muerte.

5.9 VELOCIDAD ESPECÍFICA DE FORMACIÓN DE VITAMINA B₁₂(11)

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

donde

q_p : velocidad específica de producción de vitamina B₁₂

x: gramos de biomasa / litros de muestra analizada

dp/dt: velocidad volumétrica de producción de vitamina B₁₂

Ejemplo para t = 24 horas

$$q_p = \frac{1}{2.49} \times (8.80E-05)$$

$$q_p = 3.53E-05 \text{ g/Lh}$$

TABLA N° 24: RESULTADOS DE VELOCIDAD ESPECÍFICA DE PRODUCCION DE VITAMINA

Tiempo (h)	Concentración (g/L)	qp(g/Lh)
0	0.0039	0
24	0.0060	3.5E-05
48	0.0060	1.5E-05
72	0.0056	7.1E-06
96	0.0082	6.8E-06
120	0.0112	3.2E-06
144	0.0082	1.5E-06
168	0.0086	2.0E-06

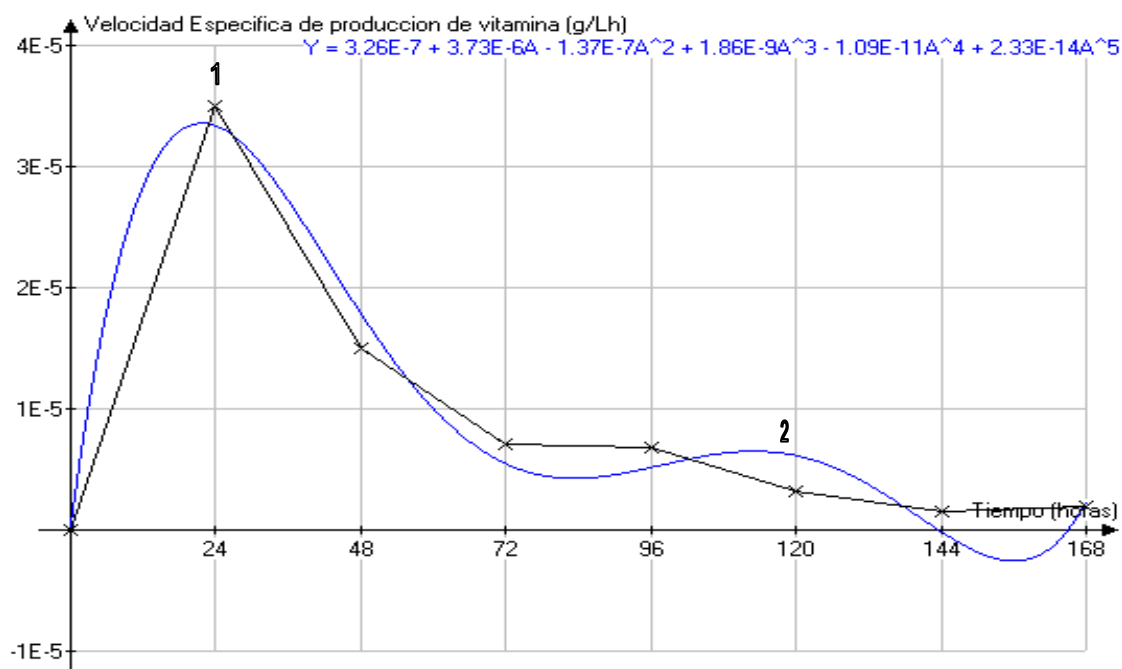


Fig. N° 24: Curva de Velocidad Específica de Producción de Vitamina (g/Lh) Vrs Tiempo (horas) para la producción de vitamina B₁₂

- 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. Se puede observar que a las 24 horas se alcanza el máximo valor de velocidad específica el cual es de pendiente de la utilización de lactosa presente a partir de 24 horas hasta la 120 horas la velocidad específica disminuye hasta entrar en la fase estacionaria de 120 a 168 horas

5.10 RENDIMIENTO EN EL CULTIVO ⁽¹¹⁾

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

Donde:

$Y_{P/S}$: gramos de vitamina B₁₂/ gramos de sustrato consumido

dp : gramos de vitamina B₁₂

ds : gramos de sustrato consumido

Ejemplo: para un t = 24

$$Y_{p/s} = \frac{(0.006 - 0.0039)}{-(0.077 - 0.065)}$$

$Y_{p/s} = -0.18$ gramos de producto/gramos de sustrato consumido

TABLA N° 25: RESULTADOS DE RENDIMIENTO DE VITAMINA B₁₂ EN EL MEDIO DE FERMENTACION

Tiempo (h)	g de producto /g de sustrato consumido	g/L de producto (dp)	g/L de sustrato (ds)
0	0.00	0.000	0.00
24	-0.18	0.00210	0.012
48	-2.10	0.00210	0.001
72	0.24	0.00170	-0.007
96	0.61	0.00430	-0.007
120	1.83	0.00730	-0.004
144	1.43	0.00430	-0.003
168	-0.39	0.00470	0.012

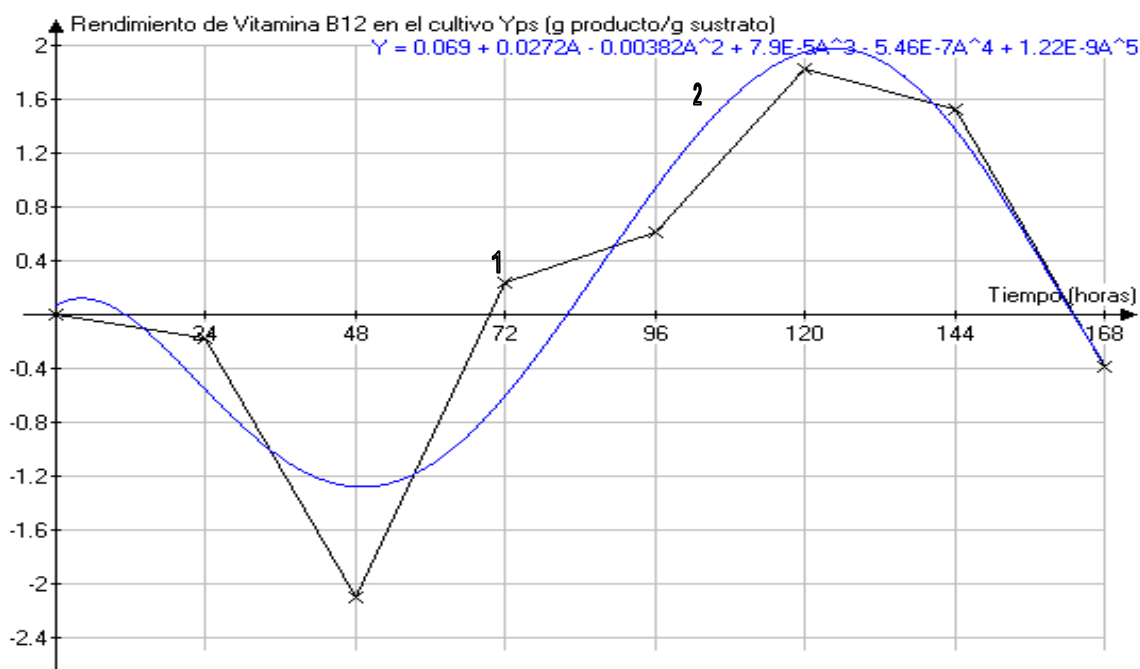


Figura N° 25: Curva de rendimiento de producción de vitamina B₁₂ en el cultivo Vrs Tiempo (horas)

- Curva N° 1 es el resultado obtenido a través de la aplicación de la fórmula de rendimiento en el cultivo a datos experimentales.
- Curva N° 2 se obtiene aplicando el método de regresión polinomial a los resultados obtenidos experimentalmente

En la Fig 25 Se observa la relación que existe en cuanto a formación de producto y el consumo de sustrato. En la primeras 48 horas del proceso fermentativo la cantidad de sustrato final es superior a la cantidad de sustrato inicial lo que denota un alta actividad de consumo de lactosa por parte del microorganismo generando valores de rendimiento negativo a partir de las 48 horas la producción de vitamina es mayor con relación a la cantidad de sustrato que se esta consumiendo manteniéndose esta tendencia hasta las 144 horas aproximadamente

TABLA N° 26: RESULTADOS DE pH DURANTE EL PROCESO DE PRODUCCION DE VITAMINA B₁₂ (ANEXO 9)

Nº Muestra	Tiempo (horas)	pH en B
1	0	7.2
2	24	6.8
3	48	6.5
4	72	6.3
5	96	7.1
6	120	7.2
7	144	7.8
8	168	5.3

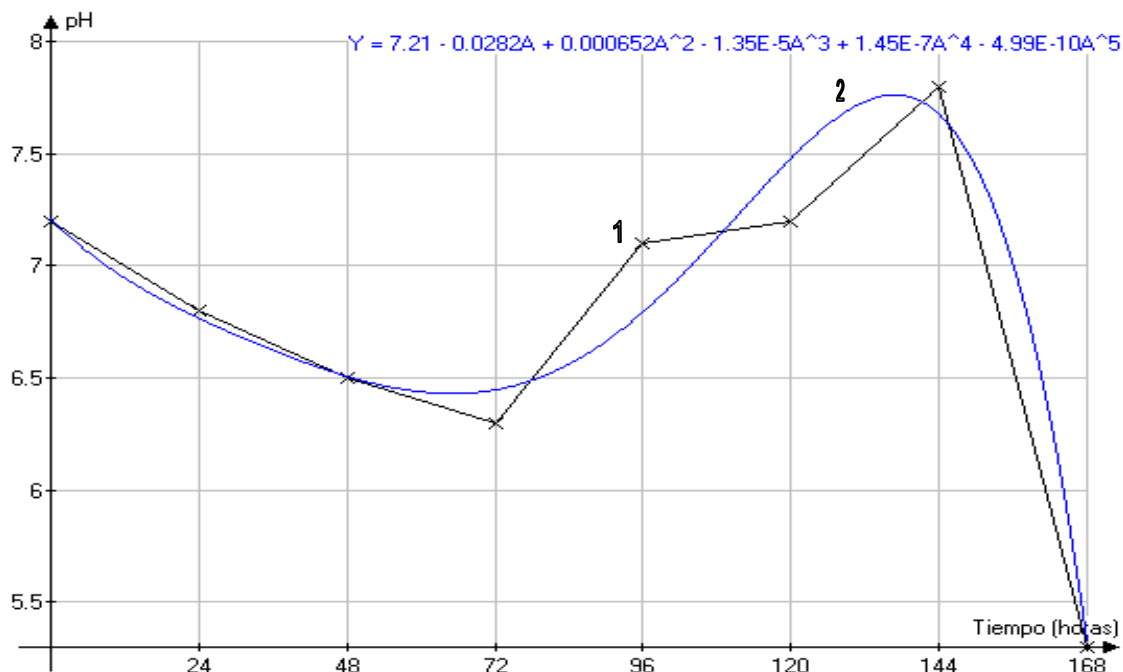


Fig. N° 26: Curva de pH Vrs Tiempo (horas) para la producción de Vitamina B₁₂.

- Curva N° 1 es el resultado obtenido de datos experimentales
- Curva N° 2 se obtiene aplicando el método de regresión polinomial a los resultados obtenidos experimentalmente

La Figura N° 26 muestra el comportamiento de pH respecto al Tiempo durante el proceso cinético de obtención de vitamina B₁₂ los valores de pH durante la etapa de anaerobiosis tienden a disminuir hasta alcanzar las 72 horas tiempo en el cual el pH no es el óptimo para el proceso fermentativo a partir de este tiempo el pH es regulado con hidróxido de amonio 5N hasta alcanzar valores aceptados dentro del rango de crecimiento de la bacteria que es de 6.5 a 7.5 al alcanzar la fase estacionaria el pH se eleva para luego presentar un descenso en la etapa de muerte de la bacteria.

TABLA N° 27: RESULTADOS DE GRADOS BRIX DURANTE EL PROCESO DE PRODUCCION DE VITAMINA B₁₂ (ANEXO 10)

N° Muestra	Tiempo (horas)	Grados Brix
1	0	6.6
2	24	6.1
3	48	5.2
4	72	5.3
5	96	5.9
6	120	5.8
7	144	6.9
8	168	6.3

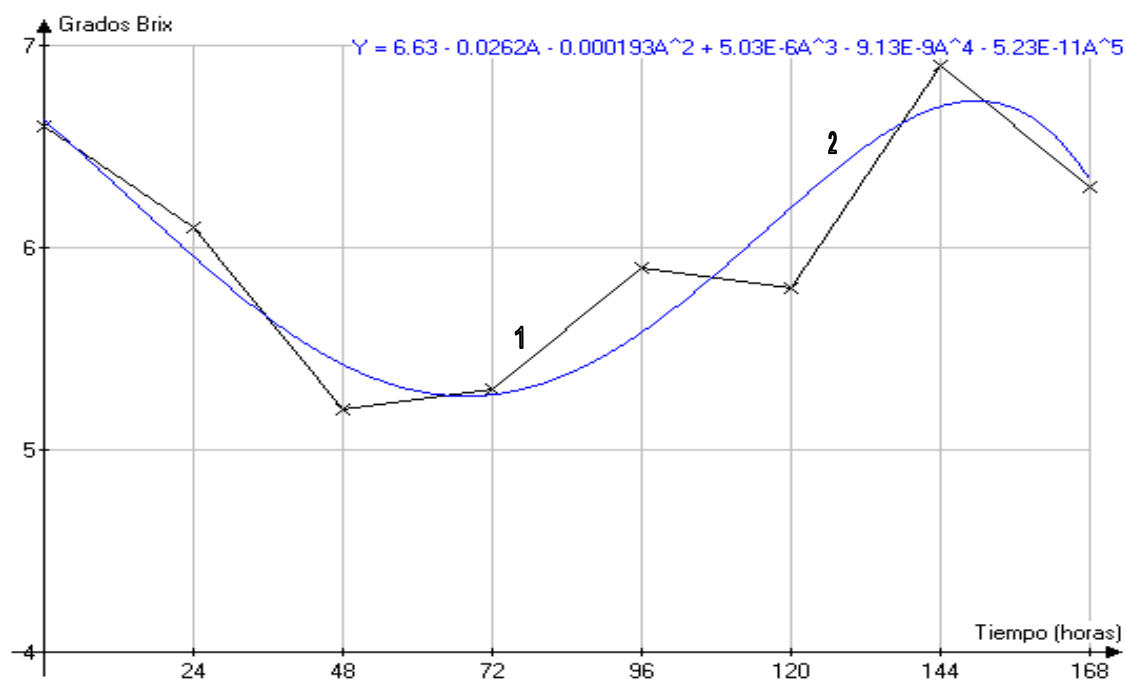


Fig. N° 27: Curva de Grados Brix Vrs Tiempo (horas) para la producción de Vitamina B₁₂

- Curva N° 1 es el resultado obtenido al tomar los grados Brix a muestras experimentales
- Curva N° 2 se obtiene aplicando el método de regresión polinomial a los resultados obtenidos experimentalmente

La Figura N° 27 muestra el comportamiento de Grados Brix respecto al Tiempo durante el proceso cinético de obtención de vitamina B₁₂ los grados brix representan la cantidad de azúcares o sólidos presentes en el medio de fermentación los cuales se ven disminuidos durante las primeras 48 horas de fermentación a partir de este tiempo se ven incrementados y en el momento en el que se alcanza la mayor concentración de vitamina estos se ven notablemente disminuido.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. La cinética de fermentación que se presenta en este trabajo es compleja. Debido a la composición del medio de fermentación ya que el microorganismo por medio de su metabolismo degrada primero los carbohidratos de estructura más compleja para seguir luego con los de estructura más simple (glucosa) este fenómeno se manifiesta en los diferentes cambios de concentraciones de azúcar durante el proceso fermentativo.
2. El suero de leche de vaca obtenido por procesos artesanales ofrece ventajas como obtenerse en grandes cantidades a bajo costo además de contener lactosa, sales minerales, proteínas, vitaminas lo que lo vuelve un residuo agroindustrial de interés que debe aprovecharse en procesos fermentativos para la obtención de vitamina B₁₂ evitando de esta manera la pérdida de elementos constitutivos con alto valor nutricional cuyo mal manejo provocarían un daño al medio ambiente por su alta Demanda Química de Oxígeno.
3. El extracto de levadura es un componente indispensable en el medio de Fermentación y debe de ir a en relación de 1,5 gramos de extracto de levadura por cada litro de medio de fermentación lo cual ayuda a favorecer el crecimiento celular y la obtención de vitamina B₁₂.

4. La utilización de la cepa *Propionibacterium freudenreichii* y el medio de fermentación B nos da resultados favorables en la obtención de vitamina B₁₂ alcanzando concentraciones máximas de 11,2(mg/L) de vitamina B₁₂ sin purificar a las 120 horas de fermentación en un medio como lo es el suero de leche a través de un cultivo por lotes que involucra dos etapas de fermentación con una duración total de siete días.
5. La investigación realizada en cuanto a cinética nos muestra un comportamiento cinético de biomasa, de consumo de nutrientes (glucosa) y formación de producto (Vitamina B₁₂) propio de la cepa *Propionibacterium freudenreichii* en un medio de cultivo complejo como lo es el suero de leche el cual puede ser sometido a variaciones en su composición cuya finalidad específica sea mejorar el rendimiento en la obtención de vitamina B₁₂.
6. El proceso cinético de obtención de vitamina B₁₂ se lleva a cabo favorablemente en una fermentación que involucra dos etapas, la primera de anaerobiosis la cual no debe sobrepasar las 72 horas para evitar la muerte celular del microorganismo y la segunda de aerobiosis que debe durar 96 horas para la obtención de un buen rendimiento de vitamina B₁₂ y multiplicación del microorganismo.

7. Es necesario que durante todo el proceso fermentativo de producción de vitamina B₁₂ el pH se mantenga dentro del rango óptimo de crecimiento celular el cual es 6.5-7.5 esto con el fin de favorecer la producción de vitamina B₁₂

8. Por cada litro de suero lácteo utilizado en el proceso de fermentación se obtienen 11.2 mg de vitamina B₁₂ sin purificar a las 120 horas de iniciado la fermentación para lo cual es necesario intervención de la fase de anaerobiosis que debe durar 72 horas la cual favorece el crecimiento celular y la fase de aerobiosis que debe durar 96 horas para lograr alcanzar la concentración óptima de vitamina B₁₂

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Que la etapa de crecimiento y propagación de la cepa ***Propionibacterium freudenreichii*** a partir del liofilizado debe de hacerse bajo cabina de Flujo laminar con filtros que garanticen esterilidad para evitar la contaminación de la cepa.
2. Utilizar un gas comprimido inerte como lo es el nitrógeno para generar la condición. de anaerobiosis
3. Que el sustrato a utilizar en la fermentación como lo es el suero de leche de vaca debe ser sometido a un proceso apropiado que permita la mayor eliminación de caseína y grasa presente para evitar que éste interfiera en la determinación cinética microbiana de biomasa.
4. Realizar monitoreos microbiológicos ambientales que permitan conocer la carga microbiana del área de trabajo y así poder evitar posibles fuentes de contaminación

5. Que para cada nuevo proceso de fermentación en la obtención de vitamina B₁₂ debe usarse un inóculo reciente de cepa ***Propionibacterium freudenreichii*** que reúna condiciones óptimas de crecimiento y pureza la cual debe de evaluarse al microscopio de manera periódica.
6. Que durante todo el ensayo cinético de fermentación para obtención de vitamina B₁₂ los Biorreactores deben permanecer en constante agitación y protegidos de la luz (matraz ámbar) para evitar la descomposición de la vitamina y obtención de bajos rendimientos en la producción.
7. Sustituir el agua de cocimiento de maíz por los sólidos macerados de maíz para mejorar el rendimiento en la producción de vitamina B₁₂ y evitar dificultades en la determinación de biomasa y pH
8. Hacer uso de un biorreactor que permita controlar de manera más eficiente los parámetros de anaerobiosis, pH, temperatura y agitación, lo cual vendrá a mejorar notablemente el rendimiento en la obtención de vitamina B₁₂.

BIBLIOGRAFIA

1. Asunción, MCB.1986. Estudio de producción de vitamina B₁₂ por fermentación de desechos de la industrialización de la piña.Tesis para optar al grado de maestría en Biotecnología, México Universidad Nacional Autónoma.
2. Brock, TD. 1982 Microbiología. 6 ed.University of Wisconsin USA. Trad. MC Mondragón 89-115p
3. Cabello, VA. 1989. Microbiología Industrial.1^{ra}.edición: Manual de laboratorio de Microbiología Industrial. Editorial Acribia, S.A.
4. Gonzáles, F y otros. Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos Secretaria de Salud*.Farmacopea NACIONAL DE MEXICO. 7ed.Edición México DF tomo I 332- 333p
5. Jagnow, G y otros.1991 Biotecnología; producción con experimentos modelo.Editorial Acribia S.A., Zaragoza España. Trad. MO López 144-149p
6. Kirk, RE y otros 1966 Enciclopedia de tecnología química. Editorial Hispano- Americana México Trad ingles.OG Garrea tomo XVI 128,163, 168-171, 172,174p
7. Kirk, RE y otros 2001 Enciclopedia de tecnología química. Editorial Limusa México DF Trad. OA Canales 1448-1449 p
8. Madigan, M. y otros C1993 Microbiología., 6 ed. Editorial Hispanoamericana S.A .México DF. Trad MC mondragón 848-851p

9. Martínez, CGE y otros. 1999 Comparación de métodos para la extracción de lactosa a nivel piloto a partir de suero lácteo. Trabajo de graduación Lic. Qca. El Salvador, Universidad de El Salvador 16-29 p
10. Ministerio de Economía de El Salvador. Dirección de Comercio e Inversión. Departamento de Información comercial .Diario oficial del órgano ejecutivo. sistema arancelario CA SAC 2002.
11. Scragg, A 1996. Biotecnología para ingenieros sistemas biológicos en procesos tecnológicos. 1^{ra}. edición Editorial Limusa México. Trad. L Huerta 191-197p
12. THE PHARMACOPEIA OF JAPAN. Eighth edition, part 1, 1971 english Edition. Ministry of Health and Welfare. 176-177p
13. Vicente, AM. 1996 Curso de industrias lácteas IRAGRA, S.A. Madrid, España. 263-271p
14. Wulf, G y otros Biotecnología manual de microbiología industrial. 1^{ra}. edición. Editorial Acribia S.A. Zaragoza España. Trad. PL Padin 249-253p
15. <http://www.monografias.com/trabajos11/lasvitam/lasvitam>.
16. <http://nostoc.usal.es/sefin/MI/tema18MI.html>
17. www.fquim.unam.mx/sitio/sbiblio_04c
18. [Tania Cuadra<tecz@ xanum.uam.mx>](mailto:TaniaCuadra@xanum.uam.mx)

ANEXOS

ANEXO N^o1

**Cuadro N^o 3: SERVICIO DE APOYO AL COMERCIO EXTERIOR
DEPARTAMENTO DE INFORMACION COMERCIAL
IMPORTACION ACUMULADA DE VITAMINA B₁₂ Y
DERIVADOS EL SALVADOR 2005**

País importado de B ₁₂	Costo en dólares	Peso en kilogramos
Canadá	1,112	113
Estados Unidos	815	20
México	946	25
Guatemala	38,080	27
Honduras	1,087	7
Costa Rica	12,705	1,189
Colombia	6	1
Chile	2	
Dinamarca	3,625	25
España	365	26
Francia	150,702	135
Italia	24,305	34
Inglaterra	75	
Suiza	100,246	81
	70,750	364
Total	404,821	2,047

ANEXO N° 2

PREPARACIÓN DEL MEDIO 33 AGAR JUGO DE TOMATE

Pasó uno: obtención del jugo de tomate filtrado

seleccionar tomates de jugo sanos en cantidad suficiente para obtener un volumen de 200mL de jugo, lavarlos y cortarlos en trozos higiénicamente, licuarlos sin agua y filtrarlo; tomar pH y de ser necesario ajustar el pH a 7.0 con NaOH 5N ya teniendo listo el jugo proceder a preparar el medio ATCC.33

a)-pesar los tres primeros ingredientes de manera individual Tryptona 10.0g, extracto de levadura 10.0g, jugo de tomate filtrado 200.00mL

b)-al filtrado del jugo de tomate incorporar Tryptona luego extracto de levadura ayudándonos de un agitador magnético para mezclar hasta que se disuelven; seguido agregar agua para completar solución en cantidad suficiente.

c)-ya disuelto llevar a volumen, y ajustar el pH a 7.3 posteriormente dispensar en matraces de 125 mL y esterilizar a 15 Lbs 121°C durante 15 minutos en contenedores tapados con torunda de algodón; y por aparte poner erlenmeyers de 125 mL tapados con aluminio y dos tubos con tapón de rosca ya todo estéril ir a campana, dispensar de 100 a 115mL de medio en cada erlenmeyer de 125mL y poner en olla hermética para eliminar con ayuda de una vela encendida el aire contenido en el medio dispensar lo que sobró en los tubos con tapón de rosca verificar el pH a temperatura ambiente de uno de los tubos seguido esterilizar todo nuevamente.

INCORPORACIÓN DE LA CEPA LIOFILIZADA AL MEDIO

1-todo debe realizarse bajo condiciones lo más estériles posible (campana de flujo laminar y mechero de ser posible)

2-abrir la ampolla del liofilizado usando una lima estéril, y agregar con jeringa estéril 1mL. De medio preparada anteriormente (el cual ha sido esterilizado en un tubo aparte y será abierto al aire estéril y sólo servirá para disolver la pastilla).

3-con una jeringa estéril de 3mL. Mezclar, absorbiendo y dispensando en la ampolla es decir agarrando la mitad del jugo tratando de disolver la pastilla.

4-tomar con la jeringa el mililitro entero del medio en donde se ha disuelto la pastilla, e inyectarlo a través de los tubos de caucho en los erlenmeyers para ponerlo a incubar. En condiciones apropiadas de temperatura y agitación (150rpm y 30 °C de 18-24 horas).

De manera alterna se puede trabajar aparte con una parte del mismo medio pero con agar. Es decir hacer unos 100mL de medio igual que el procedimiento hasta tomar el pH antes de esterilizar, agregar 1.5%(p/v) de agar bacteriológico y luego poner a esterilizar. En campana verter el medio en caja de petrí estériles, y después de las 18 o 24 horas tomar con jeringa de cada uno de los erlenmeyers 0.5mL. y sembrar 0.25mL en las cajas crear condiciones de anaerobios e incubar comprobar si existe crecimiento

ANEXO N° 3

MEDIO DE CONSERVACIÓN DE LA CEPA

Dispensar el contenido de 1 de los erlenmeyers en tubos de vidrio agregando un volumen de medio caldo jugo de tomate 33 mas un volumen de glicerol al 40% en cada tubo mezclar y luego cubrir con una pequeña capa de aceite mineral para conservar y guardar en congelación.

ANEXO N° 4

CALIBRACION DE pHMETRO

Examinar los electrodos antes de usarlos observando si presentan el puente salino, previo a su uso, si es necesario, abastecer de solución salina en puente y observar las precauciones indicadas por el fabricante para el instrumento y los electrodos.

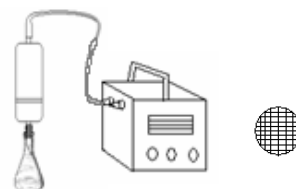
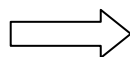
Encender el aparato y dejarlo calentar los suficientes, siguiendo las instrucciones del fabricante. Seleccionar dos soluciones reguladoras, patrón de referencia certificada para calibración, cuya diferencia en pH no exceda de cuatro unidades llenar el recipiente con una de las soluciones reguladoras para calibración, teniendo en cuenta la temperatura a la cual el material de prueba debe ser medido. Colocar el control de temperatura a la de la solución y ajustar el control de calibración hasta hacer que los valores de que hay que observados sean idénticos a los tabulados. Enjuagar los electrodos y los recipientes con varias porciones de la segunda solución

Reguladoras, seleccionada para la calibración. Llenar los recipientes a la misma temperatura a la que el material debe ser medido. El pH de la segunda solución reguladora debe estar dentro de 0.07 unidades de pH del valor tabulados. Si se observa mayor desviación revisar los electrodos y si están afectados, reemplazarlos. Ajustar el control de calibración para hacer que el valor de pH observado sea igual al valor tabulado.

Repetir la calibración hasta que las 2 soluciones reguladoras den valores observados de pH dentro de 0.05 unidades de los valores tabulados, sin más ajuste de los controles.

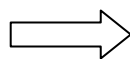
ANEXO N° 5

CUANTIFICACIÓN DE CIANOCOBALAMINA (B₁₂)⁽¹²⁾



1. Tomar 30mL del filtrado obtenido en Biomasa, protegerlo de la luz con papel carbón

2. Filtrar al vacío la muestra utilizando membrana millipore de 40 micras.



3. Pesar 30mg de Cianocobalamina USP y disolver en un frasco volumétrico hasta obtener una concentración de 30µg/mL

4. Determinar la absorbancia de ambas soluciones en Spectronic 20 a 361nm usando celdas de un centímetro Usando agua destilada como blanco

Fig. N° 28: Cuantificación de cianocobalamina

Calcular la cantidad, en mg, de $C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$ de Cianocobalamina usando la formula siguiente:

$$C_{Mx} = \left(\frac{A_{Mx}}{A_{St}} \right) C_{St}$$

En donde C_{Mx} es la concentración en mg por mL, de USP Cianocobalamina en la solución estándar y A_{Mx} y A_{St} son las absorbancia de la solución de Cianocobalamina y de la solución estándar, respectivamente.

ANEXO N° 6

FROTIS DE CEPA "*Propionibacterium freudenreichii*"

Fotografía de cepa *Propionibacterium freudenreichii* vista al microscopio 100x en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Química y Farmacia Universidad de El Salvador.

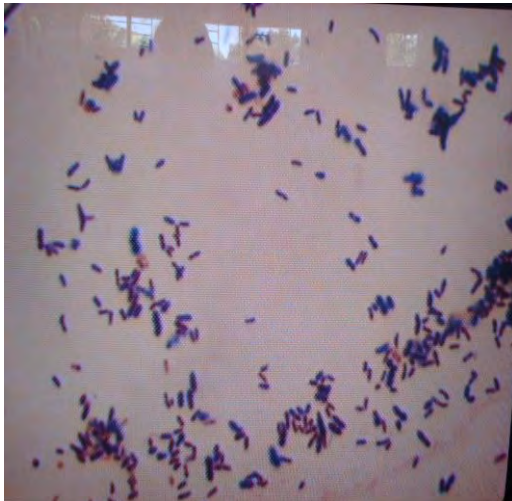
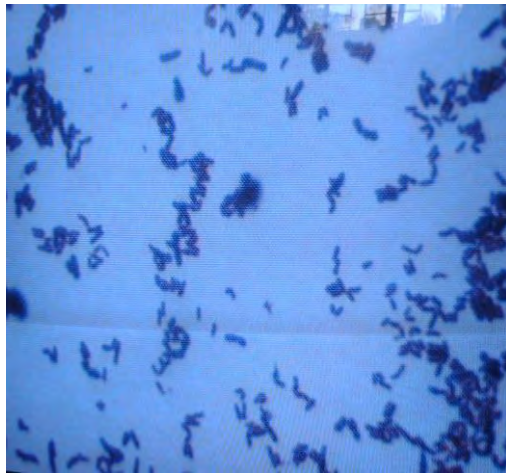


Fig. N° 29: Frotis de Cepa *Propionibacterium freudenreichii*

ANEXO N^o 7

TABLA 28: PROCEDIMIENTO PARA CALCULAR BIOMASA POR MÉTODO DE PESO SECO ENSAYO B

Tiempo (h)	Peso del papel sin Mx A	Peso de papel con Mx B	(B-A) en g	Biomasa en mg/ml
0	1.0563	1.1463	0.09	1.8
24	0.8699	0.9842	0.1143	2.286
48	1.0441	1.1793	0.1352	2.704
72	1.2219	1.4015	0.1796	3.592
96	1.2144	1.5915	0.3771	7.542
120	1.2711	2.3753	1.1042	22.084
144	1.2081	2.2443	1.0362	20.724
168	1.2801	1.9272	0.6471	12.942

Cálculos para la Biomasa en g/L

$$\frac{0.09\text{g}}{X\text{g}} = \frac{50\text{ mL}}{1000\text{ mL}}$$

$$X\text{g} = 1.8\text{ g/L}$$

TABLA 29: PROCEDIMIENTO PARA CALCULAR BIOMASA POR MÉTODO DE PESO SECO ENSAYO B₁

Tiempo (h)	Peso del papel sin Mx A	Peso de papel con Mx B	(B-A) en g	Biomasa en mg/ml
0	1.1102	1.6030	0.07	1.4
24	1.2992	1.4342	0.1350	2.7
48	1.3512	1.5048	0.1536	3.1
72	1.3552	1.5169	0.1617	3.2
96	1.8732	2.1535	0.2803	5.6
120	1.6392	2.4562	0.8170	16.3
144	1.5264	2.4914	0.9650	19.3
168	1.6584	2.4414	0.7830	15.7

Cálculos para la Biomasa en g/L.

$$Xg = \frac{0.07g}{50 \text{ mL}} \times 1000 \text{ mL}$$

$$Xg = 1.4 \text{ g/L}$$

TABLA 30: PROMEDIO DE BIOMASA ENSAYO B Y B₁

Nº de Mx	Tiempo (horas)	Biomasa en mg/ml	Biomasa en mg/ml	Promedio de Biomasa	Ln Promedio de Biomasa
1	0	1.8	1.4	1.60	0.47
2	24	2.286	2.7	2.49	0.91
3	48	2.704	3.1	2.90	1.06
4	72	3.6	3.2	3.40	1.22
5	96	7.542	5.6	6.57	1.88
6	120	22.084	16.3	19.19	2.95
7	144	20.724	19.3	20.01	2.99
8	168	12.942	15.7	14.32	2.66

ANEXO N° 8

TABLA 31: PROMEDIO DE ABSORBANCIA EN DETERMINACION DE AZUCARES POR EL METODO FENOL-SULFURICO EN ENSAYOS B y B₁

N° de muestras	Tiempo (h)	Absorbancia de B $\lambda=490\text{nm}$	Absorbancia de B ₁ $\lambda=490\text{nm}$	Promedio de Absorbancia
1	0	0.027	0.029	0.028
2	24	0.046	0.048	0.047
3	48	0.022	0.025	0.023
4	72	0.025	0.023	0.024
5	96	0.028	0.025	0.026
6	120	0.016	0.018	0.017
7	144	0.034	0.031	0.032
8	168	0.045	0.048	0.046

ANEXO N° 9

TABLA 32: PROMEDIO DE pH EN ENSAYOS B Y B₁

N° de muestras	Tiempo (h)	pH en B	pH en B1	Promedio de pH
1	0	7.2	7.2	7.2
2	24	6.9	6.7	6.8
3	48	6.5	6.4	6.45
4	72	6.4	6.3	6.35
5	96	7.3	6.9	7.1
6	120	7.1	7.3	7.2
7	144	7.7	7.9	7.8
8	168	5.3	5.3	5.3

ANEXO N° 10

TABLA 33: PROMEDIO DE GRADOS BRIX EN ENSAYOS B y B₁

N° de muestras	Tiempo (h)	Brix en B	Brix en B1	Promedio de Grados Brix
1	0	6.8	6.4	6.6
2	24	6.0	6.2	6.1
3	48	5.2	5.2	5.2
4	72	5.2	5.4	5.3
5	96	6.0	5.8	5.9
6	120	6.2	5.4	5.8
7	144	7.0	6.8	6.9
8	168	6.4	6.2	6.3

ANEXO N° 11

CONDICIONES DE ANAEROBIOSIS

Seguidamente se le crearán condiciones de anaerobiosis para cada erlenmeyer por separado con la ayuda de un baño de María que es previamente lavado con agua estéril y luego desinfectado con alcohol isopropílico. Al baño de María se le adiciona un volumen suficiente de agua destilada para luego introducir una gradilla también desinfectada seguido se le coloca una vela encendida y por ultimo se procede a colocar sobre la gradilla el biorreactor debidamente tapado el cual se sujeta con ambas manos mientras otra persona cierra herméticamente el sistema creado con la ayuda de un recipiente plástico basándose en el principio físico de consumo de oxígeno como producto mismo de la combustión.

ANEXO N⁰ 12

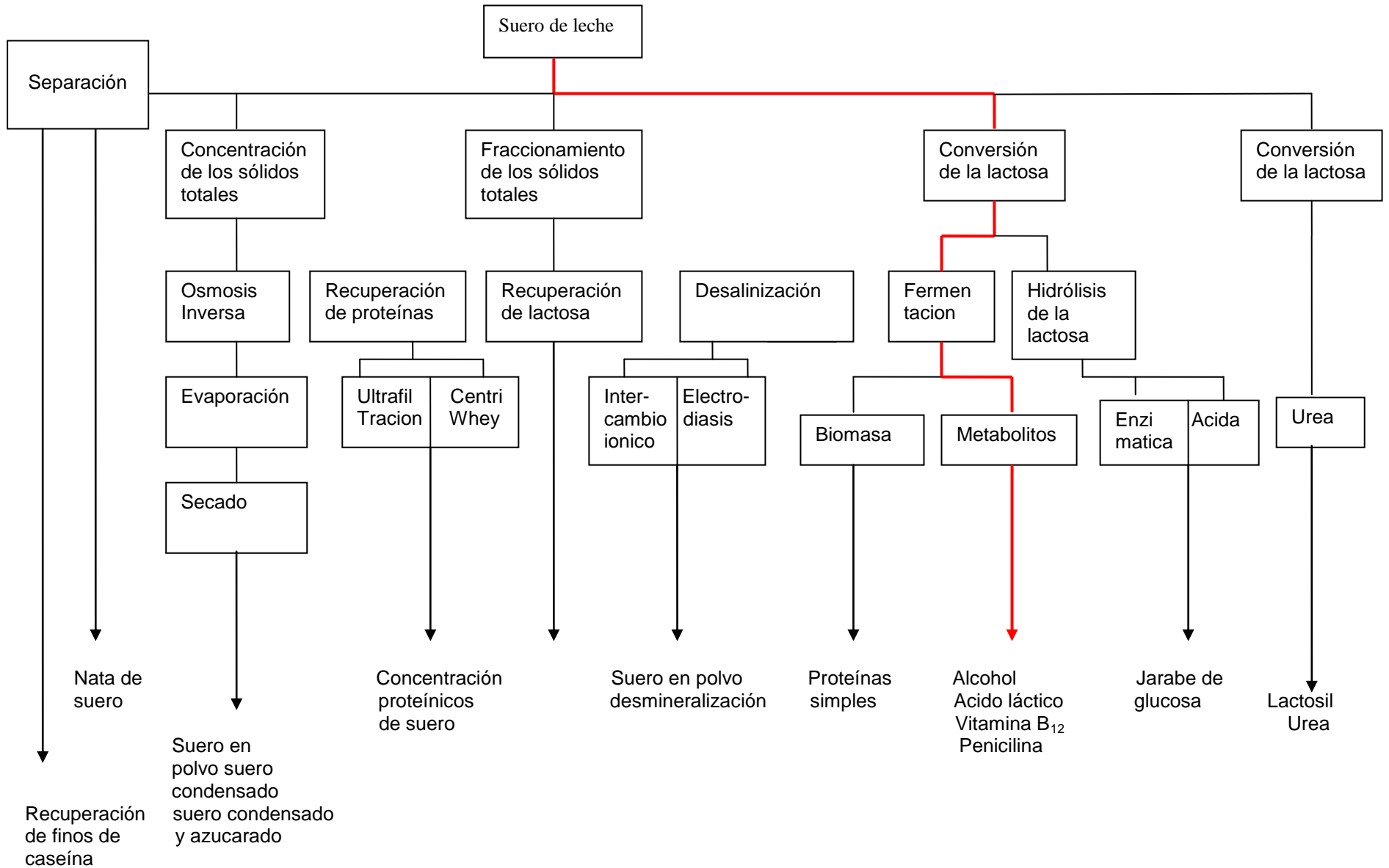


Fig. N° 1: APROVECHAMIENTO DEL SUERO DE QUESO