

Ministerio de Educación y Justicia
de la Nación

Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Química y Farmacia

Obtención de Vitamina B₁₂
por fermentación

por

Susana Esther Ardana

1956

III - 157

23354

385 (2)

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Biblioteca
50 y 115 1° subsuelo
biblioteca@exactas.unlp.edu.ar
Tel 0221 422-6977/79 int. 129



DEX-23354

MINISTERIO DE EDUCACION DE LA NACION

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

"OBTENCION DE VITAMINA B₁₂ POR FERMENTACION"

Por

Susana Esther Ardanaz Otaño

1956

Trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor en Química,
realizado en el Instituto de Fermentaciones Industriales de la
Cátedra de Industrias Químico-Farmacéuticas de la Facultad de Quí-
mica y Farmacia de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la
dirección del Profesor Doctor Zenón Mariano LUGONES.-

S U M A R I O

I.- MONOGRAFIA

- Capítulo I: Historia de la Vitamina B₁₂.
- Capítulo II: Origen y distribución.
- Capítulo III: El grupo de las Vitaminas B₁₂.
- Capítulo IV: Propiedades y estructura química.
- Capítulo V: Métodos de obtención.
- Capítulo VI: Obtención por fermentación.
- Capítulo VII: Métodos de valoración.

II.- PARTE EXPERIMENTAL

Sistemas de fermentación empleados. Descripción.

Selección de cepas productoras.

Selección de medios de germinación.

Fermentación por cultivo en superficie:

Selección de medios de fermentación.

Variables introducidas en el estudio de los rendimientos:

- 1) Fuente de Carbono.
- 2) Fuente de Nitrógeno.
- 3) Fuente de factores minerales y accesorios.

Fermentación sumergida:

Selección de medios de fermentación.

Variables introducidas en el estudio de los rendimientos:

Fuente de Nitrógeno.

Valoración microbiológica de la Vitamina B₁₂.

Técnicas de preparación y análisis correspondientes a las sustancias empleadas como fuente de nitrógeno, de factores minerales y accesorios.

III.- RESUMEN Y CONCLUSIONES

IV.- BIBLIOGRAFIA

I - M O N O G R A F I A

CAPITULO PRIMERO

HISTORIA DE LA VITAMINA B 12

HISTORIA

George R. MINOT y William P. MURPHY descubrieron en 1926 que la enfermedad descrita por COMBE de Edimburgo en 1822, reconocida como una entidad nosológica por ADDISON en 1849, y llamada anemia perniciosa por BIERMER podía tratarse terapéuticamente con hígado íntegro. Esto abrió un nuevo capítulo en la investigación sobre nutrición. (Más tarde CASTLE logró los mismos resultados con carne de res y jugo gástrico normal)

Poco después de este descubrimiento, que les valiera a MINOT, MURPHY y George WHIPPLE el premio NOBEL en 1934, varios grupos de investigadores empezaron a fraccionar extractos de hígado para purificar el principio activo en la terapéutica de la anemia perniciosa.

COHN, MINOT y colaboradores, en un trabajo que abarco desde 1927 a 1930 aproximadamente, aislaron del hígado la fracción antianémica (fracción G), para ello hicieron una extracción del hígado con agua ligeramente ácida, eliminaron parcialmente las proteínas y impurezas con alcohol hasta obtener una graduación del 70% y una vez concentrada la solución alcohólica precipitaron la fracción antianémica por el agregado de alcohol. Asignaron a esa fracción una estructura aminada. En sus mediciones de los preparados antianémicos usaron la fórmula reticulocitaria como método de contralor.

En 1936 WEST, DAKIN y UNGLEY estudiaron el fraccionamiento durante un período más largo, describiendo una técnica de purificación muy avanzada, contralorada biológicamente, y afirmaron que aquella fracción era de naturaleza polipeptídica. En sus trabajos emplearon la precipitación alcohólica en presencia de sales de calcio y demostraron que el principio activo es precipitable en forma de sal de Reinecke con acetato de uranio, por el sulfato de amonio o de magnesio de sus soluciones neutras, y por el cloruro de sodio de sus soluciones ácidas. Lograron obtener concentrados potentes.

Otros investigadores fueron: LALAND, KLEM, STRANDELL y colaboradores (1935-36), WILKINSON (1932-40) y KARRER y colaboradores (1937-38). Los primeros informaron que el principio antianémico podía extra-

erse de sus soluciones acuosas con fenol líquido, adsorberse con carbón activo y eluirse con fenol líquido. Luego, haciendo un fraccionamiento con sulfato de amonio y varios solventes obtuvieron un concentrado amarillo rojizo, clínicamente activo en dosis de 1 mg. Este trabajo fué confirmado por las investigaciones recientes.

SUBBAROW y JACOBSON informaron acerca de sus primeros estudios durante 1935-38. El primero continuó sus trabajos emitiendo una hipótesis acerca de un factor múltiple.

Castle y sus colaboradores se interesaron más en el factor existente en el músculo de bovino y el efecto del jugo gástrico sobre la actividad de este factor, es decir, el factor extrínseco y el factor intrínseco. Según la teoría de CASTLE, enunciada en 1929, "se distingue un factor intrínseco o hemogenasa, de origen gastro duodenal, que actúa sobre un factor extrínseco o hemógeno, alimenticio, para dar nacimiento al principio antipernicioso acumulado ulteriormente en el hígado". La inactividad de la Vitamina B₁₂ solamente por vía oral, opuesta a su actividad si el jugo gástrico humano está asociado, ha conducido a CASTLE a sacar como consecuencia la identidad o casi identidad de la Vitamina B₁₂ y el factor extrínseco.

Esta teoría de CASTLE ha provocado objeciones pues el hígado contiene no solamente el principio antipernicioso, sino también factor extrínseco no transformado; pero si no se toma en el sentido literal la palabra extrínseco la teoría conserva su valor.

Fué tal la influencia de esta hipótesis sobre quienes estudiaban la terapéutica de la anemia perniciosa, que los trabajos de investigación se dirigieron casi exclusivamente a la búsqueda e identificación de los dos factores citados. (Veinticinco años después CASTLE asistió a la confirmación de su hipótesis y continuó sus trabajos con el objeto de demostrar experimentalmente la veracidad de su teoría).

Llamó la atención a los investigadores (DAKIN entre otros) la lentitud de los progresos en las investigaciones químicas de las sustancias hematopoyéticas, lentitud que se debió a la falta de un método rápido y seguro para poder medir la actividad de las distintas fracciones que se pueden obtener y la gran actividad terapéutica del

principio antianémico.

Las primeras mediciones se realizaron utilizando enfermos de anemia perniciosa que no hubieran sido sometidos a otros tratamientos para combatirla, cuyo número es escaso y el método involucraba cierto peligro para el paciente al probar fracciones inactivas. En los métodos biológicos usando animales de laboratorio se recurrió a :

1) Animales normales (medida de la reticulocitosis en cobayos y ratas, recuento de eosinófilos en cobayos, determinación del aumento de peso en pollos, etc).

2) Animales anemizados, ya sea por administración de tóxicos, por infecciones o por déficit alimenticio.

Pero a pesar de los ensayos realizados con animales, no se pudo sustituir la unidad clínica determinada en enfermos con anemia perniciosa pues no se conoce ningún animal de laboratorio que padezca como el hombre de anemia perniciosa, o en el que se pueda provocar una anemia experimental.

Finalmente, otros investigadores buscaron el principio anti-anémico del hígado mediante el estudio de los factores necesarios para el crecimiento de microorganismos en determinados medios de cultivo iniciando en esta forma la valoración microbiológica de Vitaminas.

Así, en 1939, SNELL y PETERSON descubrieron un factor indispensable para el desarrollo del *Lactobacillus casei*, del *Streptococcus lactis R* y *Streptococcus faecalis*.

En 1941, STOKSTAD y colaboradores informaron acerca de un factor necesario para el desarrollo del *Lactobacillus casei*, y lo denominaron "Factor *Lactobacillus casei*".

En 1942, MITCHELL, SNELL y WILLIAMS obtuvieron, a partir de un concentrado de espinacas, un compuesto cristalino activo para el crecimiento del *Lactobacillus casei* y del *Streptococcus lactis R* y lo llamaron ácido fólico.

En 1943 PFIFFER, BRINKLEY y BROWN aislaron del hígado un factor antianémico para el pollo y activo para el crecimiento del *Lactobacillus casei* y del *Streptococcus lactis R*.

En 1945 ANGLER y colaboradores realizaron la síntesis y aislamiento del ácido fólico y establecieron su estructura (ácido pteroil-glutámico). Con el aislamiento del ácido fólico pareció lograrse la se-

paración del factor antipernicioso del hígado, pero los clínicos reconocieron rápidamente que el ácido fólico está lejos de presentar toda la actividad terapéutica de los extractos de hígado; su acción es mucho más lenta, no actúa contra los síntomas neurológicos de la enfermedad de ADDISON-BIERMER. La identificación del ácido fólico como principio antianémico del hígado no pudo mantenerse, y el problema debió reconsiderarse.

En 1947, MARY SHORB, bacterióloga de la Universidad de MARYLAND (E.E.U.U.) demostró la presencia, en el tejido hepático, de un factor necesario para el desarrollo del *Lactobacillus lactis* DORNER, el factor L.L.D. Este factor está contenido, aunque en menores proporciones, en la levadura, pepsina, peptona, leche peptonizada, etc.

Las investigaciones realizadas inmediatamente pusieron en evidencia un paralelismo entre la actividad antianémica de los extractos de hígado y su efecto sobre el crecimiento del L.L.D., lo que sugirió que el factor L.L.D. es el principio del hígado activo contra la anemia perniciosa. En posesión de estos datos, los bioquímicos pudieron retomar el fraccionamiento de los extractos hepáticos sobre bases nuevas.

En 1948, RICKES, BRINCK, KONIUSZY, WOOD y FOLKERS, de los Laboratorios MERCK, en E.E.U.U. aislaron del hígado el factor L.L.D. cristalizado y lo llamaron Vitamina B₁₂ en razón de sus afinidades con el complejo B. Algunos días más tarde, L. SMITH y PARKER de GLAXO HOUSE en Gran Bretaña, guiados únicamente por los ensayos clínicos de UNGLEY sobre los biermerianos, aislaron de una preparación de hígado por cromatografía, digestión trípica de los concentrados y nueva cromatografía, un pigmento rojo (cristalizable en acetona) activo desde la dosis del µg sobre todas las manifestaciones de la anemia de BIERMER. Este pigmento ha sido reconocido como idéntico a la Vitamina B₁₂.

Casi inmediatamente después, ELLIS, PETROW y SMOOK, igualmente en Gran Bretaña, publicaron sus trabajos sobre la obtención de una sustancia similar a la de RICKES y SMITH. Estos autores emplearon la extracción repetida por n-butanol del principio antianémico de sus soluciones acuosas en presencia de alta concentración de sulfato de amonio y una adsorción cromatográfica final de la solución por columnas cargadas con bentonita o silicato de aluminio. El producto adsorbido se

cristalizó en acetona acuosa. Los mismos autores hicieron una descripción completa sobre el comportamiento químico de la Vitamina B₁₂ .

En el mismo año, RICKES y colaboradores anunciaron la preparación de Vitamina B₁₂ en gran escala a partir de cultivos de Streptomyces griseus. Demostraron así un origen microbiológico para la vitamina. Consecuencia de este descubrimiento fué que aparecieran una serie de procesos fermentativos para la producción de Vitamina B₁₂ en escala comercial.

Paralelamente, otros científicos buscaban una substancia desconocida esencial para la nutrición, que según observaron, estaba asociada con la capacidad de los animales para asimilar proteínas de escaso valor biológico, y que no se encontraba en los alimentos vegetales.

Al factor se le dió el nombre de "factor de aprovechamiento proteico" o factor proteico animal (A.P.F.) y posteriormente "factor proteico animal complejo", indicando que se trataba de más de una substancia.

Como resultado de los trabajos de MAFSON (1932-33), BYERLY y colaboradores (1933), GARY y HARTMAN (1941), BIRD y colaboradores (1946), RUBIN y colaboradores (1946), ZUCKER y ZUCKER (1946), Mc GINNIS y colaboradores (1947), se determinó que el hígado, los extractos de hígado, los solubles de pescado, el estiércol de vaca, la caseína cruda, etc, eran ricos en el factor.

El estiércol de gallina fresco era prácticamente inactivo, mientras que previa incubación desarrollaba gran potencia (Mc GINNIS). Esto mostró que el factor tiene un origen microbiológico, y que su suministro no depende exclusivamente de la alimentación con tejidos animales.

Se sugirió (1947) que podía provocarse una misma deficiencia en aves y mamíferos, ya fuera eliminando un factor de las dietas o suministrando dietas deficientes de por sí (GARY y HARTMAN en 1941, y ZUCKER y ZUCKER respectivamente).

CARY y HARTMAN (1941) tratando caseína cruda con alcohol cáustico extrajeron un factor nutritivo esencial para las ratas. Las sus-

tancias activas eran las mismas para ratas y pollos. La deficiencia provocada a las ratas sometidas a una dieta vegetal desaparecía por el agregado de hígado o caseína cruda, pero no por la levadura de cerveza; esto llevo a ZUCKER y ZUCKER a considerar que su factor era idéntico al de CARY. Esas mismas deficiencias desaparecían suministrando Vitamina B₁₂ cristalina (EMERSON, 1948; OTT y colaboradores, 1948).

Estudios posteriores han determinado que la Vitamina B₁₂ es el componente principal del A.P.F., esencial para el crecimiento así como para la formación de la sangre.-

C A P I T U L O S E G U N D O

O R I G E N Y D I S T R I B U C I O N

ORIGEN Y DISTRIBUCION

La Vitamina B_{12} se encuentra en numerosas sustancias de origen animal o bacteriano.

El hígado y riñon, los sub productos de las pesquerías (especialmente solubles de pescado), el estiércol y rumen de vacas y los cultivos de una variedad de microorganismos son fuentes ricas en Vitaminas B_{12} . Se encuentran menores cantidades en otras carnes, productos lácteos y huevos.

(ver Tablas).

La fuente fundamental de toda la Vitamina B_{12} natural parece ser la actividad microbiana. Los tejidos de animales herbívoros aparentemente obtienen Vitamina B_{12} por absorción de material producido por los microorganismos en el intestino y panzas. El hombre y los animales carnívoros obtienen la mayor parte de la Vitamina B_{12} a partir de los alimentos, pero es posible que algo se produzca por síntesis intestinal.

Con respecto a los vegetales, pareciera que no contienen Vitamina B_{12} en cantidades ponderables. Así, los granos de cereales y otras semillas (soya, algodón, maní, guisante y lino), las papas frescas, zanahorias, habas, repollos, hojas de alfalfa y pasto fresco no contienen cantidades significativas. Los tomates, así como las levaduras también se ben considerarse negativos.

(CARY y HARTMANN, 1947; LEWIS y colaboradores, 1949; ZUCKER y ZUCKER, 1950).

Tal distribución de un factor nutritivo para animales no tiene precedentes. Todas las Vitaminas conocidas o sus precursores se encuentran entre las plantas que el hombre y los animales han elegido para su alimento. Muchos también son producidos por bacterias y levaduras, pero todos se han hallado en las plantas superiores. Aún las Vitaminas C y E, que no se encuentran comúnmente en estas formas vegetales inferiores, están ampliamente distribuidas entre las plantas superiores.

La ausencia de la Vitamina B_{12} en los vegetales superiores levaduras, y la presencia en altas concentraciones en los protozoos del rumen, hizo que ZUCKER y ZUCKER supusieran que sólo los animales necesitaban del factor, no sucediendo así con los vegetales. Descubrió-

ron su error tan pronto se supo que tanto los mohos como las bacterias sintetizan la Vitamina B₁₂ en grandes cantidades.

Trabajando con *Euglena gracilis* se ha demostrado que por lo menos una clase de células que contienen clorofila usan y almacenan Vitamina B₁₂. (Este organismo, a pesar de tener clorofila, ha sido incluido a menudo entre los protozoarios).

HALL (1943) y HUINER (1949) ensayaron el crecimiento de *Euglena gracilis* en medios inorgánicos expuestos a la luz, en ciertos casos con el agregado de Vitamina B₁₂, y observaron que la presencia de ésta estimulaba el crecimiento. Luego, ensayaron en ratas los efectos de *Euglena gracilis* seca proveniente de esos cultivos y observaron que dos terceras partes o más de la Vitamina B₁₂ agregada a los medios de cultivo fué tomada y almacenada en los cuerpos de *Euglena*.

Si la Vitamina B₁₂ tiene significación fisiológica en plantas superiores, debe podérsela encontrar en alguna parte de la planta.

Ha sido imposible hallar Vitamina B₁₂ en semillas, hojas ni frutas, en cambio se ha encontrado cierta actividad en raíces. Las raíces de remolachas, como se ha determinado en ensayos con ratas, contienen aproximadamente 0,04 µg/g (ZUCKER y ZUCKER 1950). Las zanahorias, según CARY y HARTMANN (1947) son inactivas.

El suelo contiene apreciables cantidades de vitamina B₁₂ (STEPHENSON y colaboradores, 1948).

Se discutió la eficacia de algunas fuentes, que en definitiva fueron consideradas negativas. Así CARY y sus colaboradores han considerado a la lechuga, hojas de alfalfa y forrajes como activos en las mismas condiciones en que posteriormente se observó que la vitamina B₁₂ cristalina era activa. BOWLAND y colaboradores (1948) y BETHEIL y colaboradores (1949) trabajando con dietas purificadas - en el segundo caso con la adición de una sustancia activa sobre la glándula tiroides, - informaron que la alfalfa mostraba efectos favorables sobre la reproducción y crecimiento de ratas, pero, al menos en el último caso establecieron que el procedimiento respondía a algo más que a la actividad B₁₂.

Por el contrario, ZUCKER y ZUCKER (1948) han informado sobre

la imposibilidad de encontrar una actividad apreciable en muestras de alfalfa y en pasto fresco.

EMERSON y colaboradores (1949) observaron que la alfalfa era inactiva para ratas.

Mc GINNIS y CARVER (1947) determinaron que una dieta con 15% de alfalfa era ineficaz para gallinas.

En todos estos casos la Vitamina B_{12} dá una respuesta en ratas y pollos, lo cual permite establecer que la alfalfa no es una fuente apreciable de Vitamina B_{12} .

Se ha tratado de explicar esta diferencia en las opiniones diciendo que: 1) Hay otra deficiencia en la dieta de CARY; 2) La alfalfa estimula la síntesis intestinal de la Vitamina B_{12} en las ratas de CARY pero no en ratas y aves que reciben raciones vegetales; 3) Hay pequeñas cantidades de Vitamina B_{12} en la alfalfa, las que llegan a ejercer ciertos efectos en los casos en que el requerimiento de Vitamina B_{12} es muy pequeño.

Otro trabajo que muestra la ausencia de Vitamina B_{12} en la alfalfa es el de BICKOFF y colaboradores (1950). Estos autores indican que los ensayos de crecimiento de pollos con raciones de alfalfa mostraban una respuesta muy pequeña, en cambio los ensayos microbiológicos con *L. leichmannii* sugerían una actividad mayor.

Estos últimos resultados eran erróneos dado que en la alfalfa hay otros factores presentes a los cuales responde el *L. leichmannii*; y que no reemplaza a la Vitamina B_{12} para el crecimiento de pollos.

Así, los ensayos micro biológicos en alfalfa usando *L. leichmannii* dieron valores de Vitamina B_{12} aparente que iban de 50 a 62 PPB (partes por billón) para alfalfa fresca y de 12 a 45 PPB (partes por billón) para harina de alfalfa deshidratada.

Empleando técnicas de ensayo diferencial, tales como la digestión alcalina para destruir la Vitamina B_{12} , el agregado de sal al medio para inhibir la respuesta a la Vitamina B_{12} , y la cromatografía de partición en papel, se determinó que más del 85% de la actividad de la Vitamina B_{12} aparente se debía a otros factores. Esos factores podrían ser desoxi ribósidos naturales, los que han mostrado responder al ensayo de Vitamina B_{12} con *L. leichmannii*.

TABLA I

CONCENTRACION DE VITAMINA B₁₂ EN ALGUNOS ALIMENTOS

		mcg/kg				mcg/kg
Productos lácteos:				Pescados:		
Leche entera	(mcg/l)	3-5	-	Filet de lenguado		13
Leche evaporada	(mcg/l)	1-3	-	Ostras		7
Leche condensada	(mcg/l)	3-5	-	Legumbres envasadas:		
Leche entera en polvo		10-26	-	Zanahorias		0-1
Leche desnatada en polvo		25-40	-	Remolachas		0-1
Quesos :				-	Guisantes	0-1
Americano :		6-	-	Habas		0-2
Suizo :		9-	-	Sopas envasadas:		
Crema :		2-	-	Sopa de tomate:		0-1
Carnes envasadas:				-	Sopa de legumbres :	1-2
Jugo de carne de vaca		10-25	-	Sopa de pollo :		2-4
Jugo de carne de cerdo		10-20	-	Sopa de cordero y verduras		3-5
Jugo de carne de ternera		10-20	-	Productos de cereales:		
Jugo de carne de cordero		20-50	-	Harina blanca		0-2
Hígado de vaca		200-600	-	Harina de trigo entero		0-2
Carnes curadas:				-	Pan blanco	0-3
Jamón prensado		11-	-	Pan de trigo entero		2-4
Salchichas de Frankfurt		18-	-	Otros alimentos:		
Chorizo para desayuno		12-	-	Huevo entero (mcg/huevo)		1-5
Chorizo de cerdo		15-	-	Flan		0-1
Salchichas		10-	-			

TABLA II

POTENCIA DE MATERIALES MICROBIOLÓGICOS

	Equivalencia en B ₁₂ µg por g de sólidos		
	Cultivo total	Filtrado celular	Células
<i>Streptomyces aureofaciens</i>	4-6	1	10-13
<i>B. megatherium</i> (cultivo de 6 a 10 h)	0,4-0,8		
	(µg por cc)		
Productos del rumen de oveja tamizado	1,2	0,04	4,8
Fracción protozoaria			6,3
Fracción bacteriana			2,1
Cultivo mezclado de bacterias del rumen, realizado en jugo de rumen esterilizado			4,0

Las dos primeras líneas de la Tabla II representan actividad APF para pollos, expresada como equivalente B_{12} .

Debe notarse que el ensayo usado en particular para los valores de la primera línea responde sólo en parte a la Vitamina B_{12} , es decir, que no se sabe realmente cuánto de esa equivalencia en B_{12} para los *Streptomyces* representa actividad B_{12} , o podría reemplazarse por Vitamina B_{12} cristalina.

Hay mucha menos posibilidad o ninguna de que en los ensayos con ratas usados para las fracciones de rumen de ovejas, intervenga otra actividad distinta de la actividad B_{12} .-

CAPITULO TERCERO

EL GRUPO DE LAS VITAMINAS B12

EL GRUPO DE LAS VITAMINAS B₁₂

Se conocen actualmente no una sola Vitamina B₁₂ sino todo un grupo de sustancias naturales íntimamente relacionadas. Este grupo de vitaminas que poseen la actividad del factor B₁₂ se designan en conjunto por el término "Cobalamina", según lo indica la Comisión de Nomenclatura de Química Biológica de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada, con acuerdo de la Comisión de Química Orgánica de la misma Unión.

Lichas vitaminas son:

Vitamina B₁₂ propiamente dicha, que según la Comisión de Nomenclatura citada, debe denominarse "Cianocobalamina".

Vitaminas B₁₂ a y B₁₂ b. En un principio se creyó que eran distintas. Luego se las ha reconocido como idénticas denominándolas B₁₂ b, y también Aquocobalamina (HESTER y WARD, 1954). Actualmente la Comisión de Nomenclatura indica que "la sustancia pura conocida hasta el presente bajo el nombre de Vitamina B₁₂ b debe denominarse hidroxocobalamina".

Citaremos aquí las opiniones de distintos autores respecto de la identidad o diferencia existente entre las vitaminas B₁₂ a y B₁₂ b.

KACZKA y colaboradores (1949) describen la obtención de vitamina B₁₂ a por hidrogenación catalítica de la Vitamina B₁₂, y dicen que es menos activa que la Vitamina B₁₂ para el *Lactobacillus leichmannii* (10-30% de actividad) y para pollos (30% de actividad).

LANG y CHOW (1950) citan la formación de Vitamina B₁₂ a a partir de la reacción entre la Vitamina B₁₂ cristalina e hidrógeno en presencia de platino, probablemente por adición de los átomos de hidrógeno en las dobles ligaduras de la molécula de B₁₂. Indican que la Vitamina B₁₂ a tiene menos actividad microbiológica y menos actividad A.P.F. que la Vitamina B₁₂.

WOODRUFF y FOSTER (1950) aislan B₁₂ a de caldos de fermentación y de extractos de hígado y hacen una doble medición: microbioló-

gica y cromatográfica, comparándola con Vitamina B_{12} . Llegan a la conclusión de que no hay una relación entre la cantidad de cada vitamina en las muestras y el ensayo de valoración realizado con *Lactobacillus lactis* en esas muestras.

PIERCE y colaboradores (1949) informan haber separado una fracción cristalina, a partir de extractos de hígado, por cromatografía y agregan que esa fracción presenta distintos máximos en su espectro de absorción (2.730 \AA , 3.510 \AA y 5.250 \AA) que los de la Vitamina B_{12} ; respecto a su actividad biológica, la consideran muy activa en ensayos con *Lactobacillus leichmannii* 313 y pollos. Sugieren el nombre de Vitamina $B_{12} b$ para este preparado.

Los mismos autores (1950) obtienen a partir de cultivos de *Streptomyces aureofaciens* un compuesto cristalino rojo al que designan Vitamina $B_{12} b$. Difiere de la Vitamina B_{12} en su espectro de absorción en el infrarrojo y tiene similar actividad para el *Lactobacillus leichmannii* y pollos.

BROCKMAN y colaboradores (1950) describen el aislamiento de un producto cristalino rojo por hidrogenación catalítica de la Vitamina B_{12} (en las mismas condiciones que KACZKA) e informan que su actividad biológica es similar a las de las Vitaminas B_{12} y $B_{12} b$. Agregan que la Vitamina $B_{12} a$ presenta una banda en su espectro de absorción que no aparece en el espectro del nuevo producto ni tampoco en el de la Vitamina $B_{12} b$, y además es menos activa. Deducen de todo ello que la sustancia producida por hidrogenación de la Vitamina B_{12} es la Vitamina $B_{12} b$.

FRICKE y colaboradores (1950) preparan Vitamina $B_{12} b$ cristalina a partir de cultivos de *Streptomyces griseus*. Informan que el espectro de absorción del compuesto muestra máximos a los 274, 352, 411 y 526 m μ , y que su actividad biológica es comparable a la de la Vitamina B_{12} en el ensayo microbiológico con *Lactobacillus leichmannii* y *Escherichia coli*.

STOKSTAD y colaboradores (1950) informan haber aislado Vitamina $B_{12} b$ de cultivos de *Streptomyces aureofaciens*, como un compuesto rojo cristalino que difiere de la Vitamina B_{12} en su espectro de absorción, pero que presenta igual actividad para el *Lactobacillus*

leichmannii y para pollos. Además dicen que la hidrogenación catalítica de la Vit B_{12} da un compuesto que presenta igual espectro de absorción en las zonas del ultravioleta, visible e infrarrojo, e igual actividad biológica para el *L. leichmannii* y para pollos que la $B_{12} b$.

Hacen notar la contradicción que se observa entre la actividad biológica del producto de reducción de la Vit. B_{12} descrito por ellos y la de la Vit. B_{12a} , producida también por hidrogenación de la B_{12} , y descrita por KACZKA y colaboradores (1949).

Ya FOLKERS y col. (1950) hablan de la identidad existente entre las Vit. B_{12a} y B_{12b} . Indican que comparando los espectros de absorción de la Vit. B_{12a} de MARCK y de la B_{12b} de LEDERLE se observó que eran idénticos, y además que ambas sustancias eran igualmente activas para el *L. casei* y el *L. leichmannii*.

E. L. SMITH (1950) considera también como idénticas las Vitaminas B_{12a} y B_{12b} .

KACZKA y colaboradores (1951) llegan a la conclusión de que la Vitamina B_{12a} , producto cristalino rojo aislado de concentrados provenientes de *Streptomyces griseus*, es idéntica a la Vitamina B_{12b} , y que la actividad biológica de la Vitamina B_{12a} es comparable a la de la Vitamina B_{12} , ya sea en ensayos realizados usando *Lactobacillus lactis*, *L. leichmannii*, ratas, pollos y personas.

A pesar de que la mayoría de los autores consideran que la Vitamina B_{12a} y la B_{12b} son una misma Vitamina, todavía hay contradicciones al respecto. Así COOLEY y colaboradores (1951) no encuentran pruebas suficientes como para afirmar que las Vitaminas B_{12a} y B_{12b} sean idénticas en estado sólido.

Dos grupos de autores tratan de explicar el porqué de esas contradicciones, especialmente en lo que a actividad biológica se refiere:

BERDLIN y SOARS (1951) comparan las actividades microbiológicas de las Vitaminas B_{12} y B_{12a} y señalan que dependen del organismo de ensayo y de la técnica empleada. "En el ensayo con *L. leichmannii* el efecto sobre el crecimiento provocado por la Vitamina B_{12a} se des-

truye al esterilizar con el medio en autoclave; la Vitamina B_{12} no sufre alteración. Esta destrucción se evita con el agregado de cantidades convenientes de Ácido tioglicólico o ascórbico".

"En el caso del *L. lactis* no parece haber pérdida de actividad microbiológica de la Vitamina B_{12} o B_{12a} durante la esterilización con el medio de ensayo. La actividad de ambas Vitaminas se vio aumentada por la esterilización y por el agregado de sustancias reductoras. Además estas condiciones aumentan la potencia de la Vitamina B_{12a} de tal modo que alcanza la actividad biológica de la Vitamina B_{12} ."

Los autores recalcan que no se observan diferencias en la actividad microbiológica de las Vitaminas B_{12a} y B_{12b} .

JACKSON y colaboradores (1951) hacen ensayos microbiológicos comparativos de las Vitaminas B_{12} y B_{12b} cristalinas y dan una explicación para las aparentes diferencias en actividad, basada en la inestabilidad de la Vitamina B_{12b} en presencia de ciertos agentes reductores y de ciertos componentes de los medios de ensayo.

Vitamina B_{12r} , descrita por DIEHL y MURIE (1952), quienes hablan de una nueva vitamina, producto de la reducción de la Vitamina B_{12} . Informan que "la hidrogenación catalítica de la Vitamina B_{12} da un material marrón reducido, Vitamina B_{12r} , el cual se oxida por el aire dando un material rojo, Vitamina B_{12a} ".

La reducción polarográfica de la Vitamina B_{12} indicaba una reducción de cobalto trivalente a cobalto monovalente en la Vitamina B_{12r} .

El espectro de absorción de la Vitamina B_{12r} difiere marcadamente de los espectros de absorción de las Vitaminas B_{12} y B_{12a} , los cuales se asemejan. La Vitamina B_{12r} se caracteriza por máximas de absorción a los 473 m μ , 405 m μ , y 312 m μ . Este espectro de absorción cambia con el tiempo cuando la Vitamina B_{12r} está en el agua, probablemente debido a una oxidación por el agua.

La titulación con ferricianuro de potasio muestra que sólo se requiere un equivalente para oxidar la Vitamina B_{12r} . Luego, la reducción polarográfica y la hidrogenación catalítica producen distintos resultados".

Por su parte, JASBERG y DIEHL (1954) consideran que él co-

balto en la Vitamina B_{12r} es bivalente.

Vitamina B_{12c} , que debe llamarse "Nitritocobalamina", según la Comisión de Nomenclatura.

Se la ha aislado de caldos fermentativos de *Streptomyces griseus* (E.L. SMITH, 1950). Su efectividad clínica es comparable a la de la Vitamina B_{12} , y sus propiedades químicas y físicas muy semejantes, siendo más rica en oxígeno que ésta.

Se la distingue de las demás por su espectro de absorción característico (máximas a los 270, 353 y 530m μ) y su comportamiento en la cromatografía.

Recibió en un principio el nombre de Vitamina B_{12x} o "factor in-nominado" (unnamed factor) (SMITH, UNGLEY, MOLLIN y DACIE) y posteriormente el de Vitamina B_{12c} , propuesto por BUCHANAN y colaboradores (1950) de acuerdo con ANSLOW y colaboradores (1950).

Vitamina B_{12d}

Al igual que la Vitamina B_{12c} ha sido aislada de caldos de *Streptomyces griseus* (E.L. SMITH, 1950), y separada de ésta por partición cromatográfica. En ciertas patentes aparece con el nombre provisorio de Vitamina B_{12c} (ANSLOW y colaboradores, 1950).

El espectro de absorción de la Vitamina B_{12d} es idéntico al de la Vitamina B_{12b} , pero ambos factores pueden separarse cromatográficamente.

Las Vitaminas B_{12c} y B_{12d} presentan caracteres en común: su actividad microbiológica es similar a la de la Vitamina B_{12} , y en el ensayo microbiológico ambas dan anillos irregulares de crecimiento bacteriano, mientras que la Vitamina B_{12} da anillos netamente delineados.

En la tabla I se resumen las propiedades que permitan distinguir las Vitaminas B_{12c} y B_{12d} de B_{12} y B_{12b} . (ANSLOW y colaboradores)

Los microorganismos producen otros compuestos relacionados con la Vitamina B_{12} , pero que no pertenecen a la serie de la Cobalamina.

Estas substancias se encuentran en el rumen, en los contenidos intestinales, en lodos de albañal y en otros productos de fermentación microbiana.

En general, los extractos de tejidos animales contienen pre-

T A B L A I

	- Vitamina B12	- Vitamina B12b	- Vitamina B12c	- Vitamina B12d
- Máximas del espectro de absorción (m μ)	278 361 548-550	274 351 525	270 (Inflexión) 353 530	274 351 525
- Coeficientes de partición entre alcohol bencílico y agua a pH 4	0,79	- Casi totalmente acuosa	1,29	0,945
- Valores aproximados de R en sistema de partición cromatográfica (1)	0,8	0,1	0,9	0,2
- Definición de los límites de zona en valoraciones en placa con L. leichmannii 313 y Lelactis 6.000	definidos	definidos	irregulares	irregulares

(1) - Mezcladura mezclado con la mitad de su peso de K_2P_4 en solución acuosa al 2 % con n-butanol saturado con agua como solvente fluyente.

ponderantemente Cianocobalamina, mientras que en los materiales sujetos a fermentación bacteriana, los otros compuestos están presentes a menudo en cantidades relativamente mayores.

Son estos los factores A, B y C (FORD y PORTER, 1952), la Pseudo vitamina B_{12} (DION, CALKINS y PRIFNER, 1952) y una serie de factores llamados D, E, F, G, H, I. También se citan el factor WR, el factor III que se supone idéntico al factor I (FRIEDRICH y BERNHAUER, 1953) la Pseudo vitamina B_{12b} , y las Vitaminas B_{12m} y B_{12f} (FORD y col. 1953; y BROWN y col., 1955).

Los compuestos hasta ahora aislados en estado puro son inactivos para los animales superiores, con excepción de la Vitamina B_{12III} de los lodos de albañal, pero son activos para los microorganismos.

Pareciera que estos compuestos juegan la parte de la Vitamina B_{12} en el metabolismo bacteriano, pero su función aún no ha sido establecida. Su ausencia en los tejidos animales indica mecanismos probablemente ligados con la formación de complejos semejantes al de la Vitamina B_{12} con el factor intrínseco. Complejos de esa naturaleza probablemente existen dentro de las células microbianas.

Algunos de esos factores pudieron separarse por sucesivas cromatografías y electroforesis sobre papel, pero los factores G y H, más difíciles de separar debieron transformarse previamente en complejos dicianurados para poder hacer luego una partición cromatográfica en papel.

La principal de estas sustancias con cobalto, llamada "factor A" (FORD y PORTER, 1952-53), ha sido denominada Pseudo vitamina B_{12} por DION, CALKINS y PRIFNER (1954). Su espectro de absorción y su actividad microbiológica muestran que está íntimamente relacionada con la Vitamina B_{12} . Constituye más del 70% de la Vitamina B_{12} del rumen de ternero y sólo se encuentran trazas de este factor en el hígado.

Los factores A, G y H y la Pseudo vitamina B_{12} se diferencian de la Cianocobalamina en la naturaleza de los nucleótidos que los componen. No se sabe cuál nucleótido, si es que lo hay, está presente en el factor C.

El nucleótido de la Cianocobalamina es: fosfato de 5-6-di-

metil benzimidazol - α -D- ribofuranosa (BUCHANAN y colaboradores, 1950). La base del factor A ha sido identificada como 2-metil adenina (BROWN y SMITH, 1954; GANT, SMITH y PARKER, 1954; DION, CALKINS y PFIFFNER, 1954), y la de la pseudo Vitamina B₁₂ como adenina (DION y col., 1952).

Por desaminación, el factor A se convierte en el factor H, que se encuentra en la naturaleza, el cual produce 2-3 metil hipoxantina por hidrólisis suave. En igual forma la pseudo Vitamina B₁₂ se desamina dando el factor G, también natural, que produce hipoxantina por hidrólisis suave.

La Vitamina B₁₂, la pseudo Vitamina B₁₂ y los factores A, G y H por tratamiento con ácido clorhídrico concentrado caliente dan una misma sustancia denucleotidada que contiene cobalto: el factor B.

Por lo tanto, es evidente que todas estas Vitaminas B₁₂ están formadas por la adición de distintos nucleótidos a una sustancia fundamental: el factor B.

FORD y HOLDSWORTH (1954), trabajando con *Escherichia coli* 113-3 (DAVIS), cepa mutante que necesita Vitamina B₁₂ para su desarrollo, agregaron al medio de cultivo el factor B y el nucleótido o la base del nucleótido de la Cianocobalamina, pseudo Vitamina B₁₂ o factor A, obteniendo la síntesis de las sustancias correspondientes. Así, con factor B y adenina se formó pseudo Vitamina B₁₂, lo cual concuerda con el descubrimiento de que la adenina se encuentra en su nucleótido; y con factor B y otros compuestos relacionados con la adenina o con el benzimidazol se obtuvieron ciertos "análogos no naturales" de la Vitamina B₁₂.

Una sustancia promotora de la formación de uno de estos análogos es la o-fenilendiamina.

DULANEY y WILLIAMS (1953), agregaron o-fenilendiamina a un medio sintético e informaron haber duplicado o triplicado la producción de Vitamina B₁₂ por el *Streptomyces griseus*. El aumento del título no se debía a una mayor producción de la Vitamina, como lo demostraron FANTES y O'CA LLAGHAN (1955), sino a la formación de un análogo de la Vitamina B₁₂, de mayor actividad microbiológica.

La potencia microbiológica de la nueva sustancia se comparó con la de la Vitamina B₁₂. Se prepararon soluciones de los dos materia-

les con iguales densidades ópticas a 361m μ , y se ensayaron diluciones apropiadas con *Escherichia coli* y *Lactobacillus leichmannii* en placas. Bajo estas condiciones la nueva sustancia era aproximadamente 1,8 veces más activa que la Vitamina B₁₂ para el *Lactobacillus leichmannii*, y 2,4 veces más activa que la Vitamina B₁₂ para el *Escherichia coli*.

Esa actividad microbiológica aumentada es probablemente la única razón que explica los aumentos de título observados en las fermentaciones que contenían o-fenilendiamina, aunque es posible que la o-fenilendiamina haya estimulado en alguna forma la síntesis del factor B, común a ambas sustancias. En tal caso se produciría la síntesis de una porción sólo de la Vitamina B₁₂.

Los niveles crecientes de la nueva sustancia a expensas de la Vitamina B₁₂, con niveles crecientes de o-fenilendiamina en el medio, y la ausencia total de biosíntesis de la nueva sustancia ante la presencia simultánea de o-fenilendiamina y niveles relativamente bajos de 1-2-diamino-4-5-dimetil benceno, muestra que probablemente está actuando un mecanismo de competencia .

No se sabe si la síntesis verdadera de diamino dimetil benceno está suprimida por la o-fenilendiamina, o si aquel se sintetiza en su nivel normal sin tener en cuenta la presencia de ésta pero no se incorpora a la molécula de Vitamina B₁₂.

La nueva sustancia es casi idéntica a la obtenida por FORD, HOLDSWORTH y KON (1954) incubando *Escherichia coli* y factor B en presencia de benzimidazol.

Para aislarla se recurrió a los mismos procedimientos de purificación usados con igual fin para la Vitamina B₁₂, y se la obtuvo en forma de agujas rojas.

Su espectro de absorción es prácticamente igual al de la Vitamina B₁₂, con un pico principal similar a los 361m μ .

Difiere de la Vitamina B₁₂ probablemente sólo en la ausencia de los dos grupos metilos de la porción benzimidazol.

Se han realizado algunos ensayos clínicos con ésta nueva sustancia y ha demostrado poseer gran actividad contra la anemia perniciososa.

Esta actividad es común a algunos análogos no naturales de la serie del benzimidazol. Pero algunos análogos no naturales pueden tener propiedades anti Vitamina B₁₂.-

Propiedades físicas y microbiológicas de algunas Vitaminas B12

Factor	Máximas del espectro de absorción (mμ)	Comportamiento electroforético a pH 3	Proteína microbiológica (en % relativo a la de la Vitamina B12	Mutante de Escherichia-L. leichmannii-Ochromonas malhamensis		
			Ensayo en placa	Ensayo en tubo		
A	361; 520; 548	Ligeramente básico	85	30	25	1
Pseudo Vitamina B12	---	Lienos básico que el factor A	120	20	50	0,2
G (y pseudo Vit. B12 desaminada)	359; 516; 540	Neutro	160	-	20-100 a)	0,3-3 a)
H (ya factor A desaminado)	358,5; 517; 540	Neutro	280	40	15-40 a)	0,7-2 a)
F	---	Neutro	130 a)	50	--	5
I	295; 561; 518; 550	Neutro	125-150 a)	45-60	35	40-60 a)

a) - respuesta no lineal

C A P I T U L O C U A R T O

P R O P I E D A D E S Y E S T R U C T U R A Q U I M I C A

PROPIEDADES Y ESTRUCTURA QUIMICA

Una vez aislada la Vitamina B₁₂ cristalina del hígado, y posteriormente de los caldos de fermentación de diversos microorganismos, se inició el estudio de sus propiedades y se intentó asignarle una estructura química. Es tal la complejidad de ésta que recién después de 7 años de investigaciones (1948-1955) ha podido publicarse la fórmula completa.

La Vitamina B₁₂ es un compuesto rojo cristalino que contiene Carbono, Hidrógeno, Oxígeno, Cobalto, Fósforo y Nitrógeno.

Se presenta bajo la forma de agujas rojo oscuras o como polvo cristalino.

Es inodora e insípida. El pH de sus soluciones es neutro.

Los cristales de Vitamina B₁₂ son higroscópicos (Merck, 1949)

Absorben rápidamente la humedad atmosférica hasta un porcentaje del 10 -12% (MOREAU, 1952). Esta humedad se elimina a presión reducida (5 mm) a 105 °C.

Los cristales se oscurecen entre 190 y 215 °C y no funden por debajo de 300 °C (RICKES y colaboradores, 1948; BRINK y colaboradores, 1949).

Los índices de refracción de los cristales (calentados durante 2 horas a 100 °C en el vacío) son :

$\alpha = 1,616$; $\beta = 1,652$; $\gamma = 1,664$ (RICKES y colaboradores 1948).

Respecto a la solubilidad, KACZKA y colaboradores (1949) indican que es soluble en agua por lo menos hasta 26,3 mg en 15 ml.

Según datos más recientes, la solubilidad es de 1,25% a 25 °C es decir, que 1 gramo se disuelve en 80 ml a 25 °C (MOREAU, 1952 ; Merck and Co, Service Bulletin 1953). Es soluble en alcohol, e insoluble en acetona, éter de petróleo y cloroformo.

Cristaliza por la adición de cuatro o más partes de acetona a una solución acuosa.

Está caracterizada por su espectro de absorción: en solución acuosa al 1%, bajo un espesor de 1 cm, se descubren tres máximos a los 2780, 3610 y 5500 Å, con los coeficientes de extinción siguientes:

	<u>2780 Å</u>	<u>3610 Å</u>	<u>5480 Å</u>	
E 1% 1cm	108	183	57	(ELLIS y colaboradores, 1949)
E 1% 1cm	115	204	63	(BRINK y colaboradores, 1949)
E 1% 1cm	115	207	63	(Vitamina B ₁₂ pura y anhidra Tercer Suplemento de la U.S.P. XIII).
E 1% 1cm	115	algo > 200	63	(Vitamina B ₁₂ secada a 90°C en el vacío, HARTLEY y co- laboradores, 1950).

Según los investigadores de los Laboratorios Merck, aparecen máximos débiles de absorción a los 3220 Å, 4090 Å y 5200 Å ; y más débiles aún a los 2880 Å y 3050 Å.

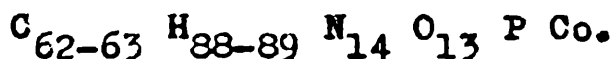
El espectro de absorción no se vé muy afectado por cambios en el pH (BRINK y colaboradores, 1949), y se ha establecido que este espectro es incompatible con la presencia de cualquier grupo pterina en la molécula.

La Vitamina B₁₂ es ópticamente activa con un $[\alpha]_D^{23} = -54.49$

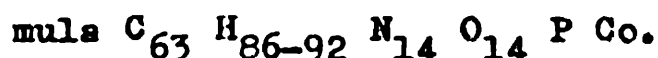
Es una base poliacídica, cuyos grupos básicos son demasiado débiles para demostrarse por titulación potenciométrica en solución acuosa pero pueden demostrarse por titulación con ácido acético glacial.

Los primeros análisis realizados por el grupo Merck con la fórmula empírica: C₆₁₋₆₄ H₈₆₋₉₂ N₁₄ O₁₃ P Co., considerando fórmulas: C₆₂ H₈₆ N₁₄ O₁₃ P Co y C₆₃ H₈₈₋₉₂ N₁₄ O₁₃ P Co bien con los resultados analíticos.

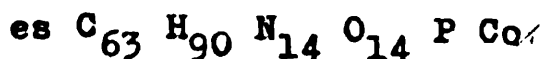
MOREAU (1952) indicó esta fórmula empírica:



Los investigadores de Merck, en su determinación de la Vitamina B₁₂ se podía considerar la fórmula:



La verdadera fórmula es:



El peso molecular

de cobalto (sien-

a 1300 (BRINK y colaboradores, 1949). Los estudios con Rayos X realizados por SMITH en 1948 indicaban un peso molecular aproximado de 1550-1750. MOREAU (1952) dice que el peso molecular es vecino a 1330. Una determinación ebulliscópica en metanol indicaba un peso molecular de 1490 ± 150 , de acuerdo con un valor de 1360-1515 encontrado por D. CROWFOOT HODKINS y colaboradores, en Oxford, a partir de los datos cristalográficos con Rayos X.

Según Merck y Co (1953) es aproximadamente igual a 1350.

Hoy se conoce el verdadero peso molecular, que es igual a 1356; siendo la concentración del cobalto de 4,35 %.

La Vitamina B_{12} al estado sólido es estable al aire. La luz difusa no la altera, pero los rayos solares o ultra-violetas la descomponen lentamente.

En solución acuosa, es estable al aire, al calor y a la luz difusa si el pH de la solución está comprendido entre ciertos límites (4 a 7, y mejor 4,5 a 5). La solución a pH 4,5 puede calentarse veinte minutos en autoclave a 120 °C sin descomposición apreciable; a pH 5, después de una hora a 120 °C, la descomposición permanece inferior al 3%; alcanzando el 12 % a pH 7.

Para conservar su actividad, las soluciones deben ser estériles. Después de la esterilización por filtración a través de bujía, y adición de 0,5% de fenol recién destilado, o de 0,3% de cresol, las soluciones con 15 µg por ml a pH 4,5, no varían su actividad al cabo de cuatro meses de conservación (MOREAU, 1952)-

Las impurezas asociadas a la Vitamina B_{12} juegan un rol importante en el curso de la conservación: el ácido ascórbico, en particular provoca una alteración del 50% en 24 horas. Uno de los constituyentes más comunes de los extractos ricos en Vitamina B_{12} , que provoca con el tiempo una disminución notable de la actividad, sería Vitamina B_{12} b.

Los agentes químicos fuertes atacan profundamente a la Vitamina B_{12} : ácidos, bases, oxidantes fuertes, formol, bisulfito, etc.

En ácido clorhídrico 0,01N a temperatura ambiente, una solución de 10 µg por ml ha perdido un 18% de su potencia después de 3 horas; un 75% después de 23 horas y un 89% después de 95 horas (RICKES y colaboradores, 1948).

En hidróxido de sodio 0,015 N, una solución de 0,2 µg por ml, se altera perdiendo un 20% de su actividad después de 40 minutos; un 45% después de 6 horas, y un 90% después de 23 horas (RICKES y colaboradores, 1948).

Según SMITH (1948), la ebullición en solución alcalina aclara el color rojo. La ebullición con ácido clorhídrico 1 N durante 1 hora aparentemente no altera el color, pero lleva a la formación de dos pigmentos, ambos insolubles en éter como la Vitamina B₁₂, pero uno extraíble con cloroformo y el otro con n-butanol.

Según ELLIS y colaboradores (1949), el fósforo puede eliminarse después de unas 6 horas de hidrólisis con ácido clorhídrico al 20 % a 100 °C, aunque no se observa liberación de fosfato después de 17 días a temperatura ambiente (25 °C). Producto de esta reacción es un complejo negro de cobalto que tiene un espectro visible (en dioxan) similar al de la Vitamina B₁₂.

Es insoluble en agua pero soluble en álcalis diluidos.

BRINK y colaboradores (1949) indican que la pirólisis y fusión alcalina evidencian la presencia de pirroles u otros anillos pentaatómicos nitrogenados (pues dan reacción positiva con el reactivo de Ehrlich (para dimetilamino benzaldehído)-

Mientras los preparados cristalinos evidencian la presencia de pequeñas cantidades de α- aminoácidos liberados por hidrólisis ácida, en muestras muy bien purificadas no pudieron detectarse aminoácidos por cromatografía en papel, suponiendo BRINK y colaboradores (1949) que estuvieran presentes en proporción inferior al 0,2%. En 1949, el grupo de las British Drug Houses en colaboración con el Medical Research Council anunciaron en el Primer Congreso Internacional de Bioquímica en Cambridge la presencia de 5-6 dimetil benzimidazol en los productos de hidrólisis ácida de la Vitamina.

Esta reacción se expresaba por la conversión de C₆₂₋₆₃ H₈₄₋₉₂ N₁₄ O₁₃ P Co a C₉ H₁₀ N₂, es decir, aproximadamente un décimo de la Vitamina B₁₂.

La sustancia C₉ fundía a 205 -206 °C, era básica y formaba un picrato cristalino que fundía a 273 - 275 °C. Era ópticamente inactiva y tenía un espectro de absorción característico que cambiaba reversiblemente con el pH.

El producto de degradación C₉ H₁₀ N₂ se sospechaba que era

un benzimidazol substituído.

En la literatura figura la reacción del benzimidazol con cloruro de benzóilo en solución alcalina, reacción que dá como resultado el derivado dibenzoilado del 1-2 diamino benceno.

Se ensayó esta reacción con el producto de degradación $C_9H_{10}N_2$ y se obtuvo un nuevo producto: $C_{22}H_{20}O_2N_2$ que fundía a 262-263 °C.

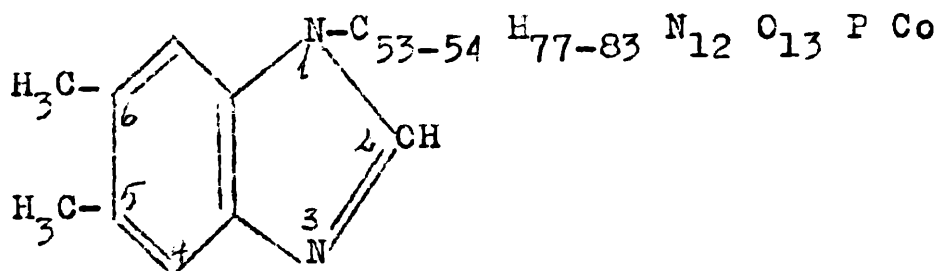
Cuando se trató el 1-2 diamino 4-5 dimetilbenceno sintético con cloruro de benzóilo en solución alcalina, se obtuvo el derivado dibenzoilado y se observó que funde a 262- 262,5°C.

Tratando el 1-2 diamino 4-5- dimetilbenceno sintético con ácido fórmico se obtuvo el 5-6 dimetilbenzimidazol, que fundía a 204-205 °C.

Mezclando esta substancia con el producto de degradación $C_9H_{10}N_2$ no había depresión de los puntos de fusión, ni tampoco cuando se mezclaban sus respectivos derivados dibenzoilados.

Así, pudo asegurarse que la Vitamina B_{12} había sido degradada a 5- 6- dimetil benzimidazol.

Se escribió entonces la fórmula parcial de la Vitamina B_{12} :



MOREAU (1952) indica que la hidrólisis ácida (calentando la Vitamina con ácido clorhídrico concentrado) escinde la molécula en:

- 1) Un fragmento que dá una coloración azul con ninhidrina, identificado posteriormente por el grupo de las B.D.H. y Merck como propanolamina (D g-1-amino-2- propanol), (una molécula por molécula de Vitamina).
- 2) Dimetil -5-6- benzimidazol (base descubierta por su fluorescencia a la luz ultravioleta).
- 3) Un macro fragmento que contiene el átomo de cobalto (resina roja).
- 4) Acido fosfórico.
- 5) Amoníaco (de cinco a seis moléculas por molécula de Vitamina).

Continuando el estudio de la estructura se han empleado mucho los métodos físicos. Basándose en consideraciones espectrales, LEAVEN (1949) muestra que una molécula de Vitamina B_{12} encierra una molécula

de dimetil benzimidazol, que este ciclo está preformado en el producto natural y que está sustituido en el nitrógeno en posición 1. En efecto, demuestra que por hidrólisis ácida suave, pueden aislarse tres compuestos:

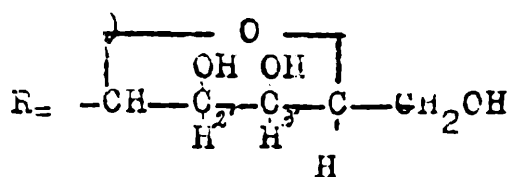
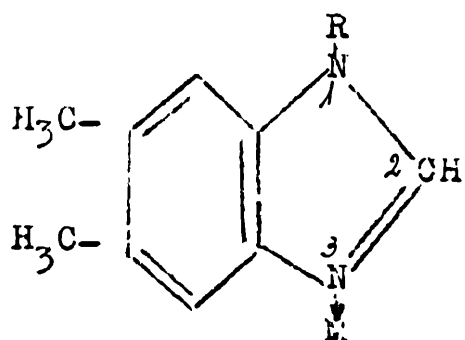
α , β y γ . El compuesto γ es el dimetil benzimidazol. La sustitución del hidrógeno 1 por un glúcido (la d-ribofuranosa) conduce al compuesto β cuya constitución está confirmada por síntesis (es el N- α -D-ribofuranósido del 5: 6 - dimetil benzimidazol).

Este derivado β , fosforilado en las posiciones 2' o 3', más probablemente en 3' forma el compuesto α (es el correspondiente 3'-fosfato); de modo que los componentes α y β pueden considerarse como análogos benzimidazólicos de los nucleótidos y nucleósidos de la purina.

Sin embargo, debe tenerse en cuenta que éstos glúcidos del benzimidazol tienen la configuración α , mientras que los nucleósidos naturales de la purina son uniformemente glucósidos β .

(Aclaremos que en éste último párrafo las letras α y β indican formas isómeras de los glúcidos, y en el párrafo anterior las empleábamos para identificar productos de la hidrólisis de la Vitamina B₁₂).

La adición de un exceso de cianuro a la Vitamina B₁₂ origina la formación de un complejo purpúreo que contiene dos grupos cianuro; el examen del espectro de absorción ultravioleta de este compuesto indica que en la Vitamina B₁₂ el segundo nitrógeno del sistema del anillo benzimidazólico está unido al átomo de Cobalto por una unión coordinada. (Anuncio hecho por el grupo de las British Drug Houses y el Medical Research Council en la Conferencia Gordon de Investigación, en 1950).



M = metal (aquí : Co⁺⁺⁺)

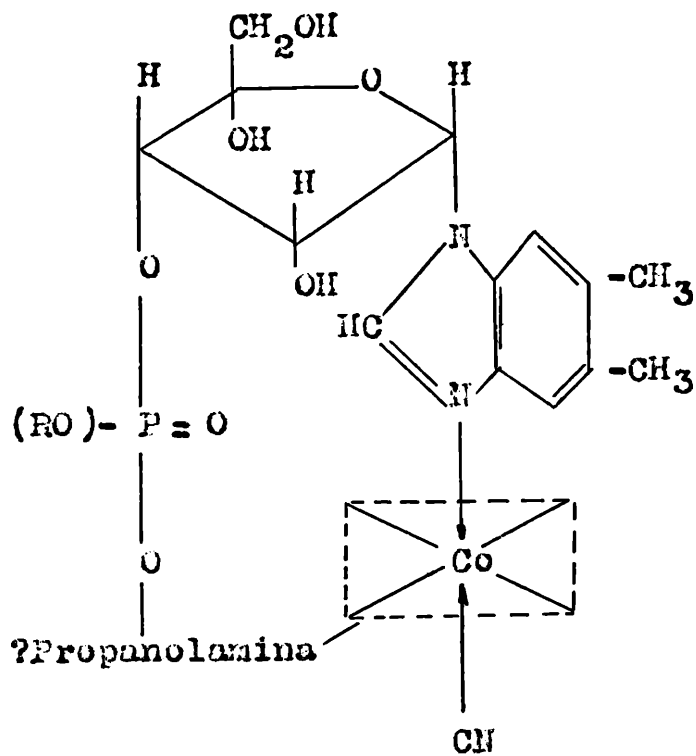
Esta unión se encuentra también en los ferropigmentos. Esta semejanza se justifica asimismo por consideraciones teóricas; en la Vitamina B₁₂ el Cobalto es trivalente y posee una simetría octaédrica; o el Fe⁺⁺⁺ de las porfirinas y el Co⁺⁺⁺ tienen en sus órbitas externas la misma distribución electrónica y forman ambos dos complejos octaédricos.

Por el contrario, la hidrólisis con ácidos diluidos diferencia los dos grupos de pigmentos: el clivaje de los ferropigmentos es casi

instantáneo, mientras que en el grupo B_{12} es progresivo.

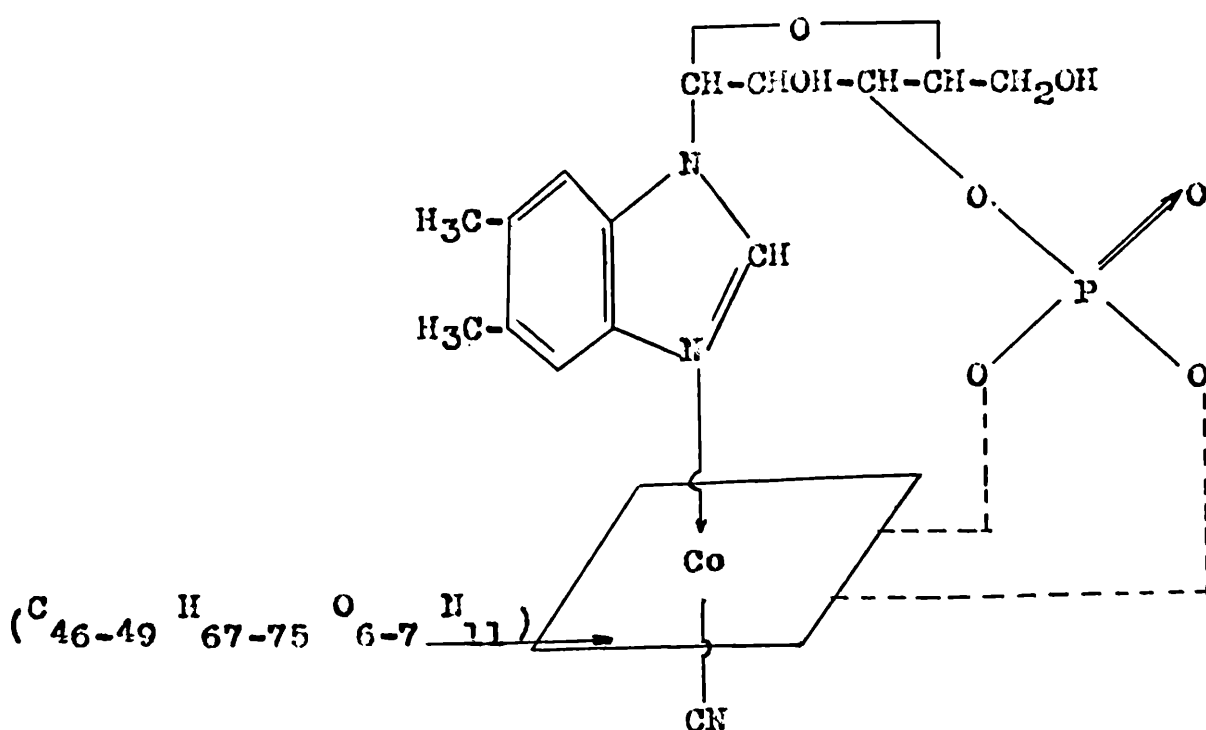
Esto sugiere la existencia de una unión entre el macro fragmento cobáltico y el compuesto α , además de la unión de covalencia $N \longrightarrow Co$.

En base a estos conocimientos, BUCHANAN, JOHNSON, MILLS y TODD (1950), propusieron la siguiente fórmula:



El grupo fosforilo del compuesto α está unido al macro fragmento cobáltico y a la propanolamina, pudiendo ser que la unión se hiciera por intermedio de esta última. Por fin, un grupo $-CN$ está unido al átomo central de cobalto.

ARMITAGE y colaboradores (1953) dan la siguiente fórmula de la Vitamina B_{12} , que difiere de la anterior en que el grupo fosforilo del compuesto α no está unido a la propanolamina:



Se sabe que el amoníaco liberado durante la hidrólisis de la Vitamina B₁₂ procede de amidas primarias, y se han presentado pruebas químicas para demostrar que existen cuatro grupos de amidas primarias en la Vitamina B₁₂, y probablemente seis—Además, el amino propanol está ligado, a manera de amida, por el átomo de nitrógeno, de manera que se hallan presentes potencialmente siete grupos carboxilos en la porción central de la molécula que contiene el Cobalto.

En realidad, el producto resinoso de color rojo obtenido por hidrólisis de la Vitamina es una mezcla acídica cuya complejidad se demostró aplicando la electroforesis sobre papel (ARMITAGE y colaboradores, 1953).

Se reconocieron dos series de ácidos: una que carece de nucleótido y contiene de 1 a 7 grupos carboxilo, y otra que conserva el nucleótido y posee de 1 a 6 grupos carboxilo.

El gran número de isómeros posibles hacía más grave el problema: por ej: se aislaron tres ácidos mono carboxilos que contenían el nucleótido combinado. También se aislaron varios ácidos di y tri carboxílicos de esta serie; cada uno podía ser convertido nuevamente en la Vitamina B₁₂ reconstruyendo las amidas a partir de los ácidos por métodos normales.

Sin embargo, para realizar nuevas investigaciones estructurales era conveniente preparar en estado puro cristalino uno de los ácidos desprovistos de nucleótido. Para este objeto se escogió una mezcla de ácidos penta y hexacarboxílicos obtenidos por hidrólisis de la Vitamina con una solución acuosa (al 30%) de NaOH a 150°C, durante una hora.

Se consiguió la separación de los ácidos tetra, penta y hexacarboxílicos así como el nucleótido libre que los acompañaba, por electroforesis sobre papel, induciendo finalmente a cristalizar un ácido hexacarboxílico puro, obtenido como su monocloruro, bajo la forma de prismas rojos (CANNON, JOHNSON y TODD, 1954).

Este fué el primer producto de degradación cristalino que no contiene el nucleótido combinado, que se preparó a partir de la Vitamina B₁₂.

Su fórmula molecular era: C₄₆ H₆₀ O₁₃ N₆ Co Cl.2 H₂O, y poseía un espectro visible muy parecido al de la Vitamina B₁₂ de origen, indicando que el cromóforo no había experimentado ningún cambio notable.

El conocimiento de la estructura del ácido hexacarboxílico derivado de la Vitamina B₁₂ y posteriormente el de la misma Vitamina sufrió un gran adelanto debido al empleo de los Rayos X en su estudio.

Se ha podido obtener información referente al ordenamiento de átomos y moléculas en cristales midiendo la transmisión y reflexión de los Rayos X.

Estos son radiaciones de onda corta, de la misma magnitud que las distancias interatómicas en los cristales, y de acuerdo con esto es posible obtener interferencias de rayos X en cristales pues los átomos regularmente ordenados actúan como una red de difracción tridimensional.

El método que empleaba la transmisión de los Rayos X, (LAUE) es de difícil interpretación matemática, y se prefiere por su sencillez el método que emplea la reflexión de los Rayos X (BRAGG).

Las intensidades de las reflexiones de Rayos X son funciones de la distribución atómica dentro de la célula unitaria (se entiende por célula unitaria, "unit cell" una unidad de estructura, la cual contiene o bien una molécula o un número de moléculas relacionadas una con otra por efecto de un grupo de elementos de simetría, y cuya repetición regular en tres dimensiones forma un cristal).

La intensidad de una reflexión es proporcional al cuadrado de la amplitud F de la onda reflejada. La dispersión de Rayos X por un átomo es realmente una dispersión debida a los electrones de ese átomo. Cuando la dirección de dispersión es perpendicular, todos los electrones de un átomo dispersan en fase y un átomo de número atómico Z , producirá una dispersión tal como si todos sus electrones (Z) se concentraran en un punto. Cuando la dispersión se realiza en cualquier otra dirección los electrones (que en todos los átomos están distribuidos en un radio de una magnitud semejante a la longitud de onda de los Rayos X) no dispersan en fase, y la amplitud de la onda resultante es inferior a la que se obtendría si todos los electrones se concentraran en un punto.

Puede demostrarse que la dispersión efectiva de un átomo dado es una función de $\sin \theta / \lambda$, donde θ es el ángulo de desviación y λ es la longitud de onda, y esta función ha sido medida teórica y prácticamente para la mayoría de los átomos.

Para $\sin \theta / \lambda = 0$, las curvas (curvas f) comienzan en Z (o $Z+n$ si la unidad difractante es un ion de carga $\pm n e$), luego caen rápidamente, y finalmente se aplanan para valores altos de $\sin \theta / \lambda$.

Debe notarse que las curvas para átomos livianos caen más rápidamente que las de átomos de número atómico elevado.

Esto nos muestra que para ángulos de BRAGG grandes, la mayor parte de la dispersión debe atribuirse a los átomos más pesados presentes.

Una estructura propuesta puede ensayarse calculando la dispersión en varias direcciones de BRAGG y comparando luego lo calculado con las intensidades observadas.

Para cada grupo de planos de reflexión hay un factor de estructura F que es una medida de la eficacia de ese grupo de planos para reflejar Rayos X. Este factor surge porque la dispersión provocada por los distintos átomos (o más fundamentalmente por los electrones) no está necesariamente en fase y cada reflexión es por consiguiente más débil de lo que hubiera sido si todos los átomos hubiesen estado ubicados en los planos de reflexión, y por lo tanto dispersaran en fase.

F, es la amplitud de la onda de Rayos X reflejada por un grupo dado de planos, referida a la dispersión de la misma estructura si hubiera un electrón en cada punto de la estructura como unidad.

F se expresa como una sumatoria de las contribuciones de los átomos correspondientes a la amplitud de la onda dispersada, y es un tipo de vector suma de los factores de estructura atómica de los varios átomos de la célula unitaria.

(El factor de estructura atómica para un cierto átomo, es igual a la relación entre la amplitud de la onda dispersada por el átomo en un ángulo dado del rayo incidente y la amplitud de la onda que sería dispersada, en iguales condiciones, por un solo electrón.).

Para casi todos los cristales orgánicos, la intensidad de una reflexión será proporcional al cuadrado de F.

La expresión de F como sumatoria permite calcular las amplitudes y luego las intensidades relativas de las reflexiones que pueden esperarse de cualquier estructura supuesta.

Hoy, la forma más común de estudiar estructuras es: atribuir estructuras, ver en cuál concuerdan más las intensidades observadas y

calculadas, modificar ligeramente la estructura, supuesta, verificar las intensidades, etc.

Como la estructura de un cristal es un ejemplo de un sólido con variaciones periódicas en su densidad electrónica, BRAGG propuso el uso de las series tridimensionales de FOURIER en éstos análisis de cristales. Así, estas series fueron empleadas para representar la distribución del poder difractante en el cristal.

Puede demostrarse que los coeficientes de estas series son los valores de los factores de estructura F .

Eligiendo un cristal con centro de simetría y considerando un plano principal se logra que los factores de estructura sean números reales, en el primer caso, y se simplifican las series transformándolas en bidimensionales, en el segundo.

Ya se trate de series bidimensionales o tridimensionales (sección plana), para llegar a un resultado se las representa usando líneas de contorno. Se obtienen así planos semejantes a los mapas topográficos donde los picos representan regiones de densidad electrónica elevada, por lo tanto átomos.

Aparentemente bastaría con trazar los diagramas de Rayos X de un cristal para determinar así directamente su estructura, pero se presenta una dificultad: la intensidad de los Rayos X que se observa experimentalmente es proporcional al cuadrado de F . Es decir que sólo se determina el valor absoluto de F .

Siendo F un número complejo, o en el mejor de los casos, un número real, si no se conoce el ángulo de fase del primero o el signo del segundo no pueden conocerse los coeficientes de las series de FOURIER y sí solo sus magnitudes.

Generalmente se requiere tener una idea previa aproximada de la estructura. Esta se usa para calcular ángulos de fase o determinar signos, los que luego se emplearán para calcular las series de FOURIER. Se trata de un método de aproximaciones sucesivas.

PATTERSON trató de sacar todas las conclusiones posibles del conocimiento de los valores de F^2 solamente.

Pudo dar una interpretación física muy útil a la sumatoria una serie tridimensional de FOURIER, donde se reemplaza el valor de F por F^2 .

Considerando una célula unitaria y en ella una distribución atómica de N átomos, partiendo de cada átomo pueden trazarse vectores hacia todos los otros átomos en la célula (incluyendo el vector de identidad: hacia sí mismo).

Habrán N^2 vectores. Al extremo de cada vector se le adjudica un peso proporcional al producto de los números atómicos (el producto de las eficiencias para dispersar Rayos X) de los átomos que conecta. Se elige un origen y los vectores ya pesados se transportan a él.

La sumatoria de PATTERSON representa esta distribución de números atómicos así como la sumatoria anterior representaba la distribución original de los átomos.

La interpretación de la sumatoria de PATTERSON es difícil pues mientras la sumatoria de los factores F contiene N picos relativamente bien definidos, la sumatoria de los cuadrados de F contiene N^2 picos en igual volumen, y por lo tanto éstos se superponen.

Si el cristal contiene pocos átomos de peso elevado, el proceso de ordenamiento se simplifica, pues dada la relación entre el peso del vector y los números atómicos de los átomos que conecta, los vectores que unen los pocos átomos pesados con otros átomos producirán picos elevados. Su identificación permite generalmente la determinación de las coordenadas de los átomos de mayor peso.

Este conocimiento de la estructura aproximada permite a menudo calcular los ángulos de fase de los factores F y la evaluación de las series correspondientes de F .

Un examen detallado con Rayos X de la estructura del ácido hexacarboxílico derivado de la Vitamina B_{12} fué realizado por BRINK y colaboradores en Oxford (1954) juntamente con el de otros tres cristales: Vitamina B_{12} secada al aire (datos obtenidos independientemente en OXFORD y PRINCETON), Vitamina B_{12} húmeda (el cristal en sus aguas madres) y Vitamina B_{12} -Se CN (donde el CN está reemplazado por Se CN).

Obtuvieron datos tridimensionales con Rayos X para los cuatro cristales—En cada caso encontraron la posición de los átomos más pesados en el cristal siguiendo los métodos directos de PATTERSON, y calcularon las series tridimensionales de FOURIER usando los valores observados de F y fases basadas solamente en las posiciones de los átomos pesados: Co o Co y Se.

Las distribuciones resultantes dieron una aproximación grosera de las series correctas de densidad electrónica, mostrando muchos picos falsos, pero también otros picos que debían corresponder a posiciones atómicas reales.

Primero reconocieron picos correspondientes a los grupos CN en el caso de la Vitamina B₁₂ húmeda y seca, y probaron la exactitud de las conclusiones substituyendo el Se CN por CN.

Luego, reconocieron el contorno general del nucleótido, colocado entre el Cobalto y un segundo pico moderadamente pesado (el átomo de fósforo), estando unida ribosa al fosfato en la posición 3, y un átomo de nitrógeno del núcleo benzimidazólico, coordinado al Cobalto.

Entre el nucleótido y el grupo CN, y rodeando al átomo de Cobalto, apareció un grupo de forma plana, semejante por sus dimensiones a un núcleo de porfirina.

Podían ubicarse aunque con menos precisión varias cadenas laterales y probablemente otros anillos, unidos a este núcleo.

En otra serie de cálculos realizados con Vitamina B₁₂ secada al aire, se supuso que la agrupación plana tenía en su contorno la forma de una porfirina normal; pero una comparación más detallada de las tres series de Vitamina B₁₂ obtenida en Oxford posteriormente, sugirió que realmente no había una verdadera porfirina, y sí solamente una semejanza entre el anillo macrocíclico de la Vitamina B₁₂ y el de las porfirinas naturales, pues en aquél dos de los cuatro anillos presentes están unidos directamente y no por un átomo de carbono intermediario.

El diseño general del núcleo que rodea al átomo de Cobalto se observa en el esquema adjunto: Fórmula I.

Luego se hicieron cálculos más aproximados de las primeras series de densidad electrónica.

En las realizadas en Princeton para la Vitamina B₁₂ se incluyeron posiciones correspondientes a una porfirina normal, junto con un número creciente de posiciones postuadas para el resto de la molécula.

En las efectuadas en Oxford, basadas en la Vitamina B₁₂ -Se CN se usó la estructura modificada de porfirina, junto con posiciones postuladas para todos los átomos en la célula unitaria. Al comparar los resultados se comprobó que era más probable la segunda estructura (grupo plano modificado). La zona de los anillos pentaatómicos unidos direc-

tamente aparece más clara en las series de la Vitamina B₁₂-Se Cn.

El ordenamiento atómico encontrado en el grupo plano resultó tan inesperado que recién se lo aceptó una vez examinado el producto de degradación aislado por CANNON, JOHNSON y TODD:

En este cristal el nucleótido se vé reemplazado por cloro.

La posición relativa de los grupos planos en el cristal es totalmente distinta a la de la Vitamina B₁₂, pero, dentro de la molécula, aún puede trazarse el mismo diagrama esencial.

Realizado el cálculo de la distribución tridimensional de la densidad electrónica se observó que el grupo plano aquí se inclina considerablemente hacia los tres ejes; un grupo lineal (el CN), se proyecta hacia un lado, y un pico pesado que se proyecta hacia el otro (el átomo^{de} cloro), completa el octaedro de picos que rodean al cobalto.

Respecto a la naturaleza de los átomos^{que} se sabía estaban unidos directamente al cobalto, no se tenía evidencia química de ella, pero se suponía naturalmente que eran nitrógenos, y el resto carbonos.

También se tenían indicios de que el sistema total no era plano y de que había cadenas laterales unidas al núcleo, pero los resultados eran demasiado imprecisos como para conocer en que puntos se reducían los anillos en el primer caso, y como para describir la naturaleza de esas cadenas laterales en el segundo.

HODKIN y colaboradores (1955) en California, por cálculos cada vez más aproximados de la distribución correcta de la densidad electrónica, llegaron a una solución de la estructura cristalina del ácido hexacarboxílico producto de la degradación de la Vitamina B₁₂, la cual provee también la solución de una gran parte de la estructura química de la Vitamina B₁₂.

El método general ha sido el de calcular los factores de estructura para todas las reflexiones de Rayos X observadas, basados en los grupos gradualmente crecientes de posiciones atómicas aceptables asignar fases a los factores de estructura observados después de cada serie de cálculos, y usar los términos refasados para volver a calcular la distribución tridimensional de la densidad electrónica. Esto se usó luego para revisar o agregar posiciones atómicas.

En sus cálculos, HODKIN y colaboradores se basaron en el reco-

nocimiento de un núcleo interno que rodea al átomo de Cobalto, semejante al encontrado en la misma Vitamina B₁₂, reconocimiento realizado por BRILL y colaboradores en los primeros mapas de densidad electrónica calculados para este material, usando fases basadas solamente en contribuciones conocidas del átomo de Cobalto.

Luego se calcularon los factores de estructura basándose en 62 átomos pertenecientes a este núcleo y al resto del grupo de coordinación del cobalto.

Así se amplió la representación de picos en el plano, pues además de los 26 átomos ubicados por cálculo, los que tenían picos con alturas superiores a los $7,5 \text{ e}/\text{\AA}^3$, aparecieron 91 picos independientes cuyas alturas variaban entre $1,6$ y $4,5 \text{ e}/\text{\AA}^3$.

Los 28 átomos que tenían más de $2,5 \text{ e}/\text{\AA}^3$ estaban ubicados en lugares que permitían considerarlos como átomos de cadenas laterales unidos al núcleo principal, y esta ubicación era aceptable también desde el punto de vista químico.

Posteriormente, en dos series de cálculos se reconocieron 10 átomos ubicados en cadenas laterales adicionales.

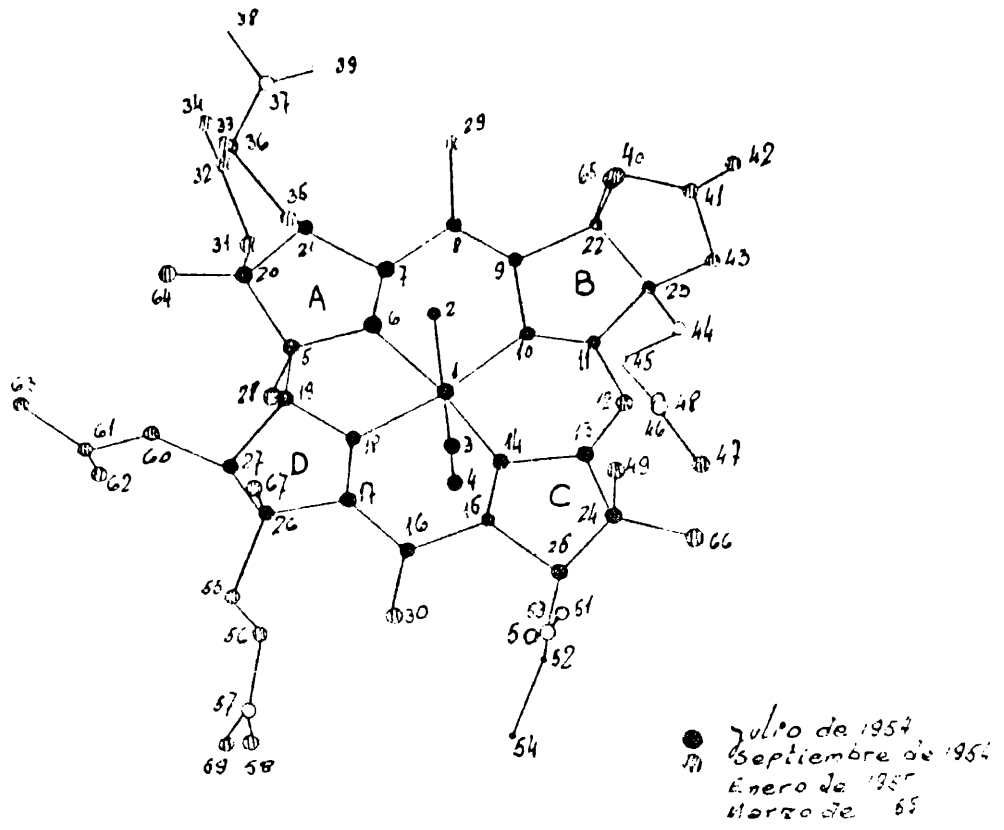
Las posiciones atómicas proyectadas en las figuras 1 y 2 del esquema adjunto corresponden a una molécula que tiene como centro cobalto, unido a cloro por un lado y a un grupo cianógeno por el otro, y rodeado por un núcleo interno formado por cuatro anillos pentaatómicos dos de los cuales están unidos directamente entre sí.

Los átomos numerados del 6 al 17 en la Fig 1 son coplanares y sugieren estar unidos por un sistema de dobles ligaduras. El C₅ en la unión directa lleva un solo sustituyente.

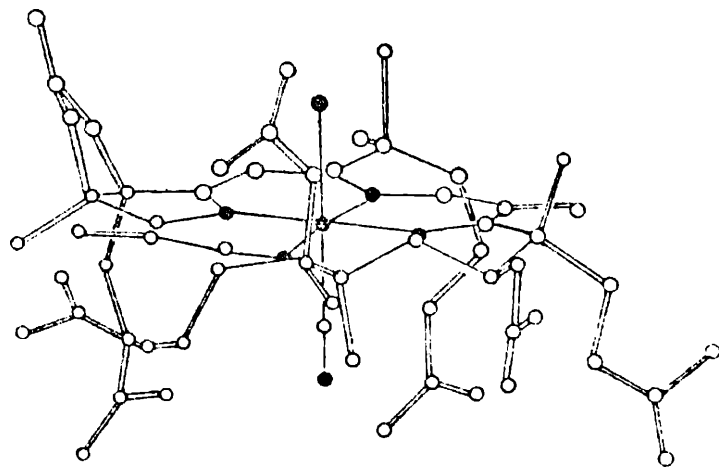
Las β posiciones de los anillos pentaatómicos están ubicados alternativamente arriba y abajo del plano del anillo interno. Llevan cadenas laterales sustituyentes cuyos contornos concuerdan con ácido acético sustituido y ácido propiónico, en el orden de las porfirinas del tipo III, y además otros sustituyentes simples.

En la Fig 2 se observa que los restos de ácido acético se disponen hacia el mismo lado del anillo que el átomo de Cloro, y los de ácido propiónico hacia el otro.

Teniendo en cuenta la distribución geométrica de los átomos de la cadena lateral en el espacio y la densidad electrónica relativa-



(1)



(2)

Figuras

mente elevada de los cuatro átomos de nitrógeno internos y de muchos de los átomos de oxígeno carboxílicos puede escribirse la naturaleza química de los átomos de N, C, y O en la mayor parte de la fórmula esquelética II. del esquema adjunto.

Basándose solamente en la evidencia cristalográfica no es tan segura la naturaleza química de los substituyentes simples en distintos puntos del núcleo. Las distancias interatómicas y los pesos concuerdan con que son todos grupos metilos, tal como lo sugiere la evidencia analítica, pero ninguna medición es lo suficientemente precisa como para excluir la posibilidad de que el N^o 28 o el N^o 30 sean un grupo hidroxilo o amino.

Respecto al átomo N^o 43, que está combinado en un anillo, dada su densidad electrónica debe ser O o N (como NH) siendo el anillo una lactona o lactama.

El número y posición de las dobles ligaduras no es seguro. Tanto la fórmula III como la IV son posibles, aunque la III parece ser la más probable—(ver esquema).

Las dudas dejadas por la cristalografía se resuelven en parte gracias a los datos químicos.

Se sometió al análisis una muestra del ácido hexacarboxílico. Se la secó a 54 °C a una presión de 0,05 mm.

El análisis elemental dió los valores:

C ; 52,8 % ; H: 6,3 % ; N: 7,9 %.

Si se supone que el residuo contenía aún dos moléculas de agua de cristalización, concuerda aquél con la fórmula:

$C_{46} H_{60} O_{13} N_6 Co Cl \cdot 2H_2O$, donde hay un 53,35 % de C; un 6,2% de H y un 8,1% de N.

Los valores se explican mejor suponiendo que los ocho átomos substituyentes simples están presentes como carbono en grupos metilo.

No es probable que ninguno de ellos sea O o N, dado que el modo de formación del ácido hexacarboxílico es muy enérgico (tratamiento de la Vitamina con hidróxido de sodio al 30% en solución acuosa a lentando a 150 °C), lo cual excluye la existencia de grupos inestables o lábiles.

Tratando un hidrolizado crudo de la Vitamina B₁₂ o el ácido

hexacarboxílico puro con ácido crómico se obtuvo la succinimida correspondiente, lo cual confirma la existencia del anillo C, tal como se lo formula actualmente.

El análisis con Rayos X de los cristales de las distintas Vitaminas B₁₂ ha confirmado la presencia de un núcleo como el hallado en el ácido, suponiendo que se ha producido una reacción de intercambio en la formación del producto de degradación; el nucleótido en la Vitamina ocupa el lugar del grupo CN en el fragmento.

Pueden trazarse también las posiciones de los átomos del grupo propionamida uniendo el grupo fosfato en la Vitamina a la cadena lateral de ácido propiónico del anillo D. Sólo este grupo y la molécula de ribosa están unidos directamente al fosfato.

Se observa que en la Vitamina no hay evidencia de un átomo en el lugar del átomo 43 del ácido hexacarboxílico, en cambio hay baja densidad electrónica, correspondiente a un grupo acetamida libre. Además la Vitamina parece contener un grupo metilo como β sustituyente en el anillo B, y un grupo propionamida como β' sustituyente.

El anillo extra en el ácido hexacarboxílico se produce por lo tanto por ciclización de la cadena lateral de acetamida o ácido acético probablemente luego de la hidroxilación en la posición β' remanente, la cual está activada por una doble ligadura carbono-nitrógeno. Por lo tanto el anillo es una lactona o lactama. En favor de esta última se cita el hecho de que el ácido no adquiere carga negativa adicional aún a pH 11, y además concuerdan con la fórmula de lactama los datos analíticos y el espectro infrarrojo (Ver fórmula II).

Debe hacerse notar que la degradación de la Vitamina a ácido hexacarboxílico sin ciclización que incluya grupos amida, se ha observado sólo en hidrólisis ácida.

La hidroxilación en las β posiciones activadas de los anillos pirrólicos se produce fácilmente en las Vitaminas B₁₂.

Cuando la Vitamina B₁₂ se trata durante un corto lapso con álcali en presencia de aire, se convierte en una sustancia cristalina, muy semejante a la Vitamina original, pero biológicamente inactiva.

La oxidación producida en esta conversión se supone que es una hidroxilación de anillo del tipo en discusión.

Apoya esta suposición el hecho de que la sustancia obtenida

no es diferenciable de la Vitamina por hidrólisis alcalina, en cambio por hidrólisis ácida se diferencia en que no da, como la Vitamina B₁₂ ácido heptacarboxílico, y sí solamente una mezcla de ácidos penta y hexacarboxílicos.

Probablemente esto se deba a que la hidroxilación se produce más rápidamente en condiciones alcalinas que ácidas, a pesar de que si hay ya presente un hidroxilo, la ciclización se produce en cualquiera de los dos casos.

Así, se observa que la hidroxilación del anillo C puede producirse por lo menos hasta cierto grado en condiciones ácidas, dado que se ha aislado la lactona ópticamente inactiva oxidando, con ácido crómico, hidrolizados ácidos de Vitamina B₁₂.

Cada uno de los anillos, A, B, C y D contienen por lo menos un átomo de carbono substituído en β posición, y por lo tanto no hay anillos pirrólicos en el ácido hexacarboxílico.

Esto explica las diferencias tanto físicas como químicas entre la Vitamina B₁₂ y las porfirinas, entre las que se citan las diferencias en el espectro visible y la imposibilidad de obtener maleimidias por oxidación de la Vitamina.

Oxidando el ácido hexacarboxílico con agua oxigenada se aisló ácido oxámico en mayor proporción que un mol por mol de Vitamina.

Este hecho refuerza la estructura II pues el nitrógeno del ácido oxámico debe originarse en el nitrógeno de los anillos pirrólicos centrales, parcialmente reducidos.

Este ácido oxámico no ha podido aislarse como producto de oxidación de porfirinas y sí de la oxidación de prodigiosina hidrogenada.

Como resultado de los estudios realizados con Rayos X del ácido hexacarboxílico y de los cristales de las distintas Vitaminas B₁₂ y según los datos químicos, se ha propuesto la estructura V para la Vitamina B₁₂.

De acuerdo con esta estructura la Vitamina B₁₂ contiene seis grupos amida primaria y una amida secundaria que une el resto de amino propanol al resto de ácido propiónico en el anillo D.

La Vitamina está formulada como un diéster del ácido fosfórico y el radical ácido libre del fosfato está neutralizado por una carga

positiva del átomo de cobalto.

Esto incluye en la estabilidad relativa del grupo fosfato y en el compartimiento electroforético del factor B (Vitamina B₁₂ de-nucleotidada), el cual se comporta como una base monoácida.

La ubicación del sistema de dobles ligaduras conjugado en la estructura V, se apoya en parte en los datos de Rayos X y en parte en el compartimiento de la Vitamina ante la cloración.

Así, al tratar la Vitamina B₁₂ con N-cloroamidas, se consumen tres moles de reactivo antes de formar un producto estable, y éste parece ser un compuesto diclorado, que presenta un espectro visible desplazado dentro del rojo.

Observando la estructura V puede esperarse que la cloración producirá la sustitución en cualquiera de las tres posiciones activadas marcadas con asteriscos, y sólo uno de los átomos de cloro en el producto (el del carbono meso ubicado entre los anillos A y B) podría eliminarse como cloruro de hidrógeno, provocando la extensión del sistema conjugado.

La cloración de la Vitamina B₁₂ hidroxilada (obtenida por oxidación al aire en solución alcalina) consume solamente dos moles de N-cloramina, tal como era de esperar, y se produce el mismo cambio en el espectro de absorción.

Dado que el ácido hexacarboxílico muestra en la cloración el mismo comportamiento que la Vitamina es de suponer que se produce una alteración en el orden del sistema conjugado de dobles ligaduras al pasar de la Vitamina al ácido hexacarboxílico. La estructura II da una explicación adecuada para el comportamiento del ácido en la cloración.

La estructura V atribuida a la Vitamina B₁₂ se ha visto confirmada teniendo en cuenta que la distribución de las cadenas laterales de los ácidos propiónico y acético corresponde a la de la uroporfirina III, cuyo esquema biogénico se ha demostrado. Se ha sugerido una modificación de dicho esquema que podría dar lugar al núcleo de la Vitamina B₁₂.

En el primer caso, la autocondensación del ácido α -amino levúlico produce el porfobilinógeno, precursor de muchas porfirinas en la naturaleza, y principalmente de la uroporfirina III.

En forma semejante, la biogénesis del cromóforo de la Vitamina B₁₂ involucra la formación inicial del intermediario tetracíclico parcialmente reducido (Fórmula VI del diagrama adjunto), donde hay seis posiciones (las marcadas con asteriscos) que podrían sufrir una C-alkilación. En estas posiciones se encuentran los grupos metilos en la Vitamina B₁₂.

El cierre del anillo de la estructura VI metilada para formar el cromóforo se supone que se produce por una deshidrogenación en presencia de cobalto.

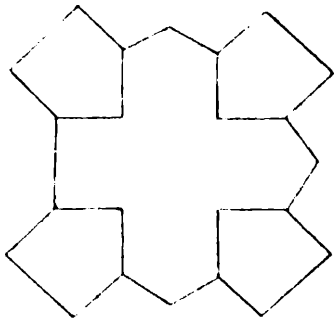
Todo esto explica la aparición de un anillo de pirrolidina en el producto final, y también el orden de las dobles ligaduras.

Dada la no coplanaridad del sistema, es probable que los anillos A y D se unan directamente y no a través del sustituyente del anillo A.

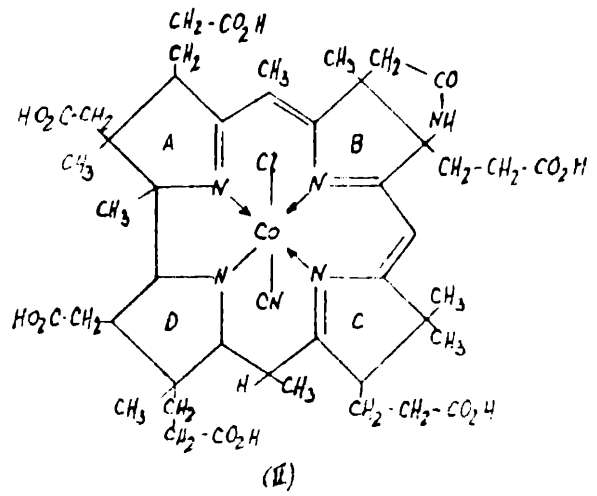
Hechos de menor importancia son la introducción del nucleótido y de los grupos amida y la descarboxilación del anillo C.

Las consideraciones anteriores permiten relacionar a la Vitamina B₁₂ con los derivados naturales de la porfirina: el hem y la clorofila, y sugieren a la vez métodos para la obtención sintética de esta molécula tan compleja.-

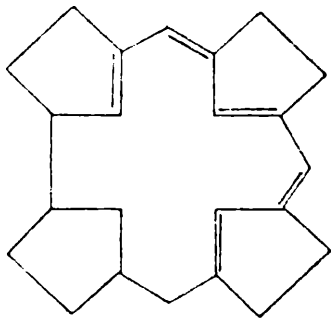
Formulas



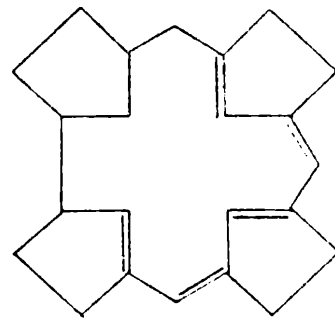
(I)



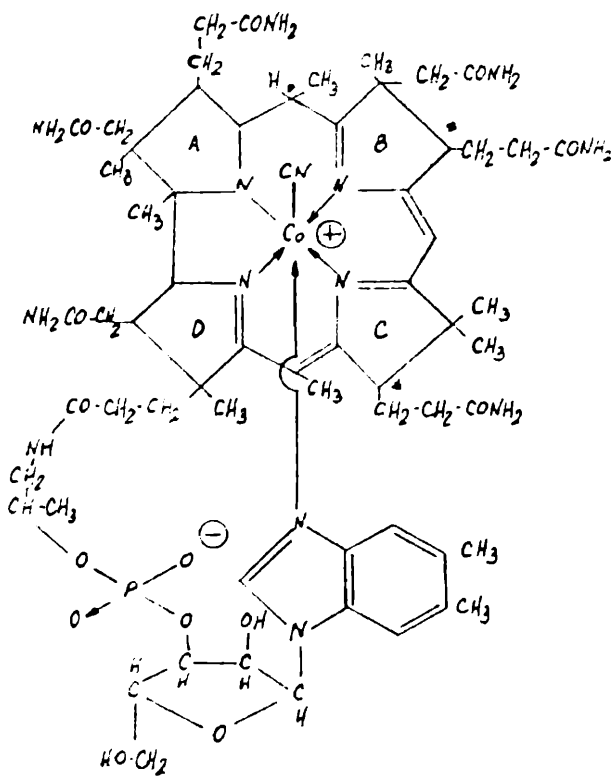
(II)



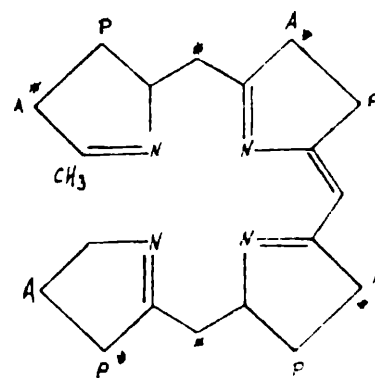
(III)



(IV)



(V)



(VI)

A = CH_2COOH
 P = $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$

CAPITULO QUINTO

METODOS DE OBTENCION

MÉTODOS DE OBTENCION

La Vitamina B₁₂ puede obtenerse:

Por extracción de productos naturales

Por métodos fermentativos

Un tercer método sería la síntesis orgánica, pero en el caso de la Vitamina B₁₂, en la actualidad no es de significación práctica, por tratarse de una molécula muy compleja, y además debido a la existencia de métodos microbiológicos simples para su preparación y la de sus análogos. De todos modos, no hay razones a priori, por las cuales la síntesis total no sea posible.

La primera fuente a la que se recurrió para obtener la Vitamina B₁₂ fué el hígado, pero la extracción debe cumplirse después de largos procesos físicos (adsorciones selectivas, y eluciones múltiples precipitaciones fraccionadas, etc) y con un rendimiento mínimo: 25 mg / tonelada (MOREAU 1952). S. BOCCHIOTTI (1953) propuso un método de fraccionamiento a distintas presiones para obtener concentrados hepáticos con alto contenido en Vitamina B₁₂.

Para extraer la fracción más rica en la Vitamina se requieren presiones de 150- 160 atmósferas, y además debe realizarse una ultrafiltración.

Las dificultades encontradas para aislar del hígado la Vitamina han conducido a investigar la posibilidad de otras procedencias, y pronto se observó (RICKES y colaboradores, 1948), que podía aislarse de caldos de cultivo de ciertos microorganismos productores de antibióticos.

Posteriormente se prefirió emplear una fermentación especial para la producción de la Vitamina.

Ya sea como producto primario de la fermentación o simultáneamente con antibióticos, la Vitamina B₁₂ se obtiene hoy casi exclusivamente de fuentes microbianas.

Una fuente potencial de Vitamina B₁₂ son los lodos de alcantarilla. HOOVER y colaboradores, (1951-52) mostraron que la Vitamina B₁₂ se encuentra en el lodo activado hasta una concentración de 10 mg /g (referido a base seca).

Vern y Alden Co. de Chicago, está ensayando su extracción a partir de Milorganita, fertilizador seco preparado por la Milwaukee Sewerage Commission con lodo de albañal.

La Vitamina B₁₂ se obtiene por extracción en contra corriente con agua y la solución se evapora o se seca en spray para efectuar una concentración veinte veces mayor.

El concentrado debe contener cerca de 44 mg de Vitamina B₁₂ por kg, y se usa en la preparación de alimentos para animales, más que como punto de partida para la purificación de la Vitamina cristalina.-

C A P I T U L O S E X T O

O B T E N C I O N P O R F E R M E N T A C I O N

OBTENCION POR FERMENTACION

En 1948 **WICKES** y colaboradores descubrieron que los microorganismos pueden sintetizar Vitamina B₁₂; la posibilidad de que la Vitamina encontrara un uso extensivo en la nutrición humana y animal estimuló una búsqueda amplia de cepas que pudieran usarse como fuentes comerciales del factor de crecimiento. **HALL** y sus colaboradores, en el Laboratorio de Investigaciones Regional del Norte, estudiando más de 5,000 cepas de mohos, levaduras, actinomicetas y bacterias, observaron que mientras había muchas actinomicetas y bacterias que producían Vitamina B₁₂, no sucedía lo mismo con mohos ni levaduras.

Los organismos usados son principalmente especies de Streptomyces, Bacillus y Flavobacterium, aunque se han empleado algunos otros.

La biosíntesis de cobalamina por un miembro del género Bacillus fué mencionada por primera vez por **WICKES** y colaboradores en 1948-

LE CLAIR, en 1949, mostró que los residuos celulares de Bacillus subtilis producidos al aislar la subtilina, trabajo realizado por **WICKES** y colaboradores en 1948, estimulaban el crecimiento de pollos que padecían de una deficiencia de Cobalamina.

MARY JOHNS señaló la presencia del factor I.L.P. (Lactobacillus lactis Dörner) en cultivos en caldo de diversos microorganismos, en particular de Streptomyces roseochromogenus, Streptomyces griseus y Streptomyces antibioticus.

WICKES y colaboradores¹⁹ han encontrado en los cultivos de Flavobacterium Megastis, Lactobacillus arabinosus, Bacillus subtilis y los mismos Streptomyces.

STEPHENSON y colaboradores (1948), en cultivos de Bacillus subtilis.

HURT, en 1949, en cultivos de Aerobacter aerogenes.

Ciertos organismos no identificados de estiércol de pollos, de la putrefacción de granos agotados de la industria cervecera, y del rumen de ovejas han demostrado ser capaces de sintetizar Vitamina B₁₂ según informan **STOCKSTAD** y colaboradores (1948), **ANSBACHER** y **HILL** (1949) y **ZUCKER** y **ZUCKER** (1948) respectivamente.

STOCKSTAD y colaboradores informaron sobre un microorganismo

inmóvil del tipo bacilo, aislado del estiércol de gallina, el cual produce AFB así como el factor anemias perniciosas. Este proceso fue descrito luego por PETTY y otros investigadores, y un organismo aislado así fue identificado como *Flavobacterium solare*.

Durante una búsqueda de cepas productoras de nuevos antibióticos realizada en Japón en 1949, se aisló del suelo, junto con gran número de organismos, la cepa de *Streptomyces olivaceus* NRRL B-1.125, (F700) que luego demostraría ser uno de los mejores productores de Vitamina B₁₂. Así ya en 1951, investigadores del Laboratorio de Investigaciones Regional del Norte, informaron rendimientos de más de 2 mg/l con una cepa de *Streptomyces olivaceus*.

CAREY y LOWING, en 1951, trabajando con el mismo gerzen en un medio sintético citan rendimientos de 0,7 a 1,2 mg/l, los cuales alcanzan los 2 mg/l si se agregan materiales naturales al medio.

El *Streptomyces griseus* (RICKES y colaboradores) y el *Streptomyces aureofaciens* (STOKSTAD y colaboradores) se usan en la producción comercial de Vitamina B₁₂ cristalina y de concentrados para el tratamiento de la anemia perniciosa y para alimentos de animales.

El enriquecimiento en Vitamina B₁₂ de los productos de pescado sería por fermentación con las mismas cepas ha sido informado por TANE en 1951, con rendimientos de 1,1 mg/l. El medio de fermentación es el líquido proveniente del prensado de arenques, con su contenido de sólidos ajustado al 2% y el agregado de 2 µg de cobalto por gramo de medio.

HALL y TSUCHIYA (1951) informan que el *Flavobacterium devorans* cultivado en un medio que contiene: Carbohidratos (1-3%), proteínas (1-3%), sales nutrientes (incluyendo 1 ppm de Co Cl₂) y Vitaminas; en condiciones aeróbicas sumergidas, con agitación vigorosa a pH 5,5-7,5 y cerca de 30°C, produce una cantidad apreciable de Vitamina B₁₂ dentro de las 96 horas. Esa cantidad alcanza a 0,6 mg de Cobalamina por litro.

Se citan rendimientos algo menores para el *Flavobacterium solare*.

Trabajando en la producción de Vitamina B₁₂ con actinomicetas SCHULL y ROUTTEN, en 1951, obtuvieron rendimientos que variaban entre 0,02 y 1,5 mg/l, con un promedio de 0,455 mg/l.

JACKSON y colaboradores, en 1951, informaron haber aislado Vite-

mina B_{12b} de fermentaciones realizadas con *Streptomyces fradiae*.

SMITH y colaboradores en 1951, realizan la re-fermentación de los residuos de destilación de la fermentación alcohólica de granos con *Ashbya gossypii* y estudian el valor nutritivo de los productos así obtenidos y el contenido de factores promotores del crecimiento.

Dicen que los concentrados de riboflavina provenientes de la fermentación con *Ashbya gossypii* son una buena fuente de otras sustancias promotoras del crecimiento tal como lo revelan el ensayo microbiológico y con animales. Dos factores: Vitamina B₁₂ y factor del *Lactobacillus bulgaricus*, se forman en grandes cantidades.

El contenido de Vitamina B₁₂ es de aproximadamente 1,8 microgramos tomando como base el extracto seco. La actividad APF se confirmó por ensayos con pollos, utilizando productos de 500, 8.000 y 10.000 µg/gr de potencia de riboflavina.

Los Doctores LUCIANO y MURRAL, en 1952, describen la producción de Vitamina B₁₂ por fermentación con *Bacillus brevis*, destacan lo elevado del contenido en Vitamina B₁₂ de los cultivos del germen en los medios que corrientemente se emplean para la producción de tirotricina y estudian las condiciones óptimas de producción en cultivos en superficie y en profundidad. Informan rendimientos de 5000 unidades ILD y 4000 - unidades LLD respectivamente.

ROIGER, HANSON y ALLGEIER, en 1952, describen la producción de Vitamina B₁₂ en una fermentación anaeróbica con cultivo mezclado, empleando una fase sacarolítica y una proteolítica, con rendimientos de 0,5mg/l en fermentaciones de 64 a 72 horas.

En esta fermentación hay una producción pequeña de Vitamina B₁₂ en las primeras 48 horas, durante las cuales los hidratos de carbono de la masa se van eliminando por una fermentación sacarolítica con *Aerobacter aerogenes*. La fermentación sacarolítica puede realizarse con una serie de organismos, lo cual da flexibilidad al proceso para incorporar otros factores de crecimiento (además de la Vitamina B₁₂) que son producidos por bacterias o levaduras.

A las 48 horas, el medio libre de azúcar se inocula con la mezcla proteolítica: *Streptococcus bovis*, *Clostridium putrificum*, *Escherichia coli* sp. y *Proteus* sp., y se mantiene en condiciones anaeróbicas y li-

geramente alcalina. La formación de Vitamina B₁₂ es rápida, alcanzando un máximo entre las 64 y 72 horas, es decir entre las 16 y 24 horas después del agregado del inóculo proteolítico.

La razón de utilizar una mezcla de cepas reside en que éstas aisladas producen mucha menos Vitamina B₁₂ que cuando están mezcladas, así, la producción de Vitamina B₁₂ en µg por ml es para *Froteus* sp. 0,13, para *Pseudomonas* sp. 0,03 y para un cultivo mezcla de los dos organismos = 0,32.

BORENZTAJN y KURYLOWICZ (1952) tabulan las propiedades bioquímicas de veinticuatro cepas de *Streptomyces*, e informan que se obtienen los mejores rendimientos en Vitamina B₁₂ si se hacen crecer cepas de *Streptomyces* sp 24, *Streptomyces griseus* 3475 y 3463, *Streptomyces aureus* y *Streptomyces aureofaciens* en un medio que contiene: corn steep liquor: 40 gr (peso seco); glucosa : 10 gr; cloruro de calcio: 5 gr; cloruro de cobalto : 1 mg; agua: c.s.p. : 1 litro; pH = 7.

LEVITON y HARGROVE , en 1952, informan sobre la producción de Vitamina B₁₂ en una fermentación de dos fases, empleando *Lactobacillus casei* en la primera fase (que dura 72 horas) y *Propionibacterium freudenreichii* ATCC 6.207 en la segunda fase.

La producción de actividad B₁₂ comienza en la segunda fase, y crece con velocidad en aumento hasta alcanzar los 4,3 mg de actividad B₁₂ por litro, a las 312 horas de iniciada la fermentación.

GARIBOLDI y colaboradores, en 1953, describen la producción de concentrados comerciales de Vitamina B₁₂ por biosíntesis con *Bacillus megatherium*, e informan haber obtenido rendimientos de hasta 0,7 - 0,8 mg/l en una fermentación de 8 a 12 horas. El medio está compuesto por: sacarosa purificada, extracto de levadura, ácido cítrico y sales inorgánicas (incluyendo 2 mg de cloruro de cobalto por litro de caldo).

JANICKI , en 1953, aísla un repique de *Streptomyces griseus* y lo hace crecer en un medio de agar que contiene extracto de carne, peptona, glucosa y sales inorgánicas. Obtiene rendimientos de 1,6 mg de Vitamina B₁₂ por litro de caldo en cultivos de 110 horas mantenidos a 27 - 28 °C.

BORENZTAJN estudia la producción simultánea de Vitamina B₁₂

antibióticos (especialmente estreptomocina) por fermentación. Informa que no se ha encontrado Vitamina B₁₂ en cultivos de Penicillium; que el S. ^{venezuelae} Streptomyces aureofaciens y Streptomyces rimosus producen Vitamina B₁₂ y cloramfenicol, aurcomicina y terramicina respectivamente, y que por selección continua del Streptomyces griseus se ha aislado una cepa que produce 0,55 µg de Vitamina B₁₂ por ml. de caldo.-

HALL y colaboradores en 1953, trabajando en escala de laboratorio con Streptomyces olivaceus, en cultivo agitado y sumergido, en condiciones favorables respecto a composición del medio, temperatura, agitación y aereación, informan rendimientos de 3mg de Vitamina por litro de caldo, en sólo 96 horas de fermentación.

PELLEGR, VOJNOVICH y HEGER, en 1954, describen experimentos realizados en planta piloto, en los que se produjeron Vitamina B₁₂ y concentrados de la misma por fermentación de sustratos nutrientes con Streptomyces olivaceus. Citan rendimientos de hasta 1,7mg de Vitamina por litro de caldo, a las 120 horas de iniciada la fermentación.

HESTER y WARD, en el mismo año, trabajando en escala industrial en los Laboratorios Dawe, con la misma cepa de Streptomyces olivaceus NRRL B- 1.125, obtienen rendimientos comprendidos entre 1,0 y 2,0mg de Vitamina B₁₂ por litro de caldo.-

Comparando los rendimientos de Vitamina B₁₂ obtenidos con los distintos microorganismos, según informa la literatura los mejores productores son : la asociación simbiótica de Lactobacillus casei y Propionibacterium freudenreichii, y el Streptomyces olivaceus.

Si bien los primeros llegan a producir más Vitamina, debe tenerse en cuenta que la fermentación es mucho más lenta : 312 horas; deben inocularse dos gérmenes sucesivamente, y exige el agregado de ácido láctico a intervalos, para elevar la producción de la Vitamina.

En cambio, el Streptomyces olivaceus produce el máximo de Vitamina dentro de las 64 a 96 horas de iniciada la fermentación, no exige una doble inoculación como la anterior, ni la adición de sustancias nutritivas al medio durante la fermentación.

A pesar de que las cifras muestran como superiores a estas últimas cepas, los laboratorios industriales aplican también otras de

rendimiento inferior en cuanto a Vitamina B₁₂, pues en la elección del germen interviene no sólo el rendimiento que es capaz de producir o la simplicidad del proceso, sino la conveniencia de obtener Vitamina B₁₂ solamente o junto con algún antibiótico u otra Vitamina.

A. - Producción de Vitamina B₁₂ por fermentación en escala de laboratorio.

Entre las cepas productoras de Vitamina B₁₂ anteriormente enumeradas, elegimos para describir una fermentación tipo al *Streptomyces olivaceus*, pues es una de las cepas más promisorias respecto a rendimientos de vitamina que se haya encontrado hasta el presente.

HALL y colaboradores (1953) utilizaron en su trabajo la cepa *S. olivaceus* NRRL B-1125. Mantuvieron los cultivos stock en Agar de Bennett, cuya composición es la siguiente (*Journal of Bacteriology*, 57:141 (1949)):

Extracto de levadura	1,0 g.
Extracto de carne	1,0 "
Hidrolizado enzimático de caseína	2,0 "
Glucosa	10,0 "
Agua destilada	1000. ml.
Ajustar pH a 7,3 con NaOH	
Agar (no indicado en la publicación)	15,0 g.

El medio de germinación está compuesto por:

Corn Steep liquor	0,5 % (en base a extracto seco)
Glucosa	0,5 %

o bien tiene igual composición que el medio de fermentación.

Las fermentaciones se realizaron en erlenmeyers de 500 ml. que contenían 100 ml. de medio, y en fermentadores de acero inoxidable de 20 litros de capacidad cargados con 10 litros de medio, cada uno equipado con control automático de temperatura, agitador y burbujeador de aire.

Los erlenmeyers se incubaron a 28-30°C en un shaker ^(agitador) de movimiento de vaiven que daba 88-92 golpes de 6,875 cm. de amplitud, por minuto, o en algunos experimentos, en un shaker rotatorio que giraba a 200 r.p.m. en un recorrido circular de 5,625 cm. de diámetro.

Las fermentaciones sumergidas se llevaron a cabo a 22-37°C, con una velocidad del agitador de 180-220 r.p.m., y una relación de aereación de 0 a 1 volumen de aire por volumen de medio por minuto.

Los inóculos se prepararon a partir de cultivos stock esporulados. Con ansa se transfirieron esporas a 100 ml. de caldo y se incubaron en shaker durante 48 horas. Un segundo frasco se inoculó con un 5% de este inóculo primario y se incubó durante 48 horas también.

Los inóculos destinados a las fermentaciones, que iban a realizarse en frascos agitados, se desarrollaron, por ser mas conveniente, en un shaker de vaiven o rotatorio, mientras que los destinados a fermentaciones sumergidas se desarrollaron en frascos o botellas provistos de aereación. Los medios de fermentación se inocularon con el 5% en volúmen de inóculo.

La determinación cuantitativa de la Vitamina B₁₂ producida se realizó según una modificación del método de Skeggs y colaboradores (1948), empleando como organismo sensible el *Lactobacillus leichmannii* ATCC 4797 (ver capítulo de valoración de la Vitamina B₁₂). La desaparición de azúcar en el medio de fermentación se determinó según el método de Somogyi (1945), y la variación del pH se controló potenciométricamente.

Se estudiaron en escala de laboratorio las distintas variables que influyen en la formación de la Vitamina B₁₂:

- 1-) Composición del medio
- 2-) Reacción del medio
- 3-) Aereación y agitación
- 4-) Temperatura.

1- COMPOSICION DEL MEDIO

A- Fuente de nitrógeno

Para proveer de Nitrógeno al medio de fermentación se ensayaron varias sustancias proteicas crudas. A un medio básico compuesto de:

Glucosa	0,5- 1,0 %
CaCO ₃	0,5 %
CoCl ₂ 6H ₂ O	1,5- 10 PPM

se le agregaron distintas sustancias proteicas, y con los nuevos medios así obtenidos se realizaron fermentaciones destinadas a sintetizar Vitamina B₁₂. Los ensayos se hicieron en frascos agitados y en fermentadores de 20 litros.

En la Tabla I se observan los rendimientos de Vitamina B₁₂ obtenidos después de 4 días de incubación en medios de cultivo a los que se agregaron: vinazas, harina de semilla de soya y micelio residual de fermentaciones destinadas a la producción de penicilina, respectivamente.

T A B L A I

Producto al 4 %	- Tipo	- Fermentador empleado	- Vitamina B12, µg/ml
Vinazas	- Trigo	- Frascos agitados	- 0,5- 3,0
Vinazas	- Trigo	- Tanques profundos	- 0,2- 3,3
Vinazas	- Maiz	- Frascos agitados	- 0,8- 1,9
Vinazas	- Maiz-Milo	- Frascos agitados	- 0,2- 1,3
Vinazas	- Milo	- Frascos agitados	- 1,0- 1,3
Residuo de destilación	- Maiz	- Frascos agitados	- 0,2- 1,5
Residuo de destilación	- Maiz	- Tanques profundos	- 1,5
Harina de soya	- de Expeller	- Frascos agitados	- 0,3- 1,0
Harina de soya	- Extraída con solvente	- Frascos agitados	- 0,3- 1,0
Micelio de penicillium	- Seco	- Frascos agitados	- 0,6
Micelio de penicillium	- Seco	- Tanques profundos	- 2,0
Vinazas 50% y Harina de soya 50%	- Trigo Extraída con solvente	- Frascos agitados	- 1,0- 1,4

Los resultados demuestran que estas substancias son fuentes promisorias de N₂ orgánico y probablemente también de otras substancias nutritivas. Los mas altos rendimientos se obtuvieron con vinazas de trigo.

Para determinar la proporción óptima de vinazas que debe agregarse al medio de fermentación, se hicieron ensayos en frascos agitados adicionando desde 0,0 hasta 5,0 % de vinazas al medio básico, que estaba compuesto por:

Glucosa	0,5 %
CaCO ₃	0,5 %
CoCl ₂ 6H ₂ O	1,5 PPM-Ajustar el pH a 7,0

Las vinazas provenían de la fermentación alcohólica de trigo, habiéndose sacificado el almidón de la masa con amilasa fúngica.

El medio se esterilizó durante 20 minutos a 121°C .- Los frascos se inocularon con un cultivo líquido de 24 horas preparado en shaker a 28-30°C , cuyo medio tenía esta composición:

Glucosa	0,5 %
CaCO ₃	0,5 %
CoCl ₂ 6H ₂ O	1,5 PPM
Vinazas	2,0 %

Las fermentaciones se realizaron en un shaker con movimiento de vaiven y se extrajeron asepticamente muestras de 10 ml. del medio de cada frasco, a los 3, 4 y 5 días de iniciada la fermentación, para determinar en ellas pH y Vitamina B₁₂. - Los resultados se observan en la Tabla II.

T A B L A I I

-Vinazas	pH			Vitamina B ₁₂		
	- 3 días-	4 días-	5 días	- 3 días-	4 días-	5 días -
%	-	-	-	- µg/ml	- µg/ml	- µg/ml
- 0	- 6,1	- 5,8	- 5,6	- 0,1	- 0,1	- 0,1
- 0,5	- 7,3	- 7,9	- 8,5	- 0,2	- 0,3	- 0,3
- 1,0	- 7,7	- 8,2	- 8,6	- 0,4	- 0,5	- 0,6
- 2,0	- 8,0	- 8,4	- 8,6	- 0,6	- 1,2	- 1,2
- 3,0	- 8,1-	- 8,4	- 8,7	- 0,9	- 1,4	- 1,3
- 4,0	- 8,1	- 8,2	- 8,8	- 0,9	- 1,6	- 1,2
- 5,0	- 8,0	- 8,3	- 8,8	- 0,8	- 1,4	- 1,0

Se obtuvieron los mejores resultados cuando se agregó un 4 % de vinazas, y para este porcentaje, la producción máxima de Vitamina correspondió al 4º día de fermentación.

Tomando como base un medio adicionado de vinazas, se ensayó el agregado de : aminoácidos, algunas vitaminas del complejo B, corn steep liquor, urea, pirimidinas, purinas, y 5-6-dimetilbenzimidazol, pero no se obtuvo ningún aumento en la producción de Vitamina B₁₂.

B- Fuente de glúcidos

Se descubrió que el agregado de glúcidos fermentescibles al medio de fermentación produce un aumento en el crecimiento del *S. olivaceus* durante los primeros días de fermentación, y también en la producción de Vitamina B₁₂.

Se agregó glucosa en proporción que variaba entre 0 y 10 % a un medio básico formado por:

Vinazas	4,0 %
CaCO ₃	0,5 %
CoCl ₂ 6H ₂ O	1,5 PPM

Trabajando en frascos agitados, a las 120 horas de iniciada la fermentación pudo observarse que la producción de Vitamina B₁₂ crecía desde 1,0 µg/ml en un medio sin glúcido, hasta un máximo de 1,5 µg/ml en un medio con 1,0 % de glucosa. Con mayores porcentajes de glucosa se obtenían rendimientos decrecientes de Vitamina B₁₂; así se obtuvieron solamente 0,5 µg/ml en un medio al que se agregó un 10 % de glúcido. Se lograron resultados similares en fermentación sumergida.

C-) Cobalto

HALL y colaboradores estudiaron el efecto del cobalto en la síntesis de la Vitamina B₁₂ con el *S. olivaceus*. Agregaron cantidades crecientes de cobalto (como CoSO₄ 7 H₂O y Co(NO₃)₂ 6H₂O) a un medio básico compuesto por:

Vinazas	4,0 %
Glucosa	0,5 %
CaCO ₃	0,5 %

Los resultados obtenidos se observan en la Tabla III (trabajaron con un agitador de movimiento de vaivén, a 28°C de temperatura.

T A B L A III

- Fuente de Cobalto	- Co ⁴⁴ inicial PPM	- Vitamina B ₁₂	
		- 4 días µg/ml	- 6 días µg/ml
- Ninguna	-	- 0,2	- 0,1
- CoCl ₂ 6H ₂ O	- 0,37	- 1,1	- 1,3
- "	- 1,24	- 1,5	- 1,9
- "	- 2,48	- 1,6	- 1,7
- CoSO ₄ 7H ₂ O	- 0,37	- 1,1	- 1,3
- "	- 1,24	- 1,6	- 1,8
- "	- 2,48	- 1,7	- 1,9
- Co(NO ₃) ₂ 6 H ₂ O	- 0,37	- 1,3	- 1,6
- "	- 1,24	- 1,6	- 1,6
- "	- 2,48	- 1,6	- 1,9

Se obtuvieron altos rendimientos de Vitamina B₁₂ agregando 1,24 PPM de Co⁺⁺ al medio, pero para asegurar la máxima producción se prefirió agregar 2,47 PPM de Co⁺⁺ en los experimentos subsiguientes.

También HENDLIN y RUGER (1950) estudiaron el efecto del Co⁺⁺ sobre la síntesis microbiana de sustancias en actividad LLD (los autores hacen notar que la actividad LLD no es idéntica a la Vitamina B₁₂). Trabajaron con *Streptomyces griseus*, con *Pseudomonas Sp.*, con *Mycobacterium smegmatis* y con 10 cepas no especificadas de gérmenes aislados del rumen y de estiercol de vacas.

El medio empleado en estos estudios estaba compuesto por:

Extracto de carne Difco	0,3 %
Hidrolizado enzimático de caseína (1)	1,0 %
Co ⁺⁺ (como Co(NO ₃) ₂ 6H ₂ O)	cantidades variables

(1) (Sheffield Farms Inc)

El pH del medio se ajustó a 6,8-7,0 con NaOH, se distribuyó en porciones de 40 ml. en erlenmeyer de 250 ml., y se esterilizó a 1 atmósfera de presión durante 20 minutos.

Los microorganismos ensayados se mantuvieron en agar nutritivo en pico de flauta.

El inóculo empleado fué un cultivo de 48 horas preparado en agitador, en los experimentos realizados con *S. griseus*, y una suspensión acuosa proveniente de un agar inclinado de 24-48 horas en los experimentos realizados con otros microorganismos. Los frascos sembrados se incubaron durante 5 días a 28°C en un agitador de movimiento rotatorio que giraba a razón de 220 r.p.m.

Se extrajeron muestras diariamente y en ellas se determinó la actividad LLD, según el procedimiento de CASWELL y colaboradores. (1949).

Experimentos con *Streptomyces griseus*:

En estos experimentos se observó que la actividad máxima LLD, correspondía a los días 3^o a 5^o de fermentación y como el título no disminuía después de alcanzar el máximo, se prefirió ensayar las muestras correspondientes al 5^o día.

En la figura 1 puede observarse la respuesta de la actividad LLD a dosis crecientes de Co⁺⁺.

Se observa que en el agregado de Co⁺⁺ al medio básico se llegó a triplicar el título de actividad LLD. Paralelamente aumentó la producción de Vitamina B₁₂.

Las actividades máximas se obtuvieron con 1 - 2 PPM de Co^{++} . Se observaron manifestaciones tóxicas con 20-50 PPM de Co^{++} , pues decreció considerablemente el desarrollo del germen y la producción de actividad LLD. -

Experimentos con otros microorganismos:

Trabajando con gérmenes aislados de rumen y estiércol, así como con varios cultivos de la Merck Culture Collection, todos ellos capaces de sintetizar actividad LLD, se observó que el agregado de Co^{++} 2 PPM al medio básico ya citado, provocaba un aumento en la producción del factor de crecimiento.

La Tabla siguiente compara la producción de actividad LLD por distintos microorganismos en un medio que en un caso no contiene Co^{++} y al que en otro caso se le han adicionado 2 PPM de Co^{++} .

T A B L A IV

Organismos	Substancias LLD- activas (unidades/ml)	
	Sin agregar Co^{++}	Agregando Co^{++} (2 PPM)
R ₂ (series R:aislados del rumen de vacas)	1.100	3.500
R ₅	700	4.900
R ₆	160	3.000
R ₁₂	400	800
R ₃₆	1.300	4.800
R ₄₁	500	1.140
C ₅ (series C:aislados de estiércol de vaca)	260	430
C ₆	280	750
C ₇	390	950
C ₁₀	160	380
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	540	3.800
<i>Pseudomonas</i> sp. (<i>P. lumichroma</i> de Foster)	640	3.000
<i>Streptomyces griseus</i> G 25	880	3.500

D-) Cobre:

Trabajando con un medio básico de la siguiente composición:

Vinazas	4,0 %
Glucosa	0,5 %
Carbonato de calcio	0,5 %
CoCl ₂ 6H ₂ O	10 PPM.

se ha comprobado (HALL y colaboradores, año 1953) que la presencia de 56 PPM de cobre en el medio de fermentación no inhibe el crecimiento del *S. olivaceus* ni la síntesis de la Vitamina B₁₂. Sin embargo, la presencia de 82 PPM de cobre inhibe casi totalmente la síntesis de la Vitamina, y ante 133 PPM de cobre, el crecimiento del germen en el medio era muy débil.

En estos ensayos el cobre se proveyó con el que contienen naturalmente las vinazas y con el agregado de CuSO₄ 5H₂O.-

Por análisis previos se demostró que las vinazas no contienen cantidades de cobre suficientes como para inhibir el crecimiento del germen o la producción de Vitamina B₁₂.

En otros ensayos se agregaron recortes de Cobre metálico al medio antes de la esterilización y se esterizó el conjunto; o se lo agregó asepticamente una vez esterilizado, al medio también esterilizado previamente.

E-) Otros metales

Se agregaron recortes de acero inoxidable, estaño, hierro, plomo y aluminio al medio de fermentación anteriormente citado, y se observó que no tenían efecto sobre el crecimiento del *S. olivaceus* ni sobre la producción de Vitamina B₁₂.

2- Reacción del medio

Utilizando el *Streptomyces olivaceus*, y un medio de fermentación compuesto por:

Vinazas	4,0 %
Glucosa	0,5 %
CaCO ₃	0,5 %
CoCl ₂ 6H ₂ O	10 PPM

HALL y colaboradores informan que los mejores rendimientos en Vitamina B₁₂ se obtuvieron cuando el pH inicial del medio estaba entre 7,0 y 8,0, sin embargo se obtiene un buen crecimiento del organismo, con producción de Vitamina, dentro de un rango de pH que va de 5,0, a 9,0.-

A pH 4,0 no hay crecimiento y por lo tanto no se obtiene Vitamina B₁₂.
A pH 10,0 el crecimiento es relativamente pobre y la producción de Vitamina es limitada.

En la Figura 2 podemos observar las variaciones que se producen en la composición del medio durante una fermentación sumergida, variaciones que se reproducen en las fermentaciones realizadas en frascos agitados.

Durante las primeras 24 horas se consume la mayor parte de la glucosa y la reacción del medio se vuelve levemente ácida (pH 6,5 a 6,8). Siguiendo al periodo inicial, la reacción del medio se vuelve alcalina (pH 8,2 a 8,7) con producción de amoníaco. La síntesis de Vitamina B₁₂ comienza durante la fase inicial de crecimiento del organismo, pero es más rápida después de las 24 horas. La producción máxima de Vitamina se observa dentro de las 64-96 horas, pero a veces pueden obtenerse rendimientos máximos en 40 horas.

3-) Aereación y agitación

La aereación y agitación del medio son esenciales para el buen crecimiento del organismo, e influyen en el rendimiento de la Vitamina.

Se ha comprobado que en un medio compuesto por:

Vinazas	4,0 %
Glucosa	0,5 %
CaCO ₃	0,5 %
Co(Cl ₂)6H ₂ O	1,5-10,0 PPM

el rendimiento de Vitamina B₁₂ es casi un 100 % mayor en frascos incubados en un agitador rotatorio que en un agitador de vaivén. (Los que se mueven a 88-92 golpes de 6,875 cm. de amplitud por minuto, y a 200 r.p.m. a lo largo de un recorrido circular de 5,625 cm. de diámetro, respectivamente).

En fermentaciones sumergidas se ha demostrado que el caudal óptimo de aire es de $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{2}$ volumen de aire por volumen de medio y por minuto.

En la Tabla V se observan datos comparativos de los rendimientos de Vitamina B₁₂ obtenida en distintos tipos de fermentación;

T A B L A V

	Tipo de agitador		Tipo de fermentador
	Rotatorio	De vaiven	Tanque profundo
Nº de fermentaciones	15	16	22
Nº de recipientes	30	31	22
Vitamina B ₁₂ , µg/ml (máximo)	1,3-3,0	0,5-1,0	0,2 - 3,3
Vitamina B ₁₂ , µg/ml (promedio)	1,97	0,99	1,55

4-) Temperatura

El *Streptomyces olivaceus* crece rápidamente a 25-32°C, mas lentamente entre 28-36°C, y a 41°C ya no crece. Por estudios realizados en fermentaciones en botellas y en baterías de fermentadores de acero inoxidable de 20 litros, se llegó a la conclusión de que el límite superior para la producción de la Vitamina B₁₂ son los 32°C. Hay un crecimiento rápido del cultivo y síntesis de la Vitamina a los 22°C, pero los rendimientos mayores se obtuvieron trabajando entre 26 y 32°C. La temperatura óptima para la fermentación se considera ubicada entre los 28 y 30°C.

Figura 1

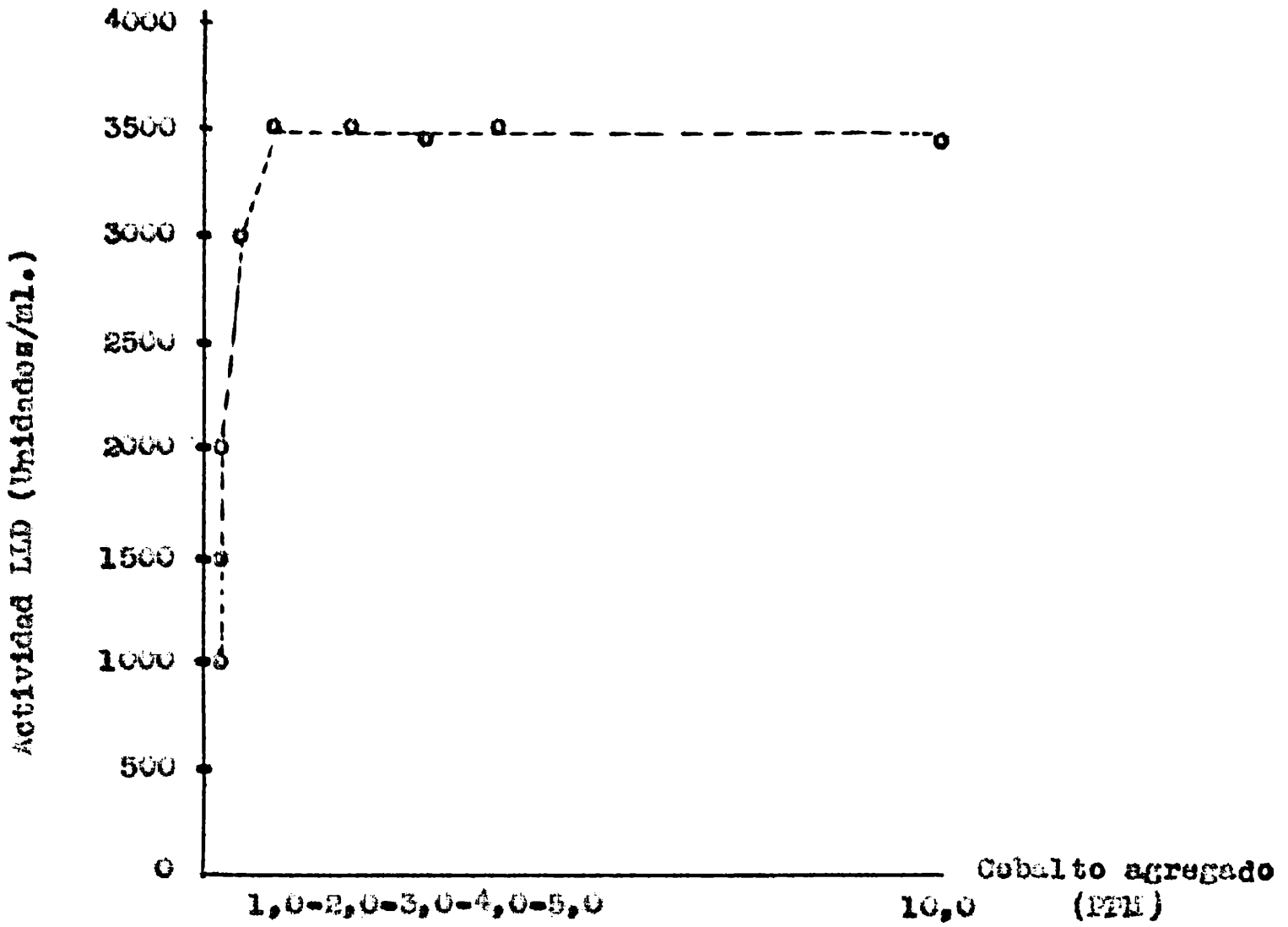
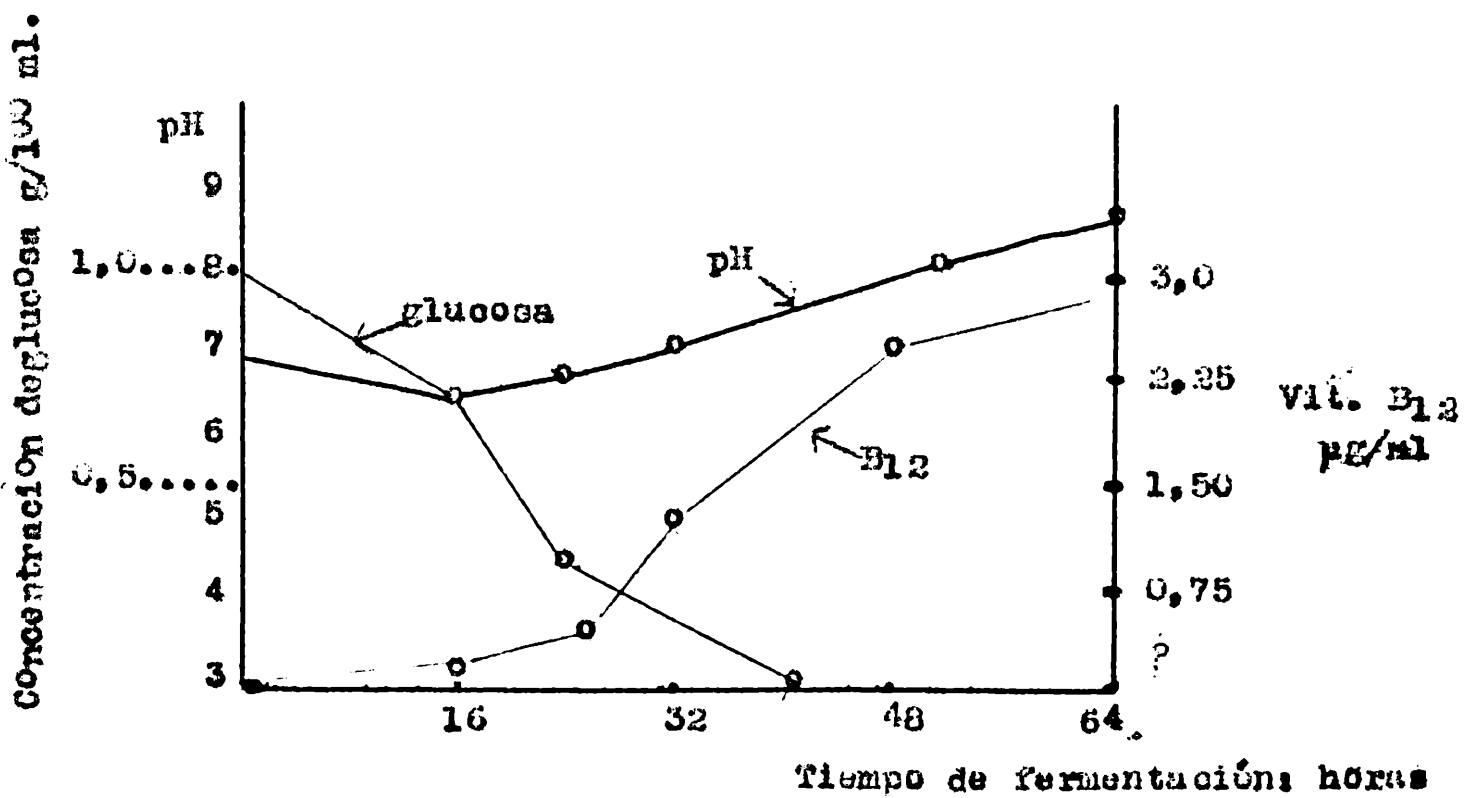


Figura 2

Cambios en el medio durante la fermentación



B.- Producción de Vitamina B₁₂ por fermentación en escala de planta piloto.

PFEIFER y colaboradores (1954) estudiaron la producción de Vitamina B₁₂ por fermentación en escala de planta piloto con el fin de determinar las condiciones óptimas para realizar el proceso en escala industrial.

Utilizan en su trabajo el *Streptomyces olivaceus* NRRL B-1125. Mantienen los cultivos stock en Agar de Bennett (la composición se indicó en el apartado A del presente capítulo).

El medio de germinación está compuesto por

Corn steep liquor :	0,5 % (en base a extracto seco)
Dextrosa :	0,5 %
Co Cl ₂ .6 H ₂ O :	2,0 PPM
Aceite de semilla de soya :	0,1 %
Ajustar pH a :	7,0

Esterilizar durante 30-60 minutos a 120 °C

Equipo empleado:

Se ensayaron los siguientes fermentadores:

- 1) Un fermentador de acero inoxidable de 2.271 litros.
- 2) Dos fermentadores de cobre de 3.028 litros.
- 3) Un fermentador de acero de 15.140 litros.

1) El fermentador de acero inoxidable de 2271 litros presenta las siguientes características: altura: 2,286 m; diámetro: 1,122 m, equipado con una camisa.

La temperatura puede regularse con una variación de 0,5°C alrededor de la temperatura deseada.

El fermentador se carga con la mitad de su volumen de medio, es decir con 1135 litros, los cuales corresponden a una profundidad líquida de 105 cm.

2) Los dos fermentadores de cobre tienen 1,524 m de altura, y 1,676 m de diámetro, equipados con serpentines internos para controlar la temperatura.

La agitación se realiza con una turbina tipo abanico que penetra por la parte superior, con paletas colocadas en ángulo de 45 grados y con una velocidad de rotación fija de 90 r.p.m.

La aereación se efectúa en cada fermentador, por medio de un aspersor hecho de tubo en cruz perforado.

Los fermentadores se cargan con 1135 litros de medio, los cuales corresponden a una profundidad líquida de alrededor de 65 cm.

3) El fermentador de acero tiene 2,438 m de altura y 2,59 m de diámetro con cabeza y fondo cónicos, equipado con chicanas de 20 cm.

Un aspersor de agua en forma de anillo exterior regula la temperatura.

La agitación se realiza con una turbina de 60 cm de diámetro con seis hojas de 17,50 cm x 13,75 cm cada una, montadas en la periferia. El agitador penetra por la parte superior y tiene una velocidad fija de rotación de 70 r.p.m.

La aereación se efectúa por un tubo abierto de 2,5 cm (1 pulgada) montado debajo del disco de la turbina.

El fermentador se carga con 3785 litros de medio, los que corresponden a una profundidad líquida de alrededor de 90 cm.

Como tanques de germinación se usan dos tanques de cobre de 302,8 litros de capacidad.

Presentan las siguientes características : altura: 1,22 m; diámetro: 0,61 m; equipados con fondos cónicos.

La temperatura se controla mediante serpentines internos refrigerantes. Estos tanques no tienen agitadores.

La aereación se realiza mediante aspersores hechos con tubo perforado.

El aire para los fermentadores y tanques de germinación se esteriliza haciéndolo pasar a través de una columna de 40 cm rellena con carbón activo, cuya granulometría está definida por los tamices 10 y 24.

Los inóculos se preparan transfiriendo con el ansa esporas de un cultivo stock *Streptomyces olivaceus* a un frasco de 500 ml de capacidad cargado con 100 ml del medio de germinación.

Este frasco tiene un tubo lateral de transferencia.

Después de incubar este frasco en un agitador de movimiento de ~~válvula~~ ^{válvula} durante 48 horas a 28 °C, se transfiere el contenido asépticamente a

una botella de 9 litros de capacidad cargada con 4 litros de medio de germinación estéril.

Esta botella tiene un sistema de aereación consistente en un tubo con perforaciones que penetra hasta el fondo de la misma, y por ese tubo se la aerea con aire estéril durante 48 h a 28 °C. El cultivo desarrollado se transfiere asépticamente a un tanque de germinación cargado con 170,325 litros de medio de germinación estéril, y allí se lo aerea durante 48 h a 28,3 °C. Este cultivo es el que va a emplearse para inocular el fermentador que contiene medio de producción esterilizado.

Se hacen determinaciones del contenido de azúcar (SHAFFER y HARTMANN, 1921), de la Vitamina B₁₂ producida y del pH del medio durante el curso de la fermentación. (Ver figura 2)

La Vitamina B₁₂ en los productos fermentados y en los concentrados secos se determina según una modificación del procedimiento de SKEGGS y colaboradores (1948), usando como organismo sensible el *Lactobacillus leichmannii* ATCC 4797 (Ver capítulo de Valoración de la Vitamina B₁₂). Las muestras de rutina se ensayan por el método del disco (Ver capítulo de Valoración de la Vitamina B₁₂).

La potencia de los concentrados de Vitamina B₁₂ preparados en fermentaciones en gran escala se verifica en ensayos de alimentación de pollitos. Se estudiaron en escala de planta piloto los siguientes factores que influyen en la producción de Vitamina B₁₂:

- 1) Métodos de esterilización
- 2) Composición del medio
- 3) Cantidad de inóculo
- 4) Aereación y agitación
- 5) Temperatura
- 6) Reacción del medio.

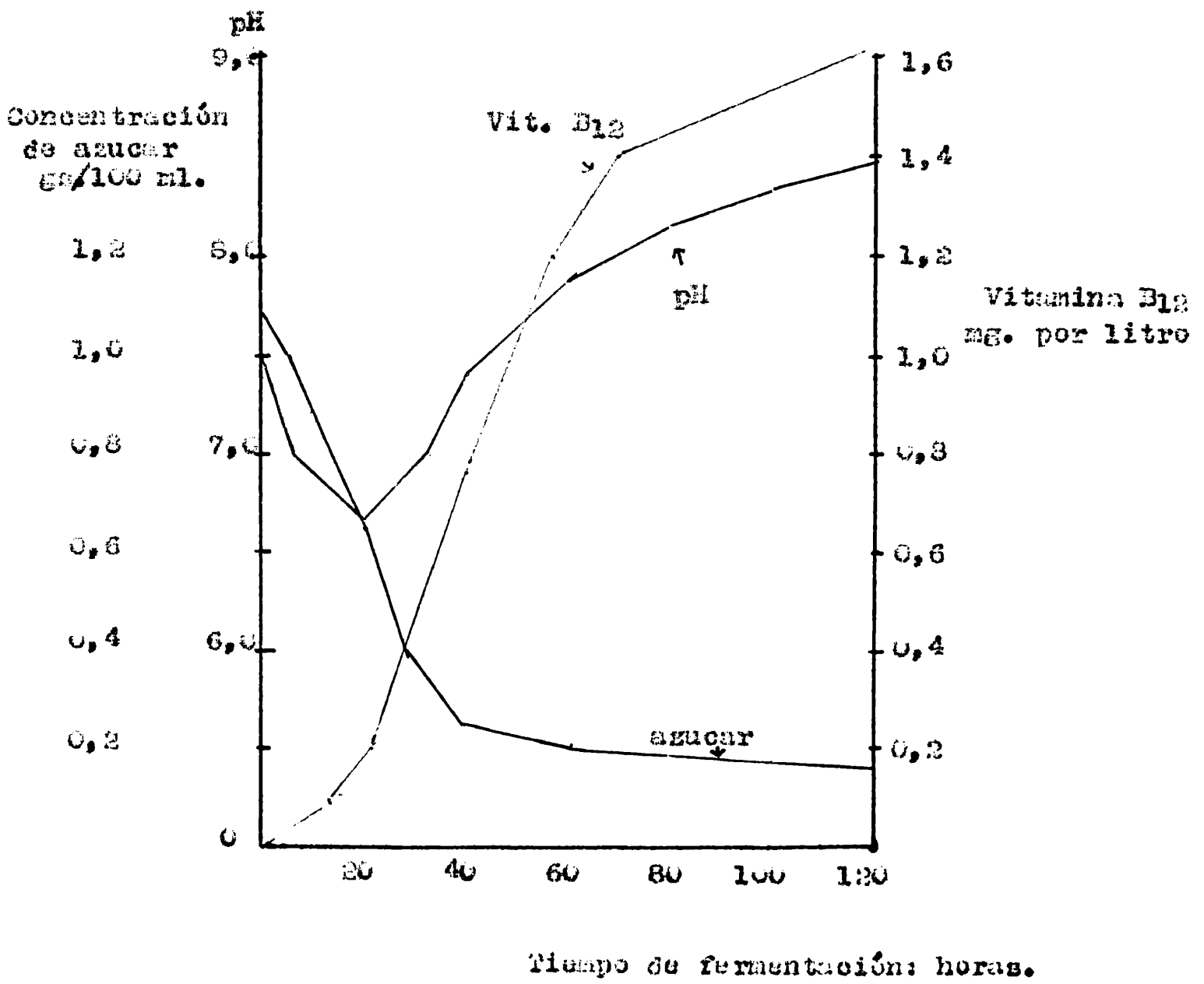
1) Métodos de esterilización:

Hay dos formas de esterilizar el medio: en forma discontinua (en batch) y en forma continua.

En la primera forma, se colocan todos los ingredientes del medio en el fermentador, y se calientan hasta la temperatura deseada por introducción directa de vapor. Después de mantener el líquido a esta tempera-

FIGURA 2

Cambios en el medio durante la fermentación de B₁₂



tura durante un tiempo definido, se lo enfriía.

En la segunda forma, el medio con todos sus ingredientes se bombea a velocidad constante desde un tanque de almacenamiento hacia un calentador por inyección de vapor, donde se lo mezcla con el vapor, se lo calienta instantáneamente hasta la temperatura deseada, se lo mantiene en un serpentín de retención durante el tiempo necesario, se lo enfriía en forma continua y se lo hace pasar al fermentador.

PREIFER y colaboradores ensayaron la esterilización en forma discontinua a alto y bajo pH, y la esterilización continua a alto y bajo pH.

El medio empleado estaba compuesto por :

Vinazas y harina de semilla de soya extraída sin calentamiento	4,0 %
Glucosa	1,0 %
Ca CO ₃	0,5 %
Aceite de semilla de soya	0,1 %
Co Cl ₂ .6 H ₂ O	10,0 PPM

Cuando se realizó la esterilización discontinua, debió mantenerse el medio a 120 °C durante 1½ a 2 horas para asegurar la esterilidad.

En el caso de los tanques de cobre, al esterilizar a bajo pH se disolvió parte del cobre, en cantidad tal como para impedir el crecimiento del organismo y la producción de la Vitamina. En este caso particular, se hacía necesario elevar el pH del medio a 7,0 antes de calentarlo, para que la esterilización fuera eficaz.

La esterilización continua a bajo pH, empleando una temperatura de 156,10 °C, con un tiempo de retención de 13 minutos, era satisfactoria para todos los tipos de fermentadores indicados, ya fueran de cobre, acero inoxidable o acero.

En la Tabla I puede observarse el efecto de la esterilización del medio sobre los rendimientos de Vitamina B₁₂ .

T A B L A I

Tanque	pH	Rendimiento de vitamina mg/litro
Discontinua, 2 hs a 121 °C		
Cobre	4,8	0,2
Cobre	5,5	0,6
Cobre	7,2	0,9
Acero inoxidable	4,5	1,0
Continua, 13 min a 156,1 °C		
Cobre	4,8	1,2
Cobre	5,5	1,2
Cobre	6,5	1,3
Acero inoxidable	5,5	1,2
Acero inoxidable	4,5	1,3
Acero	4,5	1,2

2) Composición del medio

El medio de fermentación básico empleado en estos experimentos estaba constituido por

Substancias proteicas crudas

Dextrosa

Ca CO₃

Co Cl₂ · 6 H₂O

Aceite de semilla de soya (anti espumante)

En él se estudió :

a) Fuente de nitrógeno :

Se ensayaron vinazas de trigo, maíz y sorgo, y aunque todas servían para la producción de Vitamina B₁₂, se observó que las vinazas de trigo eran superiores a las otras variedades de vinazas.

También se usaron como substancias proteicas: semilla de soya, harina de semilla de soya extraída con solvente y harina de semilla de soya de expeller, observándose que los mayores rendimientos se obtenían al

emplear harina de semilla de soya extraída sin calentar.

En fermentaciones en las que se usó como fuente de nitrógeno: Vinazas o una mezcla de vinazas con harina de semilla de soya extraída sin calentar, se obtuvo un rendimiento medio de 1,24 mg de Vitamina B₁₂ por litro de medio.

Se obtuvieron bajos rendimientos de Vitamina B₁₂ al emplear como fuente de nitrógeno el micelio seco de penicilina o trigo molido.

En la Tabla II se observa la influencia de distintos materiales proteicos en el rendimiento de Vitamina B₁₂. Estos materiales se agregaron a un medio básico compuesto por :

Dextrosa	1,0 %
Ca CO ₃	0,5 %
Co Cl ₂ · 6 H ₂ O	9,0 PPM.

b) Glucosa

Se observó que el rendimiento de Vitamina B₁₂ de una fermentación era mayor si se agregaba glucosa al medio que si se prescindía de ella.

Además, el pH de la masa fermentada subía rápidamente en ausencia de glucosa (especialmente cuando se agregaba al medio harina de semilla de soya extraída sin calentar, como material proteico).

Así, durante las primeras 24 horas de fermentación, el descenso de pH era de sólo 0,1 a 0,2, en vez del normal, que es de 0,5 a 0,8; y después de ese descenso, el pH subía rápidamente hasta más de 8,0 en solo 48 horas.

c.-) Carbonato de calcio

El Ca CO₃ contribuía a regular la producción de espuma durante la fermentación, y a elevar el rendimiento de Vitamina B₁₂ (especialmente cuando se incluía en el medio la harina de semilla de soya extraída sin calentar).

d.-) Cobalto

Al agregar cobalto al medio se observó un marcado aumento en la producción de Vitamina B₁₂, así con el agregado de 1,3 a 9,0 PPM de Co Cl₂ · 6 H₂O se obtuvieron rendimientos aceptables, mientras que sin cobalto eran muy bajos.

En la Tabla III se observa el efecto de la composición del medio sobre los rendimientos de Vitamina B₁₂.

T A B L A II

Rendimientos de Vitamina B12 en medios que contienen varios materiales proteicos
(cada medio suplementador con 1,0% de dextrosa, 0,5% CaCO₃, 9 ppm CoCl₂ 6H₂O)

Vinazas	Maiz	Trigo	Sorgo	Sin calentar	Testada	Harina de semilla de soya extraida %	de expulso (expeller) %	Semillas de soya %	Micelis de penicilina %	Trigo molido	Rendimientos de Vitamina B12 mg/litro
											0,5
						1,0				3,0	0,6
						2,0				2,0	0,5
						3,0					0,9
						4,0					1,1
											1,8
								4,0			1,0
								5,0			1,8
						2,0			4,0		0,8
						1,0			2,0		0,9
						2,0		2,0			1,1
											1,2
											1,1
						4,0					1,9
						2,0					0,8
						2,0					0,9
											1,2
											1,2
											1,2
											1,4
						2,0					1,4
						2,0					1,2
						2,0					1,2
						2,0					1,2
						1,0					1,3
						1,0					1,3
						1,3					1,3

a) Una marca daba rendimientos bajos estables

T A B L A III

Efectos de la composición del medio sobre los rendimientos de Vitamina B12 producida por Streptomyces olivaceus

	Vinazas %	-Harina de semilla de soya extraída no ca- lentada	-Semillas de soya	-Dextrosa - CaCO ₃	- COCl ₂ 6H ₂ O	- Rendimientos de Vitamina-
-Maiz	2,0	2,0	0	0,5	0	0,2
-	2,0	2,0	0	0,5	0	0,3
-	2,0	2,0	1,0	0,5	1,3	1,9
-	2,0	2,0	0	0,5	0	0,9
-	2,0	2,0	0	0,5	0	1,2
-	2,0	2,0	1,0	0,5	0	1,4
-	2,0	2,0	1,0	0,5	0	1,2
-	2,0	2,0	1,0	0,5	0	1,7
-	2,0	2,0	1,0	0,5	0	1,2
-	2,0	2,0	1,0	0,5	0	1,7
-	2,0	2,0	1,0	0,5	0	1,2
-	2,0	2,0	1,0	0,5	0	1,7
-	2,0	2,0	1,0	0,5	0	1,2
-	2,0	2,0	1,0	0,5	0	1,7
-	2,0	2,0	1,0	0,5	0	1,2
-	2,0 _a	2,0	1,0	0,5	0	1,4
-	2,0 _a	2,0	1,0	0,5	0	1,8
-	2,0	2,0	1,0	0,5	0	1,9

a) Una marca daba rendimientos bajos estables

3) Cantidad de inóculo

Se ensayaron distintas proporciones de inóculo para sembrar el medio de fermentación, variándolas desde un 1% a un 12% respecto al volumen del medio.

No se obtuvieron diferencias apreciables en los rendimientos aunque sí en la velocidad de la fermentación, que era más lenta cuando se usaba sólo el 1% de inóculo.

Basándose en estas experiencias se eligió el 5% de inóculo como la proporción más conveniente para agregar al medio fermentación.

4) Aereación y agitación

Se observó que la velocidad de aereación y agitación influían en la velocidad de producción de Vitamina B₁₂; al aumentar la velocidad de aereación y agitación crecía la velocidad de producción, y a la inversa al decrecer aquéllas, sin que el rendimiento final de la vitamina se viera muy alterado.

Se hizo posible relacionar la velocidad de producción de Vitamina en distintos tanques por medio de las velocidades de absorción de oxígeno, obtenidas de acuerdo con el método de COOPER, FERNSTROM y MILLER (1944).

Estudiando los dos fermentadores de cobre y el fermentador de acero inoxidable se observó que aunque diferían en la eficiencia y diseño de aereación, si se hacían trabajar los tres en la misma velocidad de absorción de oxígeno (determinada por oxidación de sulfito de sodio) se obtenían aproximadamente iguales velocidades de producción y rendimientos finales de Vitamina.

Se determinó que para obtener un rendimiento satisfactorio de Vitamina en una fermentación de 89 horas, los fermentadores deberán operar con una velocidad de absorción de oxígeno de por lo menos 0,4 milimoles de oxígeno absorbido por litro por minuto; y para obtener un rendimiento satisfactorio en una fermentación de 72 horas, la velocidad de absorción de oxígeno debía ser de 0,7 o mayor.

En la Tabla IV puede observarse el efecto de la aereación y agitación sobre los rendimientos de Vitamina B₁₂, considerando distintos tipos de fermentadores.

T A B L A IV

Efecto de la aereación y agitación sobre los rendimientos de Vitamina B12

- Agitación- Poder neto -Velocidad superficial-Velocidad de -Velocidad de absorción-Pondimiento de Vita-
 - R P M - Hp/3785 l. -del aire -aerocación a) -do oxígeno b) -mina a las 89 horas
 - m/hora - - - - - mg/litro

M E D I O A

-Agro inoxidable	-	100	-	0,45	21,64	-	3/8	-	0,14	0,78
" "	-	125	-	0,76	21,64	-	3/8	-	0,43	1,38
" "	-	150	-	1,25	21,64	-	3/8	-	0,70	1,50
" "	-	180	-	1,70	20,95	-	1/2	-	1,35	1,51

M E D I O B

-Cobre N°3	-	90	-	1,04	23,16	-	3/4	-	0,32	0,65
" "	-	90	-	1,03	30,48	-	1	-	0,47	1,04
" "	-	90	-	1,60	15,24	-	1/2	-	0,40	1,12
-Acero inoxidable	-	125	-	0,76	21,64	-	3/8	-	0,43	1,20

M E D I O C

-Cobre N°3	-	90	-	1,05	15,24	-	1/2	-	0,10	0,83
" "	-	90	-	1,04	25,16	-	3/4	-	0,32	0,87
" "	-	90	-	1,65	11,58	-	3/8	-	0,30	0,94
" "	-	90	-	1,60	15,24	-	1/2	-	0,40	1,31
" "	-	90	-	1,03	30,48	-	1	-	0,47	1,51

Medio A

2,7

Medio B

2,0

Medio C

2,0

-Solubles de trigo %
 -Semillas de soya %
 -Solubles de maiz %
 -Harina de semilla de soya, extraída, no calentada, %
 -Dextrona %
 -CaCO3 %
 -Aceite de semilla de soya, %
 -COCl2 6H2O, p.p.m.

a) Volumen de aire/(min.) (volumen de medio)
 b) Miligramos de oxígeno absorbido/(litro) (min.)

5) Temperatura

Se realizaron fermentaciones en un rango de temperatura comprendido entre 22,2 °C y 32,2 °C. El medio de fermentación tenía la siguiente composición:

Harina de semilla de soya extraída sin calentar	1,3%
Vinazas	2,7%
Dextrosa	1,0%
Ca CO ₃	0,5%
Co Cl ₂ · 6 H ₂ O	9,0 PPM
Aceite de semilla de soya	0,1%

Se ensayaron distintos tipos de fermentadores, operando bajo condiciones de aereación y agitación tales que las velocidades de absorción de oxígeno fueran aproximadamente iguales.

Se obtuvieron los siguientes rendimientos a las 100 horas de fermentación:

Temperatura de fermentación	Rendimiento de Vitamina B ₁₂ mg/litro
22,2 °C	1,05
23,8 °C	1,3
26,6 °C	1,5
28,3 °C	1,1
29,4 °C	1,0
31,4 °C	0,65

Puede observarse que la temperatura óptima es de 26,6 °C.

6) Reacción del medio

Habiéndose observado que la mayor parte de la Vitamina B₁₂ se produce antes de que el pH llegue a 8,0, PFEIFER, VOJNOVICH y HEGGER intentaron mantener el pH del medio de fermentación entre 7,0 y 7,5, mediante el agregado de ácido sulfúrico concentrado, después de producirse la caída inicial del pH.

El medio empleado estaba compuesto por:

Harina de semilla de soya extraída sin calentar	2,0%
Semillas de soya	2,0%
Dextrosa	1,0%
Ca CO ₃	0,5%
Co Cl ₂ · 6 H ₂ O	9,0 PPM
Aceite de semilla de soya	0,1%

Se obtuvieron los siguientes resultados:

En tres ensayos, sin controlar el pH, el rendimiento obtenido fué de 1,16 mg de Vitamina por litro de medio.

En cinco ensayos, manteniendo el pH en 7,5, el rendimiento obtenido fué de 1,40 mg por litro.

En un ensayo se omitió la glucosa del medio y se la agregó luego, en incrementos, para mantener el pH en 7,5. El rendimiento obtenido fué de 1,07 mg por litro.

FERMENTACIONES REALIZADAS EN EL FERMENTADOR DE ACERO

DE 15140 LITROS DE CAPACIDAD

Se realizaron dos fermentaciones en el fermentador de acero cargado con 3.785 litros de medio.

La composición del medio de fermentación es la siguiente:

Vinazas	3,6 %
Dextrosa	1,0 %
Ca CO ₃	0,5 %
Co Cl ₂ · 6 H ₂ O	9,0 PPM
Aceite de soya	0,1 %

Ajustar el pH a 7,2 mediante el agregado de 2,81 kg de NaOH.

Se realizó una esterilización continua del medio, a 156,1 °C con un tiempo de retención de 13 minutos.

La aereación del medio se realizó con una velocidad de aire estéril de 1416 litros por minuto, o en una proporción de 3/8 de volumen de aire por volumen de medio por minuto, correspondientes a una velocidad superficial del aire de 16,5 m por hora.

Para esta aereación y agitación, la velocidad de absorción de oxígeno determinada por oxidación de sulfito de sodio, es de 1 milimol de oxígeno absorbido por litro por minuto.

Se agregó al medio de fermentación un 5% de inóculo y se mantuvo la temperatura a 27,7 - 28,8 °C.

Después de 89 horas de fermentación, el rendimiento de Vitamina B₁₂ era de 1,28 mg por litro, y el pH había llegado a 8,0.

PREPARACION DE CONCENTRADOS A PARTIR DE LOS CAIDOS FERMENTADOS

PREIFER y colaboradores estudiaron los factores que influyen en la recuperación de la Vitamina B₁₂ a partir de la masa fermentada.

Entre ellos:

- 1) Temperatura de evaporación
- 2) Tratamiento del jarabe previo al secado
- 3) Secado del jarabe
- 4) Agregado de agentes protectores al medio

1) La masa fermentada se acidificó con ácido sulfúrico hasta pH 5,0, y se realizaron evaporaciones de porciones alícuotas de la misma a temperaturas comprendidas entre 51,6 y 101,6 °C. Los jarabes obtenidos se secaron en tambor con vapor a una presión de 2,72 atmósferas, observándose que en los concentrados secos preparados a 82,2 °C o menos la recuperación de Vitamina B₁₂ era del 80 % de la que contenía la masa fermentada. En cambio, en los obtenidos a temperaturas superiores a 82,2 °C, la Vitamina B₁₂ recuperada se redujo en un 10 %.

2) Se observó que el agregado de agentes reductores protegía la Vitamina durante el secado en tambor. Así, agregando 100 PPM de tioglicolato de sodio a jarabes que contenían un 20 % de sólidos, con un pH de 5,2, y preparando concentrados secos en tambor con vapor a 2,72 atmósferas de presión manométrica, se obtuvo de un 10 a un 20 % más de Vitamina B₁₂ que en los controles preparados sin el agente reductor.

Se determinó el efecto del ajuste del pH en el jarabe antes de secarlo en tambor a 2,72 atmósferas de presión manométrica, y se observó que dentro de un rango de pH entre 4,1 y 7,5, una variación en el mismo no provocaba diferencias significativas en las potencias de los concentrados secos.

3) Se ensayaron tres tipos de secado:

- a) Secado por spray
- b) Secado en tambor a p. atm con presiones de vapor en los tambores que varía entre 1,36 y 4,08 atmósferas).
- c) Secado al vacío en tambor

Se trabajó con jarabe preparado ajustando el pH de la masa fermentada a 5,0 y evaporándolo a una temperatura inferior a 65,5 °C, hasta llegar a un contenido de sólidos del 20 %.

Se observó que los concentrados obtenidos por los tres métodos eran aproximadamente de la misma potencia.

Se conseguía un aumento del 10 % de potencia con el secado en spray, cuidando que la temperatura de salida del gas fuera inferior a 93,3°C, y enfriando inmediatamente el producto seco.

4) Se ensayó el efecto del agregado de sulfito de sodio y cianuro de potasio a la masa fermentada, para proteger la Vitamina durante los procesos de evaporación y secado.

El método seguido era éste: Se reduce el pH de la masa fermentada hasta 4,5 - 5,5 con ácido; se evapora hasta consistencia de jarabe a temperatura inferior a 65,5 °C, se seca el jarabe en un secador de doble tambor calentado con vapor a 4,08 - 6,8 atmósferas de presión manométrica.

Cuando no se agregaron agentes protectores, la recuperación de Vitamina B₁₂ en los concentrados fué del 78,2 % de la originariamente presente en la masa fermentada.

Agregando 100 PPM de sulfito de sodio a la masa fermentada se recuperó un 88,7 %.

Agregando 10 PPM de cianuro de potasio se recuperó un 86,5%.

PREPARACION DE CONCENTRADOS DE ALTA POTENCIA

PERLBERG y colaboradores indicaron distintos métodos para su preparación.

Uno de ellos consiste en reducir el pH de la masa total fermentada a 5,0 con ácido sulfúrico, calentar hasta la ebullición para liberar la Vitamina, filtrar o centrifugar la suspensión, evaporar el jarabe al vacío y secarlo.

El concentrado obtenido contiene 55 - 66 mg de Vitamina B₁₂ por kg.

Otro método se creó teniendo en cuenta que durante la primera parte de la fermentación, la Vitamina está presente casi totalmente en el medio, y que a medida que avanza la fermentación, una porción considerable de aquélla pasa a la solución.

Así, filtrando o centrifugando la masa total, que ha fermentado durante 70 - 90 horas, puede recuperarse la mayor parte de la Vitamina con el micelio. Este se seca directamente, obteniéndose un concentrado de gran potencia, y sin necesidad de evaporar grandes cantidades de masa fermentada.

El concentrado seco contiene 46,20 mg de Vitamina B₁₂ por kg, con una recuperación del 95 % de la Vitamina B₁₂ presente en la masa fermentada.

Para obtener concentrados más potentes, PEIFER y colaboradores utilizaron el micelio separado de la masa total recién fermentada.

Suspendieron el micelio en agua, redujeron el pH a 5,0 con ácido sulfúrico, calentaron la suspensión a ebullición para liberar la Vitamina y centrifugaron o filtraron el lodo.

Evaporaron el líquido al vacío hasta consistencia siruposa y lo secaron.

Los concentrados obtenidos con este método contienen más de 220 mg de Vitamina B₁₂ por kg.

C.- Producción de Vitamina B₁₂ por fermentación en escala industrial.

Los Laboratorios Dawe en 1950, junto con una compañía subsidiaria: Fermentation Products Inc., establecieron en Newaygo, Michigan, una planta de fermentación para manufacturar Vitaminas y antibióticos de aplicación en la nutrición animal.

Las fermentaciones se realizaron siguiendo los métodos indicados por la División de Fermentación del Laboratorio de Investigaciones Regional del Norte (N.R.R.L.) para la producción de riboflavina y Vitamina B₁₂.

Para obtener Vitamina B₁₂ emplearon una fermentación aerobia utilizando el *Streptomyces olivaceus* N.R.R.L. B- 1125 como germen productor.

Descripción: Una fase importante en cualquier proceso industrial de fermentación aerobia es la provisión de una cantidad adecuada de aire comprimido estéril para la aereación de los fermentadores.

Este se provee por medio de tres compresores horizontales de efecto simple, con una capacidad de 15.300 litros por minuto, y por un compresor del tipo Y, de doble efecto, con una capacidad de 24.000 litros por minuto.

El aire se descarga de los compresores a 2,38 atmósferas de presión.

Antes de entrar a los fermentadores de germinación o al fermentador de producción, el aire se esteriliza pasando a través de un lecho de carbón activo granulado.

Las torres de carbón se esterilizan con vapor vivo cada vez que se realiza igual operación en los tanques de germinación, o en el fermentador. Se insufla vapor hacia abajo, a través del carbón, para eliminar cualquier material extraño; el aire se pasa hacia arriba.

Los cilindros de acero que sostienen el carbón para los fermentadores de germinación tienen 2,44 m de altura y 25 cm de diámetro, y los usados para los fermentadores de producción son de 2,44 m por 45 cm.

El caudal de aire para los tanques de germinación y fermentadores de producción se mide con rotámetros instalados en la corriente

que sale de los filtros de aire.

Desarrollo del proceso: Los cultivos stock de *Streptomyces olivaceus* se realizan en Agar de Bennett (cuya composición se indicó en el apartado A del presente capítulo).

La composición del medio de germinación y del medio de fermentación es ésta:

Vinazas	4 ‰
Dextrosa	0,5 - 1 ‰
Ca CO ₃	0,5 ‰
Co Cl ₂ · 6 H ₂ O	1,5 - 10 PPM.

Del cultivo stock se transfieren las esporas a Erlenmeyers de 1 litro cargados con 250 ml de medio de germinación. Estos se colocan en un agitador rotatorio y el medio se incuba allí a 28 °C durante 48 horas, y con el se inoculan frascos de 3 litros de capacidad cargados con 1500 ml de medio provistos con una campana de vidrio para inoculación, unida a un brazo lateral del frasco por medio de un tubo de goma.

Estos frascos se colocan en un agitador de vaivén, donde se incuba el medio a 28 °C-

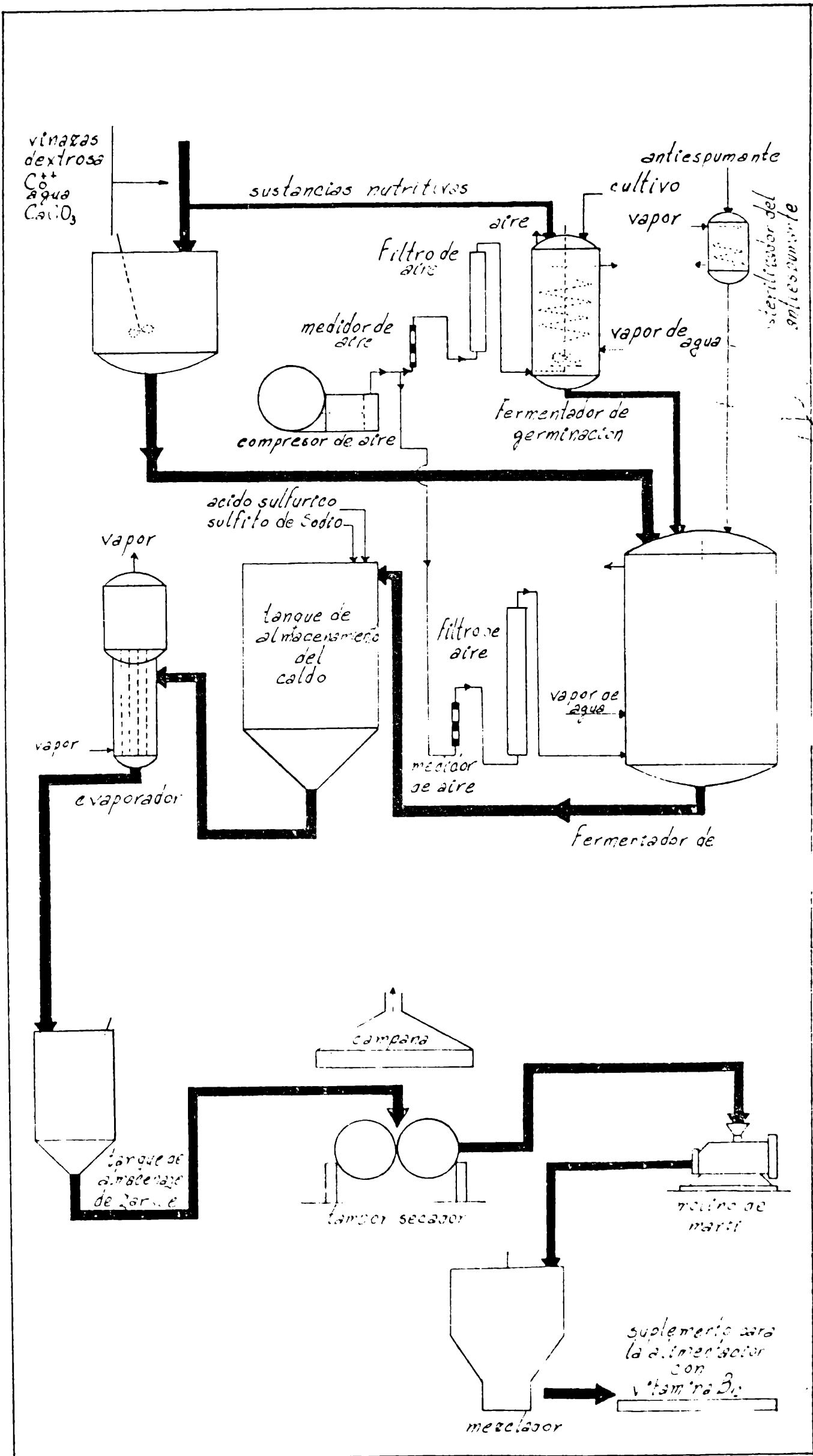
Cuando el crecimiento del germen es suficiente, los frascos se usan para inocular fermentadores de germinación-(Ver Diagrama de operación).

Estos son recipientes de 1500 litros de capacidad, en los cuales se desarrollan de 830 a 980 litros de inóculo para los fermentadores de producción, que son tanques de unos 19.700 litros de capacidad.

Todos estos fermentadores son de construcción semejante: son de acero blando, resistentes a la presión, y están equipados con serpentes para vapor o agua fría, agitadores y burbujecedores de aire.

Los componentes del medio para los tanques de germinación se colocan directamente en el fermentador, y se agrega agua hasta completar el volumen deseado.

En cambio, cuando se trata de los fermentadores de producción los ingredientes del medio se colocan previamente en un tanque de unos 3.800 litros de capacidad, de fondo cónico y sin tapa.



Se agrega agua y la mezcla se agita con agitadores inclinados. Se ajusta el pH a 7 - 7,5 con soda cáustica.

La mezcla se bombea a través de un colector y una manguera dentro de un fermentador. El agua de enjuague sirve para purgar las líneas y llevar la masa al volumen deseado.

Para proceder a la esterilización del medio, se cierra la entrada de hombre tanto en el tanque de germinación como en el fermentador, y se esteriliza a 121 °C durante 1 hora. Se hace pasar vapor por los serpentines y se lo insufla también dentro del tanque por todas las aberturas disponibles.

El agitador se esteriliza también dentro del tanque respectivo.

Luego, se enfría el sistema a 28 °C, temperatura de fermentación. Los tanques de germinación se inoculan a partir del cultivo de laboratorio por medio de una conexión de tubo corta, colocada en la parte superior del tanque. Cuando no se usa, la conexión del inóculo se cierra desde el fermentador con una válvula, y se mantiene un cierre de vapor contra el lado externo de esta válvula.

Todos los tanques de germinación están conectados a un colector que lleva a varios fermentadores grandes, de modo de poder inocular con cualquier tanque de germinación cualquier fermentador de producción, todo lo cual da mayor agilidad al proceso evitando demoras en la inoculación.

Las cañerías que unen los fermentadores de germinación y de producción se mantienen con vapor a presión mientras no se usan, para impedir contaminaciones.

La temperatura del medio se mantiene en 28 °C mediante la admisión, controlada automáticamente y registrada, de vapor o agua fría según sea necesario, en los serpentines de los fermentadores.

La cantidad de aire estéril que penetra por los burbujeadores está en la relación de 0,1 a 0,5 en volumen por volumen de medio por minuto.

Se mantiene una agitación constante del medio durante toda la fermentación.

Se observa a menudo durante el ciclo de fermentación, la pro-

ducción de espuma. Para controlarla se agregan: aceite de maíz, aceite de semilla de soya y manteca de cerdo al medio antes de esterilizarlo. Si no es suficiente, se agrega más aceite estéril durante la fermentación.

Para ello se proveen recipientes de unos 150 litros en los cuales puede calentarse el aceite con vapor a 125 -150 °C para esterilizarlo.

En los tanques de germinación crece el cultivo durante 48 horas.

Antes de inocular con él al fermentador, se examina al microscopio y se realizan ensayos bacteriológicos para asegurarse de que no se ha contaminado el *Streptomyces olivaceus*.

La fermentación dura de 3 a 5 días, es decir, hasta que debido al agotamiento del sustrato nutriente del medio, se produce la lisis del micelio y el pH sube a 8 o más.

Una vez producida la lisis del micelio cesa la producción de Vitamina B₁₂ y es ése el momento en que se recolectan los fermentadores.

La masa fermentada se bombea a los tanques de almacenamiento y la Vitamina B₁₂ se estabiliza reduciendo el pH con ácido sulfúrico y agregando pequeñas cantidades de sulfito de sodio.

El contenido de Vitamina B₁₂ al terminar la fermentación asciende a 1,0 - 2,0 µg /ml de caldo.

El caldo fermentado se concentra por evaporación, así, el contenido de sólidos, que es de un 3% en la masa fermentada, se aumenta a un 15- 20% por evaporación al vacío en un evaporador vertical en forma de tubo largo o en un doble fondo al vacío. El líquido siruposo obtenido se seca en un secador de doble tambor atmosférico calentado con vapor, que entrega un producto que contiene solamente un 5 % de humedad.

Entre los evaporadores y el secador hay tanques de almacenamiento para el líquido siruposo.

Cargas de 1350 - 1800 kg de material seco se hacen pasar por un molino de martillos, y luego van a un mezclador, donde el producto se homogeneiza respecto a tamaño de partículas y potencia, procediéndose luego a su envase en bolsas o tambores de fibra, listo para la

venta.

El contenido en Vitamina B₁₂ del producto fermentado está entre 22 y 66 mg por kg, según determinaciones realizadas por los métodos microbiológicos de la U.S.P. (United States Pharmacopeia) y de la A.O.A.C. (Association of Official Agricultural Chemists) usando *Lactobacillus leichmannii* A.T.C.C. 4797 (SKEGGS, 1948). Estas cifras se han visto confirmadas por muchos ensayos de nutrición efectuados con animales.

El producto final contiene otros factores nutricios además de la Vitamina B₁₂. El contenido de proteínas asciende al 35 %, y hay cantidades apreciables de niacina, ácido pantoténico, piridoxina, tiamina y riboflavina, habiéndose hallado también substancias antibióticas, como la olivacina.

C A P I T U L O S E P T Í M O

M E T O D O S D E V A L O R A C I O N

MÉTODOS DE VALORACION

La Vitamina B₁₂ puede determinarse por Métodos Físicos, Químicos, Biológicos y Microbiológicos.

Métodos Físicos:

1) Ensayo espectro fotométrico: Este procedimiento es de valor en el ensayo de Vitamina B₁₂ cristalina y sus soluciones, en ausencia de sustancias que interfieran. (Farmacopea Francesa (1949) Primer Suplemento (1954).

Requiere unos 2 mg de Cianocobalamina, que se disuelven en agua y se lleva la solución a un espectro fotómetro, donde se determina su poder absorbente.

La Vitamina B₁₂ presenta dos máximos característicos de absorción a los 3610 y 5500 Å y un mínimo a los 4300 Å.

Para determinar la pureza de una muestra de B₁₂ se miden las relaciones de absorción en los distintos máximos. Para un producto puro se obtienen los valores:

$$\begin{array}{r}
 1\% \\
 E \quad 1 \text{ cm}
 \end{array}
 \begin{array}{l}
 \frac{E \quad 3610 \text{ Å}}{E \quad 5500 \text{ Å}} = 3,24 \\
 \\
 \frac{E \quad 5500 \text{ Å}}{E \quad 4300 \text{ Å}} = 2,9
 \end{array}$$

En tal caso, se determina el poder absorbente para la radiación de 3610 Å.

El porcentaje de cianocobalamina para el producto anhidro será:

$$\frac{100 \times \text{poder absorbente}}{0,0207 \times \text{peso de muestra} \times (100 - \text{humedad de la muestra})}$$

2) Ensayo extractivo espectrofotométrico usando Vitamina B₁₂ marcada:

Para determinar el contenido de Vitamina B₁₂ en mezclas complejas se recomienda el empleo de Vitamina marcada, con cobalto radioactivo.

El método sirve para valorar Cianocobalamina y Cobalamina (es decir, Cianocobalamina y los análogos transformables en Cianocobalamina por tratamiento con ion -CN).

Se agrega Vitamina B₁₂ marcada en cantidades conocidas a la muestra en estudio, pues dado el tratamiento extractivo energético a que se la somete para eliminar impurezas, puede perderse parte de la Vitamina

El porcentaje de Vitamina que persiste se calcula en base al

porcentaje de Vitamina radioactiva remanente.

La concentración de Vitamina se determina por medición con el espectrofotómetro. Se leen las máximas de absorción a los 3610, 4300 y 5500 Å. Se considera que la eliminación de sustancias extrañas es satisfactoria cuando $\frac{E_{3610 \text{ Å}}}{E_{5500 \text{ Å}}} = 3,0-3,5$ y $\frac{E_{5500 \text{ Å}}}{E_{4300 \text{ Å}}} = 2,5-2,9$.

Luego, se calcula la concentración de Vitamina B₁₂ en base a la absorción a 3610 Å y a 5500 Å, en la forma explicada anteriormente.

3) Ensayo de distribución en contra corriente:

Este método de análisis es útil para distinguir la Vitamina B₁₂ de los otros análogos en soluciones acuosas.

Se emplean como reactivos: alcohol bencílico saturado con agua, agua saturada con alcohol bencílico y alcohol U.S.P.

Se realiza una distribución de la muestra que contiene Vitamina entre fase acuosa (agua saturada con alcohol) y fase alcohólica (alcohol saturado con agua) siguiendo el procedimiento de contra corriente y luego de agregar alcohol U.S.P. a cada fase, se determina el poder absorbente de las 16 fases separadas, para 3610 Å, por comparación con un blanco preparado agregando alcohol U.S.P. a agua saturada con alcohol y alcohol saturado con agua.

Se expresa como porcentaje de Vitamina B₁₂ anhidra.

Métodos Químicos:

1) Determinación del cianuro: Las determinaciones colorimétricas del cianuro se adaptan al ensayo de la cianocobalamina específicamente, o del total de las cobalaminas.

a) Determinación de Cianocobalamina solamente:

El método se basa en la liberación cuantitativa del grupo CN de la Vitamina B₁₂ por iluminación con luz visible, y el subsiguiente aislamiento y determinación colorimétrica del H.C.N. liberado. Requiere una muestra que contenga de 2 a 20 mcg de Vitamina B₁₂.

La lectura se hace con un espectrofotómetro a los 6200 Å .

b) Determinación de Cobalamina total:

El método se basa en que todas las cobalaminas pueden convertirse cuantitativa mente en Cianocobalamina por tratamiento con ion CN.

La Vitamina B₁₂ formada se determina en la forma antedicha, después de eliminar el exceso de HCN libre por aereación.

2) Determinación del dicianuro:

Este procedimiento se aplica a la valoración del contenido total de cobalaminas en caldos de fermentación y en concentrados crudos.

Se basa en la diferencia existente entre el espectro visible de la Vitamina B₁₂ y el del complejo dicianurado que se forma en soluciones que contienen un exceso de iones CN.

Requiere una muestra de aproximadamente 200 mcg de Vitamina B₁₂

3) Determinación del Cobalto:

La Vitamina B₁₂ contiene 4 % de cobalto. El dosaje de este elemento puede por lo tanto informar sobre la riqueza de un producto en Vitamina B₁₂.

En realidad, este procedimiento, útil para seguir la concentración en un extracto, es inaplicable para un dosaje preciso, porque es incapaz de diferenciar los fragmentos cobálticos de descomposición de la Vitamina intacta.

HARTLEY propone dosar el cobalto contenido en un extracto butílico de la materia prima hidrolizada.

FANTES preconiza un dosaje por estimación fotoeléctrica del éster octílico del ácido obtenido por hidrólisis ácida de la Vitamina, pero este procedimiento no es aplicable más que a extractos ricos en Vitamina B₁₂ a causa de la importancia de las coloraciones parásitas.

Métodos Biológicos y Microbiológicos:

Los métodos más empleados para la valoración de la Vitamina B₁₂ son los biológicos y microbiológicos. Presentan las mismas ventajas y desventajas que se encuentran en las técnicas usadas para otras Vitaminas. Los métodos biológicos son lentos, caros y más difíciles de llevar a cabo desde el punto de vista del personal y el equipo. Por otra parte, las respuestas de los animales pueden dar una medida más específica de la cantidad de Vitamina presente.

Los métodos microbiológicos son más rápidos, menos caros, y requieren personal no tan experimentado una vez que el método está establecido.

Los métodos biológicos emplean entre otros animales de experimentación: la rata, el ratón y el pollo.

En el ensayo de la rata se mide la actividad de la Vitamina B₁₂ en términos de una respuesta del peso de los animales alimentados con preparados ricos en tiroides durante un período que va de 7 a 30 días según los autores (REGISTER y colaboradores, 1949; EMERSON y colaboradores 1949; FROST y colaboradores, 1949), aló que luego se les suministra un suplemento de Vitamina B₁₂ por vía oral o parenteral diariamente o tres veces por semana, durante 14 a 15 días.

La dieta rica en tiroides retarda el desarrollo de los animales y este retardo se vé corregido al agregar Vitamina B₁₂ a la dieta.

Trabajando con un control de Vitamina B₁₂ además del desconocido, se logran resultados cuantitativos.

El ensayo con ratones (BOSSHARDT y colaboradores, 1949), creado para el APF, es muy semejante al ensayo de crecimiento en ratas para la Vitamina B₁₂ y sirve para igual fin.

Respecto al ensayo con pollos, la Vitamina B₁₂ fué estudiada antes de ser aislada, como el factor de crecimiento de pollos en el estiércol de vacas (RUBIN y colaboradores, 1946-1947-; BIRD y colaboradores 1948).

Este ensayo presenta la particularidad de que la Vitamina B₁₂ puede transmitirse de la gallina al pollo a través del huevo, por lo tanto deben administrarse dos dietas: una ración de mantenimiento para las gallinas de cría y una ración básica para los pollos de ensayo.

Los pollos se someten a una dieta de agotamiento durante dos

semanas (BIPD y colaboradores, .1948; NICHOL y colaboradores, 1949), y luego se les administra el suplemento en ensayo.

Otros autores les administran el suplemento casi desde el principio, para impedir la mortalidad.

En todos estos ensayos se usa un control positivo (animales en cuya alimentación interviene la Vitamina B_{12}) y otro negativo (animales que reciben dietas privadas de Vitamina B_{12}), y los resultados se expresan representando el aumento de peso en función del logaritmo de la dosis de Vitamina B_{12} suministrada.

Los métodos microbiológicos: se basan en la observación de que ciertos microorganismos requieren Vitaminas específicas para crecer.

Usando un medio basal completo en todos los aspectos menos en la Vitamina en ensayo, las respuestas de crecimiento del organismo se comparan cuantitativamente en las soluciones patrón y desconocida.

En la técnica de valoración en tubos, la acidez (caso de los bacilos del ácido láctico) o la turbidez producida por el organismo se miden para determinar el grado de crecimiento y por lo tanto la cantidad de Vitamina en la solución problema.

Posteriormente se crearon otras dos técnicas: el método de la placa y el procedimiento bioautográfico.

El método de la placa (WILLIAMS, 1948) es semejante al empleado para valorar antibióticos, claro que en este caso se emplea un medio sin Vitamina B_{12} y se miden zonas de crecimiento y no de inhibición.

La técnica bioautográfica, de WINSTEN y EIGEN (1949), emplea la cromatografía en papel para separar los componentes de una mezcla después de lo cual, el cromatograma desarrollado se aplica a un agar (sin Vitamina B_{12}) sembrado, y sobre el agar se observarán puntos de crecimiento según los valores R_f de los componentes activos de la mezcla.

Los métodos microbiológicos han sufrido un desarrollo rápido y variado. Muchos de los primeramente propuestos no han sobrevivido a través del estudio y aplicación en muchos laboratorios, y en cambio han surgido otros de mayor especificidad.

La Vitamina B_{12} fué determinada por primera vez microbiológicamente por M. SHORB (1947) y por SHORB y BRIGGS (1948) empleando *Lactobacillus lactis* Dorner como organismo sensible.

Otros investigadores que intentaron emplear el mismo germen se encontraron con una dificultad :el *Lactobacillus lactis* Dorner no siempre requería Vitamina B₁₂ para crecer.

Se atribuyó esto a la disociación del *Lactobacillus lactis* en una variante que presentaba esa propiedad, y también a la presencia de extractos impuros de sustancias inhibitoras, como serina, ácido para-aminobenzoico, xantina, Fe SO₄, Na Cl, Mn SO₄, altas concentraciones de ácido fólico, etc, pero posteriormente se observó que era una función de la tensión de oxígeno. En condiciones total o parcialmente anaeróbicas, el *Lactobacillus lactis* no necesita Vitamina B₁₂ para crecer. Por lo tanto, debe cuidarse de mantener las condiciones aerobias del medio para lograr la validez del ensayo.

La timidina, el ácido ascórbico y los desoxirribosidos alteran la respuesta del *Lactobacillus lactis* a la Vitamina B₁₂, pues se agregan a la Vitamina realmente existente, esta interferencia se nota más en los ensayos en placa que en tubo, pero el agregado de un 2% de Na Cl al medio básico empleado en la valoración provoca la formación de anillos difusos con los desoxirribosidos, los cuales pueden distinguirse del crecimiento provocado por la Vitamina B₁₂.

El *Lactobacillus lactis* Dorner responde también a los análogos de la Vitamina B₁₂.

Se han propuesto distintos métodos para la valoración de Vitamina B₁₂ usando *Lactobacillus lactis*:

- 1) Método de SHORB y BRIGGS (1948); empleando *Lactobacillus lactis* Dorner (ATCC 8000).
- 2) Método de GREENE, BROOK y Mc CORMACK; empleando *Lactobacillus lactis* Dorner (ATCC 8000).
- 3) Método de CASWELL, KODITSCHER y HENDLIN; empleando *Lactobacillus lactis* Dorner, 6^a variante-
- 4) Método de FOSTER, LALLY y WOODRUFF; empleando *Lactobacillus lactis* Dorner (ATCC 10697).

Sólo en el cuarto método se realiza el ensayo en placa, en los demás en tubo, y la respuesta en éstos era leída en unos casos turbidimétricamente, y en los otros por titulación con Na OH 0,05 N.

El medio básico era complejo y en general estaba constituido

por: Hidrolizado de caseína, una mezcla de aminoácidos, sales minerales vitaminas (excepto la Vitamina B₁₂), ácidos orgánicos, glucosa, derivados de la purina y pirimidina, con variantes según los autores.

Los inconvenientes encontrados en la valoración con *Lactobacillus Lactis Dorner* determinaron que se buscara otro microorganismo más estable y selectivo. El primero que se propuso fue el *Lactobacillus leichmannii* (ATCC 4797) originariamente empleado en la medida del APF. Al comprobarse la similitud de este factor con la Vitamina B₁₂, SKEGGS y colaboradores (1948) sugirieron su empleo en la medición de esta Vitamina, reconociendo nuevamente la influencia del ácido ascórbico y del aire, señalada por SHIVE:

Calentando en autoclave a 120 °C durante 15 minutos se reducen sus efectos al mínimo.

Durante la esterilización se destruye parte de la Vitamina B₁₂ lo cual se evita agregando ciertos agentes reductores: ácido tioglicólico, cisteína, glutatión, ácido tiomálico (este último, estimulante del crecimiento del *Lactobacillus leichmannii*). Posteriormente se observó que los ácidos cítrico, oxalacético, fumárico y málico eran también estimulantes, y que el ácido tiomálico actuaba simultáneamente como agente reductor y como fuente de ácidos dicarboxílicos (SKEGGS y colaboradores, 1949 -1950).

SMELL y colaboradores (1948) observaron que la timidina puede reemplazar a la Vitamina B₁₂ en la nutrición del *Lactobacillus leichmannii*.

KITAY y colaboradores (1949) informaron que los desoxiribosidos de la hipoxantina, adenina o citosina también podían reemplazar a la Vitamina B₁₂, tal como la timidina. La interferencia provocada por los desoxiribosidos es más notable cuando se practica el ensayo en placa.

Se intentó eliminar la respuesta a los desoxiribosidos agregando un 2% de NaCl al medio básico, pero este método que daba buenos resultados con el *Lactobacillus lactis Dorner*, no puede emplearse con el *Lactobacillus leichmannii* pues la sal inhibe la respuesta de éste no sólo a los desoxiribosidos sino también a la Vitamina B₁₂. También inhibe parcialmente la respuesta a la timidina.

El *Lactobacillus leichmannii* responde también a los análogos

de la Vitamina B₁₂.

COHEN y BENNETT, para corregir la influencia de los desoxirribosidos, en un ensayo en placa agregan un 2% de K₂ SO₄ al medio básico e informan que se producen zonas difusas alrededor de los desoxirribosidos, las que se diferencian fácilmente de las zonas de crecimiento definidas producidas por la Vitamina B₁₂.

Diversos autores han propuesto métodos para la determinación microbiológica de la Vitamina B₁₂ empleando el *Lactobacillus leichmannii*:

- 1) Método de WINSTEN y EIGEN, empleando *Lactobacillus leichmannii* 313 (ATCC 7830).
- 2) Método de PEELER, YACOWITZ y NORRIS; empleando *Lactobacillus leichmannii* (ATCC 4797).
- 3) Método de HOFFMANN y colaboradores; empleando *Lactobacillus leichmannii* 313 (ATCC 7830).
- 4) Método de SKEGGS y colaboradores; empleando *Lactobacillus leichmannii* (ATCC 4797).
- 5) Método THOMPSON, DIETRICH y ELVEHJEM; empleando *Lactobacillus leichmannii* (ATCC 4797).
- 6) Método de COHEN y BENNETT; empleando *Lactobacillus leichmannii* (ATCC 4797).

Los cinco primeros realizan el ensayo en tubo y sólo el sexto (y el primero cualitativamente) en placa.

La importancia del primer método radica en que emplea la técnica bioautográfica (combinación de cromatografía y ensayo microbiológico).

Los métodos 2º, 3º, 4º y 5º emplean la respuesta turbidimétrica que en el 4º se complementa con una titulación de la acidez producida con Na OH 0,1 N.

Los medios básicos son semejantes a los empleados para el *Lactobacillus lactis* Dorner, aunque más complejos.

Además de los *Lactobacillus*, se emplean otros microorganismos en la valoración de la Vitamina B₁₂.

Entre ellos la *Euglena gracilis*.

HUTNER y colaboradores (1949) descubrieron que la *Euglena gracilis*, variedad *bacillaris* (flagelado relacionado con las algas

requiere Vitamina B₁₂ para su desarrollo, y crearon un método para la determinación de la Vitamina.

El equipo incluye un incubador de baja temperatura, diseñado de modo de poder exponer los cultivos a la luz (posteriormente se ha observado que la sensibilidad a la cianocobalamina de la *Euglena gracilis* creciendo en la luz y en la obscuridad es aproximadamente la misma).

La *Euglena* no responde a la timidina y crece bien en un medio básico químicamente definido, que incluye: sales minerales, ácidos glutámico y málico y tiamina (HUTNER y colaboradores, 1950).

En ensayo se realiza en tubos y la respuesta se mide determinando la densidad óptica.

Escherichia coli:

SHIVE y colaboradores han creado un método de valoración empleando el *Escherichia coli*.

Se basa en la capacidad de la Vitamina B₁₂ para invertir la inhibición provocada en el *Escherichia coli* por la sulfanilamida.

El medio básico empleado contiene Vitaminas, Sales minerales ácidos orgánicos, aminoácidos, glucosa y derivados pirimidínicos y purínicos.

El ensayo se realiza en placa.

Un defecto de este método consiste en que el germen responde a la metionina.

(La Farmacopea Francesa (1949) Primer Suplemento (1954), indica en empleo de *Escherichia coli*).

Ochromonas y Poteriochromonas:

Las crisomonadas pertenecen al grupo de organismos fotosintéticos de color marrón, que comprenden las algas marinas marrones, diatomeas, y varios grupos de flagelados que forman el plankton del mar.

Están muy próximos a los metazoarios.

El tipo de requerimiento de Vitamina B₁₂ experimentado por los crisomonadas es muy semejante al de aves y mamíferos, de ahí su importancia como organismo de ensayo, pues los resultados de las valoraciones generalmente se interpretan en función de los requerimientos humanos o de animales superiores.

La *Poteriochromonas stipitata* se asemeja a la *Ochromonas malhamensis* en que no responde a los compuestos semejantes a la Vitamina B₁₂ que son activos para el *Escherichia coli* y *Lactobacillus leichmannii* (BARBER y colaboradores, 1953).

Como sucede con los animales superiores, el requerimiento de Vitamina B₁₂ no se satisface con metionina. Tampoco interfieren los desoxirribosidos.

Bacillus Stearothermophilus:

Los Bacilos termofílicos, (cuyo rango de crecimiento está entre 40 y 80 °C), presentan nuevas posibilidades bioquímicas pues los medios incubados por encima de 55 °C están virtualmente libres de contaminación microbiana. Por lo tanto, no requieren ser esterilizados por calentamiento, evitando así correr el riesgo de destruir formas termolábiles de la Vitamina.

Además, el crecimiento de estas bacterias en placas de agar es abundante y las hace muy útiles como reactivos bioautográficos.

Un defecto consiste en su respuesta a la metionina, y en algunas cepas también al ácido fólico.

"Lochhead 38" (Arthrobacter ? sp).

LOCHHEAD y THEXTON (1951-1952) observaron que un 4% de los organismos aislados del suelo en extracto de levadura y extracto de suelo requerían Vitamina B₁₂.

Una de estas cepas: ("Lochhead 38") crecía bien en un medio básico simple y presentaba una especialidad hacia los miembros de la familia B₁₂ que recordaba la del *Ochromonas* (no responde a los factores A y B).

El requerimiento de Vitamina B₁₂ es semejante al de los animales superiores (claro que se diferencia por la inhibición ante los compuestos semejantes a la Vitamina B₁₂) y no al de ninguna otra bacteria.

Crece rápidamente en placas de agar y puede ser un reactivo bioautográfico de utilidad.

Además, presenta la posibilidad de poder reconstruir el ciclo de la Vitamina B₁₂ en el suelo.

Phormidium persicinum

No se ha estudiado en detalle el requerimiento de Vitamina B₁₂ de esta alga, pero según trabajos de PROVASOLI y PINTNER (1954), el medio básico permite una respuesta cuantitativa a la cobalamina .

Una dificultad que se opone a su empleo en los ensayos de rutina consiste en su crecimiento lento y su hábito filamentososo.

De todos modos puede ser útil para trazar el ciclo de la Vitamina B₁₂ en el mar.

A continuación, se resumen en un cuadro las características de los organismos descriptos:

Organismo	Biología	Reemplazo posible de B ₁₂ por: Metionina - Desoxiribosidos			
Bacterias:					
L. leichmanniana	- productores de	-	-	-	-
y L. lactis	- ácido láctico	-	0	-	+
E. coli 113-3	- anaerobio estricto	-	+	-	0
B. stearothermophilus	- aerobio, termofílico estricto	-	+	-	0
Arthrobacter sp ("Lochhead 38")	- aerobio estricto	-	0	-	0
Algas azules-verdes:					
P. persicinum	- marino, fotosintético estricto	-	0	-	0
Algas flageladas:					
Euglena gracilis	- verde, fotosintética facultativa	-	0	-	0
Ochromonas y Poteriochromonas	- marrones, fotosintéticas facultativas, fagotróficas	-	escaso	-	0
Aves y mamíferos	-	-	escaso	-	0

II - PARTE EXPERIMENTAL

S I S T E M A S D E F E R M E N T A C I O N E M P L E A D O S ,

D E S C R I P C I O N

SISTEMAS DE FERMENTACION EMPLEADOS.- DESCRIPCION

En el presente trabajo se emplean dos sistemas de fermentación: Fermentación por cultivo en superficie y Fermentación sumergida con el objeto de observar la producción de Vitamina B₁₂ en ambos casos.

Comparando los dos métodos puede anotarse que si bien la fermentación por cultivo en superficie emplea elementos más simples y de fácil control, la fermentación sumergida permite un gran ahorro de espacio pues el germen productor crece en todo el volumen del medio de fermentación, dado que la aereación forzada y la agitación consiguiente así lo permiten. Se logra también en esta forma un mejor aprovechamiento del medio de fermentación.

La técnica seguida para realizar las fermentaciones es ésta:

Se mantiene la cepa stock en un medio de agar.

Se transfieren esporas del cultivo stock a un medio de germinación.

Se incuba el medio de germinación en estufa a la temperatura conveniente para el germen en ensayo, y una vez que éste ha desarrollado, se emplea el mismo como inóculo de un medio de fermentación.

Este se incuba también en estufa y del mismo se extraen muestras periódicamente para determinar en ellas el pH y la Vitamina B₁₂ producida. El pH se determina colorimétricamente. La técnica de valoración de la Vitamina se detalla en el capítulo correspondiente.

Todas las fermentaciones se realizan por triplicado y las curvas de valoración y pH son valores promedio.

Equipo empleado:

Para la fermentación por cultivo en superficie se emplean botellas de caras planas de 1 litro de capacidad, cuyas caras de mayor tamaño son de 12 cm x 11 cm, con una superficie de 132 cm².

Las botellas se cargan con 200 cm³ de caldo, por consiguiente la relación de área a volumen (s/v) es de 0,66.

Tratándose de gérmenes aerobios, se tiende a hacer la relación s/v lo mayor posible, pues el micelio se extiende cubriendo la superficie del caldo y por consiguiente la producción aumenta al aumentar la superficie.

El inóculo se prepara en botellas que presentan las mismas características.

Para la fermentación sumergida se utilizan como fermentadores, balones de tres bocas de 5 litros de capacidad, de vidrio Pyrex, que se cargan con 3 litros de caldo.

La boca central del balón se obtura con un tapón de goma perforado, atravesado por un tubo de vidrio. El extremo superior de este tubo se conecta con un tubo de goma que conduce el aire estéril proveniente de un compresor y lo inyecta a presión al seno del balón, y el extremo inferior que penetra casi hasta el fondo del balón tiene un ensanchamiento en forma de embudo, que recubierto con un trozo de gasa permite una mejor distribución del aire inyectado.

Una de las bocas laterales está obturada con un tapón de goma perforado atravesado por un tubo recto de vidrio de 1,2 cm de diámetro que permite la salida del aire y el agregado del inóculo y sustancias antiespumantes. El extremo superior del tubo se obtura con un tapón de algodón recubierto con gasa. El extremo inferior penetra unos pocos centímetros por debajo del tapón de goma, pues no debe alcanzar a tocar el medio de fermentación.

La segunda boca lateral está obturada con un tapón de goma perforado atravesado por un tubo de vidrio de 0,5 cm de diámetro, que penetra en el balón casi hasta el fondo, y que en la parte superior que sobresale del balón lleva un codo en ángulo agudo algo estrangulado, en cuyo extremo se adapta un tubo de goma corto cerrado con una pinza de Mohr. Este tubo se utiliza para sacar muestra, pues obturando el tubo de salida del aire, la sobrepresión creada por el aire dentro del balón hace que, al abrir la pinza de Mohr, ascienda el líquido dentro del tubo saca-muestra hasta salir por el extremo abierto, de donde se lo recibe dentro de un tubo de ensayo estéril previamente flameado a la llama.

El tubo saca-muestra ha sido diseñado tratando de reducir al mínimo las posibilidades de contaminación con el ambiente.

Para proveer de aire al sistema se emplea un compresor impulsado por un motor eléctrico trifásico de 5 HP y 1425 r.p.m., que puede alcanzar una presión máxima de 13,6 atmósferas.

El aire sale del compresor conducido por un caño de hierro de $\frac{1}{2}$ pulgada de diámetro, en cuyo recorrido se intercala un filtro

cilíndrico de hierro relleno con lana mineral y algodón, destinado a impedir que el aire arrastre aceite y cualquier otro cuerpo extraño.

El tubo que sale del filtro llega a un sistema formado por dos llaves (una para reducir la presión del aire que viene del compresor y otra para dar salida al aire que vá hacia los fermentadores), y dos manómetros (uno donde se lee la presión del aire que viene del compresor, y otro que indica la presión del aire que vá a los fermentadores).

Luego continúa un tubo de hierro con varios grifos espaciados en su longitud.

De uno de estos grifos, por medio de un tubo de goma llevamos el aire a un medidor de caudal de paletas, y de allí a un frasco de burbujeo con agua, para saturarlo de humedad, con el fin de impedir la evaporación excesiva del medio de cultivo. Este frasco se conecta por medio de un tubo de goma a un filtro abrusado de vidrio relleno con algodón esterilizado, y éste se une mediante un tubo de goma al tubo de vidrio que penetra en el balón por la boca central.

Este sistema empleado para realizar fermentaciones sumergidas se puede observar en el esquema que se acompaña en el capítulo correspondiente.

En la preparación del inóculo para una fermentación sumergida se utiliza como recipiente un frasco de Mariotte de 1 litro de capacidad, donde se coloca el medio de germinación. La abertura inferior del frasco se obtura con un tapón de goma atravesado por un tubo de vidrio acodado en ángulo recto. El extremo libre del codo se conecta por medio de un tubo de goma a otro tubo de vidrio que termina por un extremo afilado cubierto por una campana. El tubo de goma que une los dos tubos de vidrio se cierra con una pinza de Mohr.

Para incubar los distintos medios a la T óptima para cada germen se dispone de estufas de cultivo, cuyas temperaturas se controlan por medio de un termoregulador a dilatación provisto de lámpara piloto. El sistema de calentamiento de una de estas estufas está constituido por 4 lámparas eléctricas de 25 vatios, y el de la otra por una resistencia desarrollada uniformemente en la base y aislada en

forma conveniente.

Cuando se realizan fermentaciones sumergidas, los tubos de goma que conducen el aire al balón fermentador se introducen en las estufas a través de orificios practicados convenientemente en las mismas.

En la preparación del inóculo destinado a una fermentación sumergida se recurre a la incubación con agitación.

El aparato agitador se observa en el esquema incluido en el capítulo correspondiente.

Consiste en un cajón de madera colocado dentro de una estufa de cultivo, unido mediante varillas de hierro por un extremo al techo de la estufa y por el otro, en forma excéntrica, a una polea accionada por un motor eléctrico de $\frac{1}{4}$ HP que la hace girar a razón de 70 r.p.m. Este sistema hace que el cajón se mueva en un plano horizontal con movimiento de vaivén.

La razón de emplear la incubación con agitación reside en que éste sistema de fermentación tiene muchos puntos de contacto con la fermentación sumergida, y por consiguiente el germen se acostumbra así previamente a condiciones de vida similares a las imperantes en esta última.

- S E L E C C I O N D E C E P A S P R O D U C T O R A S

SELECCION DE CEPAS PRODUCTORAS

Con el objeto de estudiar la capacidad productora de Vitamina B₁₂ ensayamos las siguientes cepas:

- 1) *Streptomyces griseus*: Krainsky-Cepa *Actinomyces griseus* Kr U.C.T.C. ,6961, que en los Laboratorios Ocefa lleva el N° 124(L.O 124).
- 2) *Streptomyces olivaceus* NRRL B-1125 (L.O. 194)
- 3) *Streptomyces olivaceus* NRRL B-1125 (L.O.215)
- 4) *Bacillus brevis* procedente de Tucumán N° 307 (L.O.195).
- 5) *Bacillus brevis* ATCC 10.068 . Cepa J.C.Lewis.Western Regional Laboratory.

BREED ,MURRAY y HITCHENS.(Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, en su sexta edición (1948) describen las cepas citadas en esta forma:

Streptomyces olivaceus. (Waksman) (*Actinomyces* 206, Waksman (1919); *Actinomyces olivaceus* Waksman (1923).

Del latín: de color oliva.

Pequeños grupos, con hifas rectas y ramificadas. Sin espirales en la mayoría de los medios. Conidios esféricos y ovales, de 0,9 a 1,1 por 0,9 a 2,0 micrones.

Gelatina en punción: Hay liquefacción con un sedimento escamoso amarillo.

Agar sintético: Crecimiento abundante, extendido, desarrollándose profundamente en el medio, amarillo a ocre oliva, reverso amarillo a casi negro. Micelio aéreo gris a parduzco claro.

Agar-almidón: Crecimiento extendido, delgado, verde amarillento.

Agar-glucosa: Crecimiento abundante, limitado, entero, el centro elevado.

Agar simple: Crecimiento blanco, brillante.

Caldo-glucosa: Anillo amarillo-azufre.

Leche litmus: Crecimiento pobre, rosado; coagulado; peptonizado volviéndose alcalino.

Papa: Crecimiento abundante, muy arrugado, elevado, gris, volviéndose amarillo-azufre en los bordes.

Produce nitritos con los nitratos.

El pigmento formado es insoluble.

Hidroliza el almidón.

Es aerobio.

Temperatura óptima: 25 °C.

Habitat: el suelo.

Streptomyces griseus. (Krainsky) (Actinomyces griseus Krainsky (1914)).

Del M.L. griseus: gris.

Filamentos ramificados; se han observado unas pocas espirales.
Conidios en forma de varillas a cilindros cortos, 0,8 por 0,8 a 1,7 micrones. Micelio aéreo gris-verdoso.

Gelatina en punción: Crecimiento superficial amarillo-verdoso o de color crema, con tinte amarronado. Liquefacción rápida.

Agar sintético: Crecimiento extendido fino, incoloro, volviéndose color piel oliva. Micelio aéreo espeso, pulverulento, verde agua.

Agar almidón: Crecimiento delgado, extendido, transparente.

Agar glucosa: Crecimiento elevado en el centro, radiado, color crema al naranja, margen elevado.

Agar simple: Crecimiento abundante, color-crema, casi transparente.

Caldo glucosa: Película abundante, amarillenta con tinte verdoso, muy arrugada.

Leche litmus: Anillo color-crema; coagulado con peptonización rápida, volviéndose alcalino.

Papa: Crecimiento amarillento arrugado.

Produce nitritos con los nitratos.

El pigmento formado es insoluble.

Hidroliza el almidón.

Es aerobio.

Temperatura óptima: 37 °C.

Distintas cepas de este organismo producen distintos antibióticos. Uno de éstos la estreptomicina, se ha aislado en forma cristalina.

Es activo contra gran número de bacterias y actinomicetas pero no contra hongos y virus. No es muy tóxico para animales, y ha encontrado aplicación extensiva en el tratamiento de varias enfermedades, la mayoría causadas por bacterias gram-negativas y ciertas formas de tuberculosis.

Fuente: tierra de jardín. Habitat: tierra.

Bacillus brevis. Migula emend. Ford.

Del latín: brevis: corto.

Sinónimo: *Bacillus centrosporus* Ford, Jour. Bact., 1, 524, (1916).

Hay alguna duda respecto a la identidad del *Bacillus brevis* de Migula, que originariamente era el *Bacillus* N^o I Neide de Flüge (Cent. f. Bakt., II Abt., 12, 1904, 337) también rebautizado organismo de Flüge. El lo llamó *Bacillus lactis* y lo describió lo suficiente como para reconocerlo como una cepa de *Bacillus cereus*. Ford creía que sus aislamientos a partir de leche, suelo y tierra, estaban de acuerdo con la descripción de Migula del *Bacillus brevis*. La interpretación de Ford ha sido aceptada. La especie aparentemente ha quedado bien establecida en Europa (Gibson y Topping, Soc. Agric. Bact. British, Abstr. Proc., 1938-43), así como en América.

Descripción de Ford y de Smith, Gordon y Clark.

Esporas: elipsoidales, de 1,0 a 1,3 por 1,5 a 2,0 micrones, centrales a subterminales. Las paredes de las esporas gruesas y coloreables. Una cepa ocasional muestra la relación de estas especies con el *Bacillus laterosporus* en que algunas de las esporas pueden ser laterales, y remanentes del esporangio pueden adherirse a un lado de la espora.

Esporangio: definitivamente hinchado, forma ahusada - forma de clava.

Bacilos: 0,4 a 0,8 por 1,5 a 5 micrones, con extremos afilados, encontrándose solos o en pares. En agar glucosa, las células contienen numerosos globulos de grasa pequeños. Móviles. Gram-variables.

Gelatina en punción: Liquefacción lenta.

Colonias en agar: delgadas, chatas, translúcidas, suaves, se extienden rápidamente en la placa.

Agar inclinado: Crecimiento liso, húmedo, extendido blanco grisáceo.

Caldo: Generalmente turbidez uniforme pesada, a veces con una película frágil. Los cultivos en caldo glucosa tienen un pH de 8,0 a 8,6 después de 7 días.

Leche: peptonizada.

Agar leche en placa: caseína hidrolizada.

Papa: crecimiento escaso a moderado, chato, extendido, liso, amarillo - crema a rosado a amarronado. Generalmente forma nitritos con los nitratos.

No hidroliza el almidón.

Produce ácido (con N amoniacal) a partir de la glucosa, fructosa, maltosa y sacarosa. Generalmente ácido a partir de galactosa y glicerol. La reacción es variable sobre rhamnosa y manitol. No forma ácido a partir de arabinosa, xylosa, manosa, lactosa, rafinosa, inulina, dextrina y salicina.

Con N orgánico, el ácido formado a partir de los carbohidratos está enmascarado por la alcalinidad debida a la proteolisis.

No se produce acetil - metil - carbinol.

Los citratos generalmente se utilizan como única fuente de carbón.

Temperatura óptima: alrededor de 30°C.

Temperatura máxima que permite el crecimiento: varía desde 43°C hasta 54°C.

Produce antibiótico (Tirotricina, Gramicidina, ver Dubos y Hotchkiss, Jour. Exp. Med., 73, 1941, 629)

Aeróbico.

Fuente: de leche (Flügge); de leche, suelo y tierra (Ford).

Habitat: ampliamente distribuido en el suelo, agua, polvo, leche, etc.

Para mantener las cepas de *Streptomyces griseus* y *Streptomyces olivaceus* empleamos los siguientes medios:

I) Agar vitamínico.

II) Medio de Bennett adicionado de agar. (Medio indicado para *S. olivaceus* en los trabajos de HALL y colaboradores (1953), HESTER y WARD (1954), y PFEIFER y colaboradores (1954)).

Ambos medios en pico de flauta.

La composición del agar vitamínico es la siguiente:

a) Caldo común compuesto por:

Peptona de carne: 10 g

Extracto de carne: 10g
 NaCl: 2,5g
 Na₂HPO₄: 1,3g
 Agua destilada, c.s.p: 1 litro

- b) Extracto de tomate: 30g
 c) Extracto de levadura: 2g
 d) Glucosa: 5g
 e) Extracto de hígado 1:100:2g
 f) Jarabe polivitamínico 2cc.

Se ajusta el pH a 7 - 7,2 empleando el potenciómetro de Leeds & Northrup, se agregan al medio 15gr de agar y se hierve 30 minutos; se lleva a 1 litro, se filtra por algodón en caliente y se reparte en tubos. Estos se esterilizan a 1 atmósfera de presión manométrica durante 30 minutos, se dejan enfriar en pico de flauta y en ellos se siembran los gérmenes con ansa de platino o cantal.

El jarabe polivitamínico tiene la siguiente fórmula:

Extracto hepático titulado en Vitamina	
B ₁₂ (25 ug/g) y ácido fólico	12,50g
Vitamina B ₁	0,02g
Vitamina B ₂	0,01g
Vitamina B ₆	0,005g
Vitamina C	0,05g
Nicotinamida	0,10g
Acido glutámico	1,0g
Sacarato de hierro	5,0g
Ca(H ₂ PO ₄) ₂ ·H ₂ O	1,0g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,01g
MnSO ₄ ·5H ₂ O	0,005g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05g
CoSO ₄ ·7H ₂ O	0,0005g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,0065g
KI	0,001g
NaCl	0,80g.

Sacarosa	60,00g
Acido benzoico	0,20g
Agua destilada, c.s.p.	100,00cc.

La técnica de preparación de la Peptona de carne así como los análisis se detallan en el capítulo correspondiente.

El medio de Bennett tiene la siguiente composición (Journal of Bacteriology, 57 : 141 - 1949)

Extracto de levadura:	1,0g
Extracto de carne:	1,0g
Peptona de caseína:	2,0g
Glucosa:	10,0g
Agua destilada:	1.000,0ml
Ajustar pH a 7,3 con NaOH	

En nuestro caso le agregamos 15g de agar, hervimos todo durante 15 minutos, filtramos por algodón en caliente y repartimos en tubos. Esterilizamos éstos a 1 atmósfera de presión manométrica durante 30 minutos, los dejamos enfriar inclinados y sembramos en ellos los gérmenes con ansa de platino o cantal.

La técnica de preparación de la Peptona de caseína así como los análisis se detallan en el capítulo correspondiente.

Streptomyces griseus: Hacemos repiques mensuales, dejamos desarrollar la cepa a 28 - 30°C durante 3 a 4 días. Mantenemos el cultivo desarrollado en la heladera hasta el próximo repique.

Streptomyces olivaceus: Hacemos repiques mensuales, dejamos desarrollar la cepa a 20 - 28°C durante 3 a 4 días. Mantenemos el cultivo desarrollado en la heladera hasta el próximo repique.

Ya sea que consideremos el S. griseus o el S. Olivaceus, en ambos casos observamos que en las primeras 24 horas, el crecimiento es más rápido en el medio de Bennett, pero pasados 4 ó 6 días (tiempo necesario para que el Streptomyces esporule), los crecimientos son muy semejantes.

Para mantener las cepas de Bacillus brevis usamos agar-caldo pues observamos que en él crecen mejor que en el agar vitamínico.

El agar caldo se prepara así: Macera r 500g de carne magra picada (sin grasa ni aponeurosis) en 1.000ml de agua destilada durante 12 horas en heladera a 4 - 10°C. Hervir durante 15 minutos. Filtrar a través de lienzo, exprimir el residuo y juntar ambos líquidos. Agregar 5g de peptona y 2,5g de NaCl. Calentar hasta disolución y completar a 1.000ml con agua destilada. Ajustar el pH a 7,4 con NaOH 0,1N. Esterilizar a 120°C durante 15 minutos, y dejar a temperatura ambiente 12 horas. Agregar un 2% de agar. Hervir 30 minutos, filtrar por algodón, caliente, y repartir en tubos. Esterilizar a 1 atmósfera de sobrepresión durante 30 minutos, dejar enfriar en pico de flauta y sembrar en ellos los gérmenes con ansa de platino o cantal.

Bacillus brevis Tucumán 307 (L.O. 195) y B. brevis ATCC 10.068:

Hacemos repiques mensuales, dejamos desarrollar la cepa a 37°C durante 4 - 6 días. Mantenemos el cultivo desarrollado en la heladera hasta el próximo repique.

S E L E C C I O N D E M E D I O S D E G E R M I N A C I O N

SELECCION DE MEDIOS DE GERMINACION

Para inocular cada germen al medio de fermentación debe prepararse un cultivo intermedio, el que se realiza en un medio que denominaremos de germinación.

Ensayemos tres medios de germinación:

El primero es el medio indicado por PÉLIER y colaboradores (1954) como medio de germinación para el *Streptomyces olivaceus* NRRL B-1125.

Está compuesto por:

Glucosa:	0,5 %
"Corn steep":	0,5 % (en base a extracto seco)
Co Cl ₂ · 6H ₂ O :	2,0 PPM
Accite de semilla de soya	0,1 %

Ajustar pH a 7,0. Esterilizar 30 -60 minutos a 121 °C.

La modificación introducida consiste en eliminar el aceite de semilla de soya (antiespumante) pues es innecesario en nuestro caso dado que realizamos un cultivo en superficie.

Además cambiamos el Co Cl₂ 6H₂O por nitrato, resultando así la composición:

Glucosa:	0,5%
"Corn steep (x):	0,5% (en base a extracto seco)
Co (NO ₃) ₂ · 6 H ₂ O:	2,4 PPM
Agua destilada	

(x) El "corn steep" empleado es de las Refinerías Argentinas de Maiz, cedido por Squibb. Su extracto seco es de 58,85 gr %, por consiguiente el volumen por agregar es de 8,5 ml. para 100 ml de caldo.

Hervir para disolver los componentes. Ajustar pH a 7,0.

Hervir durante 15 minutos. Filtrar por algodón-Esterilizar 30-60 minutos a 120°C. (La técnica de preparación del "corn steep" así como los análisis se detallan en el capítulo correspondiente)

El segundo medio empleado, es una modificación del medio indicado en el Journal of Biological Chemistry 162 (1946) como medio esporulación para el *Streptomyces griseus*, en una publicación sobre Estreptomicina.

Está compuesto originalmente por:

Glucosa :	1 %
Asparagina:	0,05%
$K_2 H P O_4$:	0,05%
Agar :	1,8 %

En este medio cambiamos la asparagina (que según indican los autores orienta al *S. griseus* hacia la producción de Estreptomina y no de Vitamina B_{12}) por peptona de caseína, y a gregamos $Co (NO_3)_2 \cdot 6 H_2O$ en la misma proporción que en el medio anterior. Además lo empleamos bajo la forma de caldo (sin agar).

La composición es ésta:

Glucosa:	1,0 %
Peptona de caseína:	1,0 %
$K_2 H P O_4$:	0,05 %
$Co (NO_3)_2 \cdot 6 H_2O$:	2,4 PPM.
Agua destilada	

Hervir hasta disolver los componentes. Ajustar pH a 7,0 ; Hervir durante 15 minutos. Filtrar por algodón-Esterilizar 30-60 minutos a 120 °C.

El tercer medio empleado que denominamos caldo vitamínico, fué elegido teniendo en cuenta que tiene la misma composición (excepto el agregado de agar) que el agar vitamínico, y que éste es un medio óptimo para el mantenimiento de los *Streptomyces*-

Su composición es:

a) Caldo común, compuesto por:

Peptona de carne:	10 g
Extracto de carne:	10 g
Na Cl:	2,5 g
$Na_2 H P O_4$:	1,3 g
Agua destilada osp:	1,0 litro

- b) Extracto de tomate : 30 cc
- c) Extracto de levadura: 2 g
- d) Glucosa: 5 g
- e) Extracto de hígado 1:100 2 g
- f) Jarabe polivitamínico : 2 cc

El jarabe polivitamínico utilizado es el mismo que empleamos para la preparación del agar vitamínico, y cuya fórmula se detalló anteriormente. Respecto a la técnica de preparación y análisis de las pepto-

nas de carne y caseína utilizadas, se detallan en el capítulo correspondiente.

El caldo así preparado se hierve durante 30 minutos para facilitar la disolución de los componentes. Se ajusta su pH a 7,7,2 se hierve durante 15 minutos, se filtra por algodón y esteriliza 30 minutos a una atmósfera de sobrepresión.

En el segundo y tercer medio de germinación conviene preparar aparte una solución de glucosa al 50% y esterizarla por separado, ya que si se hace en presencia de fosfatos se produce una caramelización excesiva que puede retardar el crecimiento de los gérmenes. La solución de glucosa se agrega luego al medio asépticamente.

En botellas de vidrio de caras planas de 1 litro de capacidad colocamos 200 ml de los distintos medios de germinación. Agregamos perlas de vidrio (que servirán posteriormente para disgregar el micelio por agitación) y tapamos con tapones de algodón recubiertos de gasa. Esterilizamos en autoclave a una atmósfera de sobrepresión durante media hora.

Una vez fríos los medios de germinación, procedemos a sembrarlos.

Hemos practicado la siembra en 2 formas:

- a) Transfiriendo asépticamente mediante el ansa una porción de esporas del tubo donde se mantiene el germen a la botella que contiene el medio de germinación.
- b) Agregando 1 ml de H_2O estéril al tubo donde se mantiene el germen, agitando el tubo para suspender las esporas y transfiriendo la suspensión de esporas con una pipeta estéril a la botella que contiene el medio de germinación.

Si bien este segundo método permite hacer una siembra más abundante, las posibilidades de contaminación son mayores.

Una vez sembrados los tres medios de germinación con los distintos gérmenes en estudio, incubamos a la temperatura correspondiente: 28-30 °C para *S. olivaceus* y *S. griseus* y 36-37 °C para *Bacillus brevis*.

Para formarnos una opinión sobre la eficacia de cada uno de estos medios como elemento precursor de la fermentación, realizamos las siguientes observaciones:

1) Comparamos el espesor de película de los micelios formados en los distintos medios y la velocidad del desarrollo de los gérmenes en los mismos.

2) Comparamos la velocidad del desarrollo de los gérmenes provenientes de los distintos inóculos en un medio de fermentación que es el mismo en todos los casos, y los títulos de Vitamina B₁₂ que provocan en ese medio.

1) Comparación del espesor de película de los micelios formados en los distintos medios y de la velocidad del desarrollo de los gérmenes en los mismos:

Medio de germinación I: En este medio el *Bacillus brevis* forma una película blanquecina arrugada y de buen crecimiento a las 48 horas de sembrado. El *S. olivaceus* no forma película en este medio sino que se presenta en forma granular repartido en el volumen del medio. Se observa crecimiento a los 3-4 días de sembrado. El *S. griseus* crece en forma granular a las 48 horas de sembrado.

Podemos dar una forma cuantitativa a estas observaciones si asignamos al espesor de película formado valores que van de 1 a 10 y lo relacionamos con el número de días transcurridos para el desarrollo del micelio.

Así, por ejemplo para el *B. brevis* en el medio de germinación I, la relación $e/t = \frac{6}{2}$.

Medio de germinación II: El *B. brevis* crece formando una película a las 48 horas de sembrado. (Relación $e/t = 6/2$). El *S. olivaceus* crece formando una película superficial a los 4 días de sembrado. (Relación $e/t = 2/4$). El *S. griseus* crece formando una capa superficial a las 48 horas de sembrado. (Relación $e/t = 3/2$).

Medio de germinación III: El *B. brevis* forma una gruesa capa dentro de las 48 horas de sembrado. (Relación $e/t = 8/2$). El *S. olivaceus* (L.O. 194) crece generalmente en forma granular, y en ocasiones formando capa superficial, más gruesa que en el medio II. Coincide la formación de película con una buena producción de Vitamina B₁₂ en el medio de fermentación. Crece dentro de los 4 días de sembrado. (Relación $e/t = 6/4$). El *S. olivaceus* (L.O. 215) tarda más en crecer y no forma película. Crece solamente en forma granulada. El *S. griseus* forma una película superficial más gruesa que en el medio II, dentro de las

48 horas de sembrado. (Relación e/t= 6/2.)

2) Una vez que el crecimiento de los distintos gérmenes es satisfactorio empleamos estos cultivos como inóculos de un medio de fermentación que es el mismo en todos los casos, y en el que observamos en forma comparativa la velocidad del desarrollo de los gérmenes provenientes de los distintos inóculos y los títulos de Vitamina B₁₂ que provocan en ese medio de fermentación. (Son fermentaciones en superficie).

La composición del medio de fermentación es la siguiente:

(El medio ha sido indicado por los Doctores LUGONES y MUNDEL para B. brevis, para la producción de Vitamina B₁₂ por fermentación en superficie)

Peptona de carne:	15,0	g
KH ₂ PO ₄ :	1,0	g
K ₂ H PO ₄ :	0,2	g
Glucosa:	40,0	g
Ca Cl ₂ :	1,0	g
Fe SO ₄ 7H ₂ O:	0,003	g
Mg SO ₄ 7H ₂ O:	1,0	g
Zn SO ₄ 7H ₂ O:	0,010	g
Co SO ₄ 6H ₂ O:	0,020	g
Mn SO ₄ 5H ₂ O:	0,003	g
Agua destilada: c.s.p.	1,0	litro

El medio se hierve durante 30 minutos para facilitar la disolución de los componentes, se ajusta su pH a 7-7,5, se hierve durante 30 minutos, se ajusta su volumen al valor primitivo y se filtra por algodón.

Se colocan 200 ml de medio en botellas de 1 litro similares a las ya descritas, se tapan con tapones de algodón recubiertos con gasa y se esterilizan en autoclave durante media hora a 120 °C. Se agrega asepticamente la glucosa esterilizada aparte.

Una vez frío el medio de fermentación procedemos a sembrarlo con los distintos inóculos preparados. Para ello agitamos las botellas que contienen los inóculos con el fin de homogeneizarlos, labor que se vé facilitada por las perlas de vidrio colocadas con tal fin.

Luego, con una pipeta estéril introducimos asepticamente en cada botella que contiene medio de fermentación, 10 cm³ de cada inóculo.

Previamente realizamos un ensayo para decidir sobre el volumen

de inóculo por agregar, en esta forma: a botellas cargadas con medio de fermentación les agregamos 1cm^3 , 5cm^3 , 10cm^3 y 15cm^3 , observando que la velocidad de crecimiento en el medio de fermentación aumenta al crecer el volumen de inóculo, pero al agregar 15cm^3 , el germen consume demasiado rápidamente las sustancias nutritivas del medio de fermentación, produciéndose la lisis prematura del micelio (a los 9 días de iniciada la fermentación). Por esta razón elegimos un volumen de inóculo de 10cm^3 .

Una vez inoculadas las botellas las introducimos en estufa s donde incubamos el medio a las temperaturas correspondientes: $28-30^{\circ}\text{C}$ para los Streptomyces; $36-37^{\circ}\text{C}$ para los Bacillus brevis. Diariamente sacamos muestra asépticamente con pipeta estéril de los distintos medios en las que realizamos determinaciones colorimétricas del pH de los distintos medios y valoramos Vitamina B_{12} según la técnica que se describe en el capítulo correspondiente.

Con el fin de seleccionar los medios de germinación, observamos:

a) Velocidad del desarrollo de los gérmenes provenientes de los distintos inóculos.

Inoculación a partir del medio I de germinación:

El Bacillus brevis tarda 24 Horas en formar una película en el medio de fermentación, y su crecimiento es abundante. (Relación e/t = 6/1)

El S. olivaceus tarda seis días en formar una película en el medio de fermentación. (Relación e/t = 4/6).

El S. griseus tarda 48 horas en crecer, formando película. (Relación e/t = 4/2).

Inoculación a partir del medio II de germinación:

El B. brevis crece a las 24 horas de sembrado en el medio de fermentación. (Relación e/t = 8/1). El S. olivaceus tarda 48 horas en crecer. (Relación e/t = 4/2).

El S. griseus crece a las 18 horas de sembrado. (Relación e/t = 4/0,75).

Inoculación a partir del medio III de germinación:

El B. brevis crece a las 24 horas de sembrado en el medio de fermentación. (Relación e/t = 10/1). El S. olivaceus forma una capa a las 48 horas de sembrado. (Relación e/t = 6/2).

El S. griseus crece a las 24 horas de inoculado. (Relación e/t = 6/1).

Para todos los gérmenes la abundancia del crecimiento en el medio

de fermentación va en aumento en el orden I,II,III de los medios de germinación.

b) Títulos de Vitamina B₁₂ provocados en el medio de fermentación al inocularlo con los cultivos preparados con los distintos gérmenes en los medios de germinación.

En los gráficos N^{os}. 1,2 y 3 observamos los rendimientos obtenidos con B.brevis Tuc 307 (L.O. 195); B.brevis ATCC 10.068 y S. olivaceus NRRL B-1125 (L.O.194).

Observamos que el medio II resulta superior al medio I para los tres gérmenes—En cuanto al medio III, no se observa diferencia con el medio II para el B.brevis ATCC 10.068, en cambio es superior que el medio II para el S.olivaceus NRRL B-1125.

Respecto al S. griseus, no se obtuvo rendimiento apreciable de Vitamina B₁₂ en ninguno de los tres casos.

Como conclusión, seleccionamos el medio III como el más promisorio, para utilizarlo en ensayos posteriores.

Las valoraciones citadas fueron realizadas sobre el caldo libre de micelio.

Simultáneamente realizamos valoraciones sobre el medio total (caldo + micelio) homogeneizado, con el fin de observar si el micelio retiene o no Vitamina B₁₂.

Para ello diariamente, una vez sacada la muestra del caldo libre de micelio homogeneizamos el contenido de la botella en una licuadora y sacamos muestra del medio total.

Una vez realizadas las mediciones de Vitamina B₁₂ (según se indica en el capítulo correspondiente) observamos que durante los seis primeros días de iniciada la fermentación los títulos más altos corresponden al medio total homogeneizado, lo cual indica retención de Vitamina por el micelio, pero desde el noveno día en adelante disminuye notablemente el porcentaje de Vitamina retenida por el micelio y se nota un aumento de los títulos de Vitamina en el caldo libre de micelio.

Por consiguiente, las valoraciones las realizamos en lo sucesivo sobre el caldo libre de micelio, dado que a partir del noveno día de iniciada la fermentación la Vitamina está prácticamente en su totalidad en el caldo libre de micelio.

Respecto a las curvas de pH, en general éstas acusan un descenso en los primeros días de fermentación, debido al aprovechamiento del glúcido por los organismos, y luego experimentan un ascenso paulatino, al producirse la desaminación de los aminoácidos de los sustratos nitrogenados.

La forma de la curva varía dependiendo principalmente del germen ensayado, de la fuente de nitrógeno y de la presencia de glúcido.

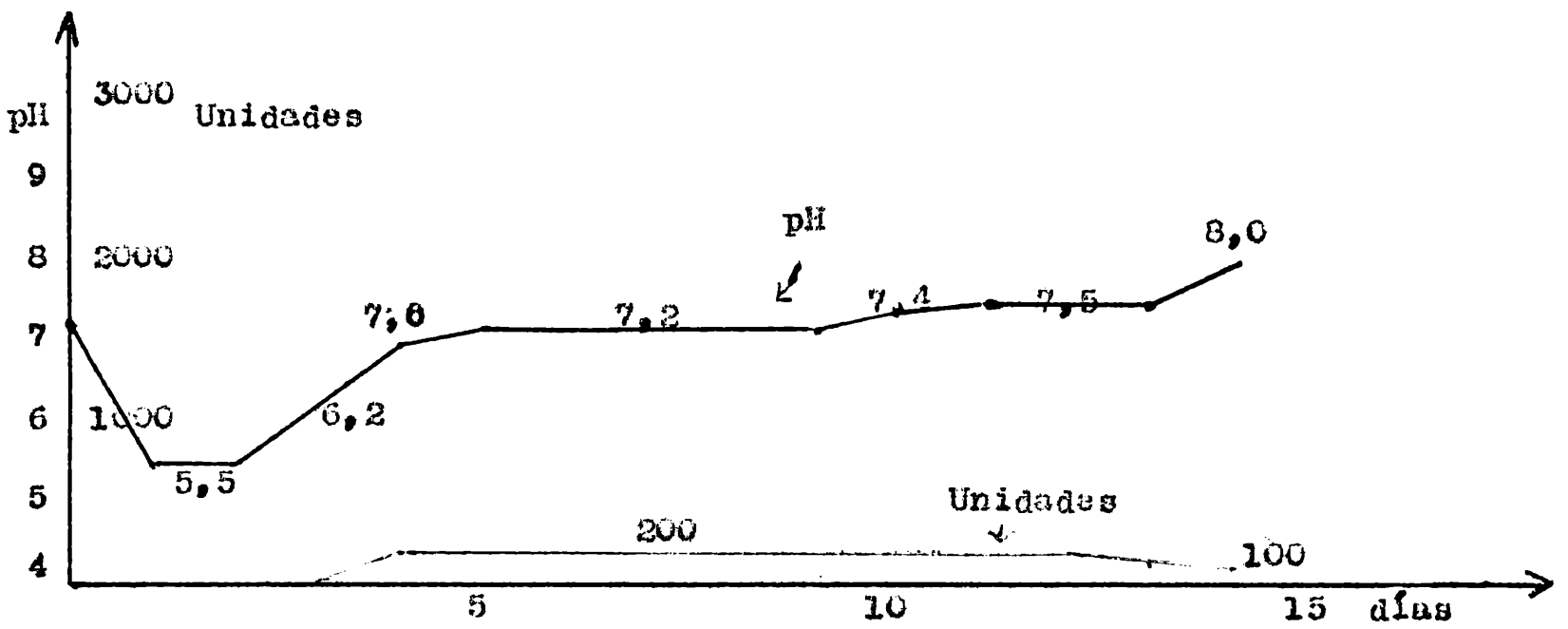
Según la literatura, cuando la concentración de glúcido en el medio es mayor, el pH ^{se} mantiene en un nivel más bajo. En nuestras condiciones de trabajo, observamos que esta relación no siempre se cumple.-

En cuanto a la presencia de Vitamina B₁₂ en la composición del Medio III de germinación, y su posible influencia sobre los títulos de Vitamina B₁₂ obtenidos en el medio de fermentación ensayado, si bien el jarabe polivitamínico contiene 3.125mℓ de Vitamina B₁₂ por mililitro, dada la proporción en que se lo agrega al Medio III de germinación, éste tiene 6.250mℓ de Vitamina B₁₂ por litro. Como sembramos el medio de fermentación con una cantidad de inóculo correspondiente al 5% de su volumen, en 1 mililitro de medio de fermentación habrá 0,03mℓ de Vitamina B₁₂, cantidad ínfima que no incide en los resultados de la valoración.

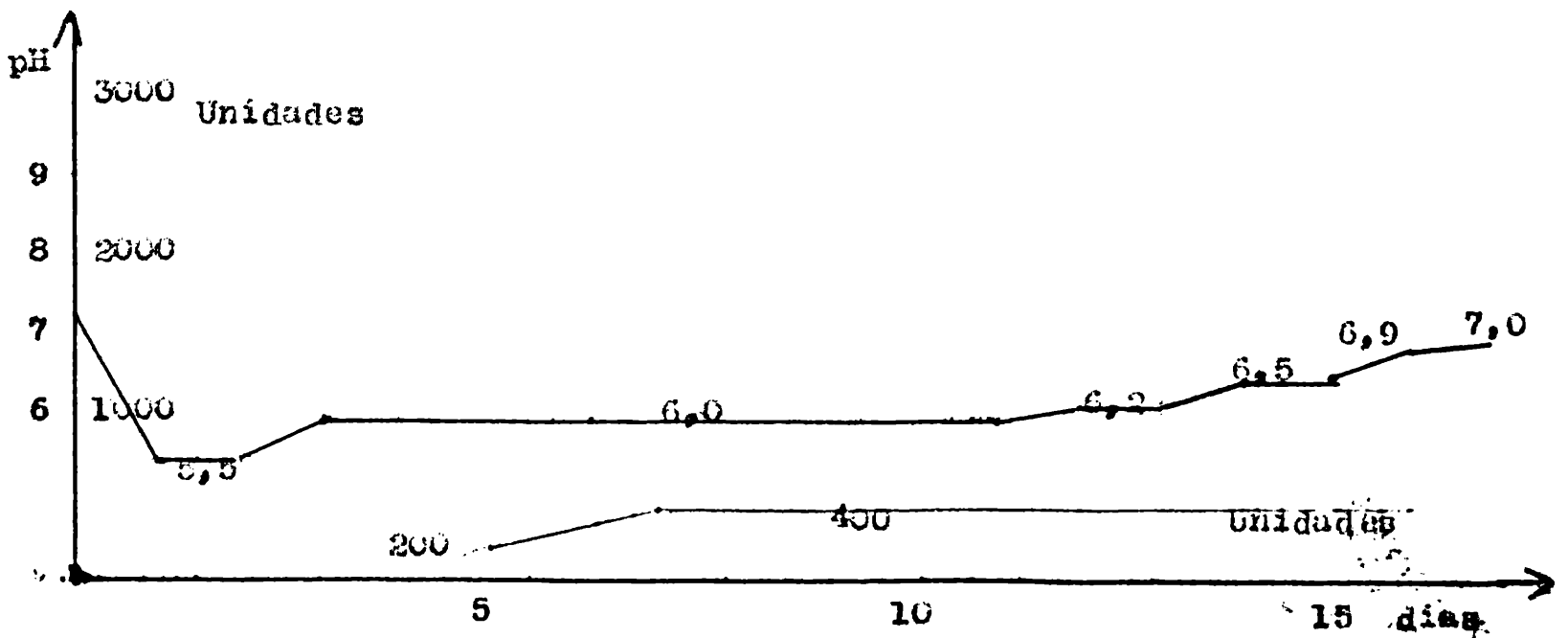
GRAFICO 1

Bacillus brevis Tucuman 307 (L.O. 195)

Medio de germinación I



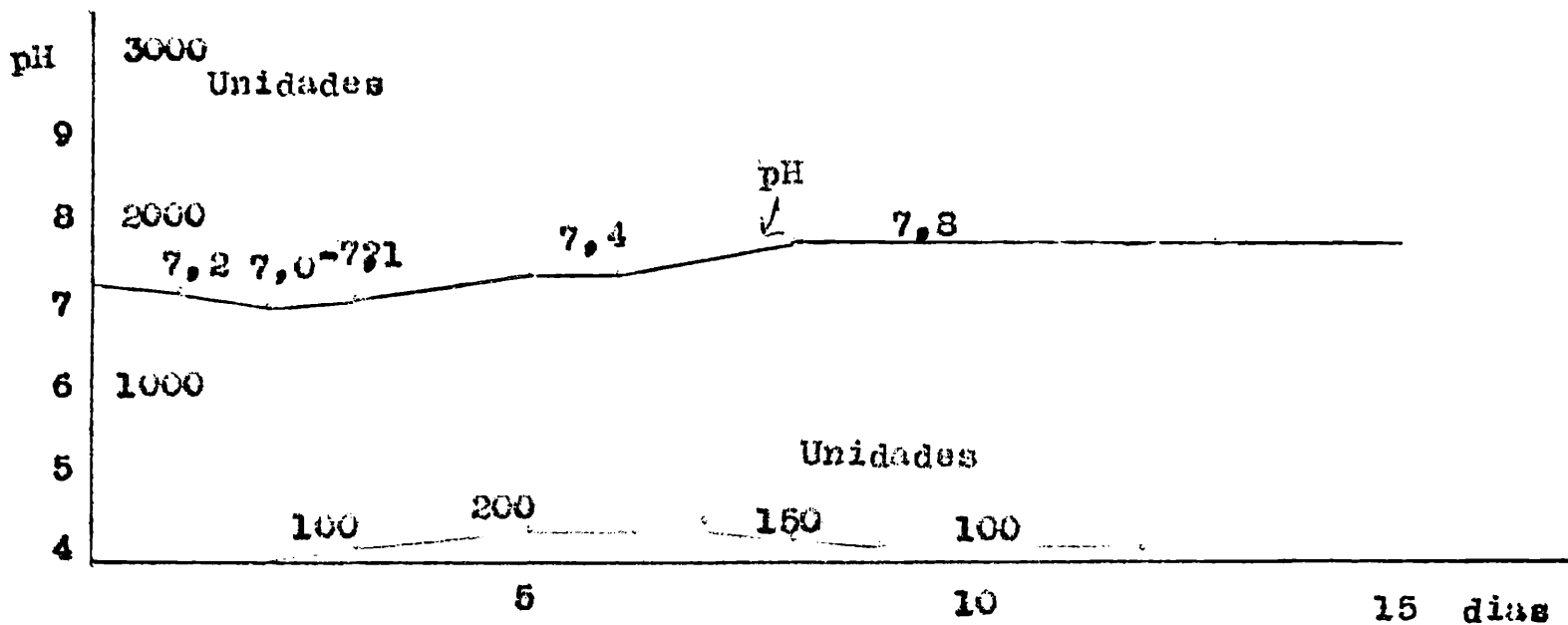
Medio de germinación II



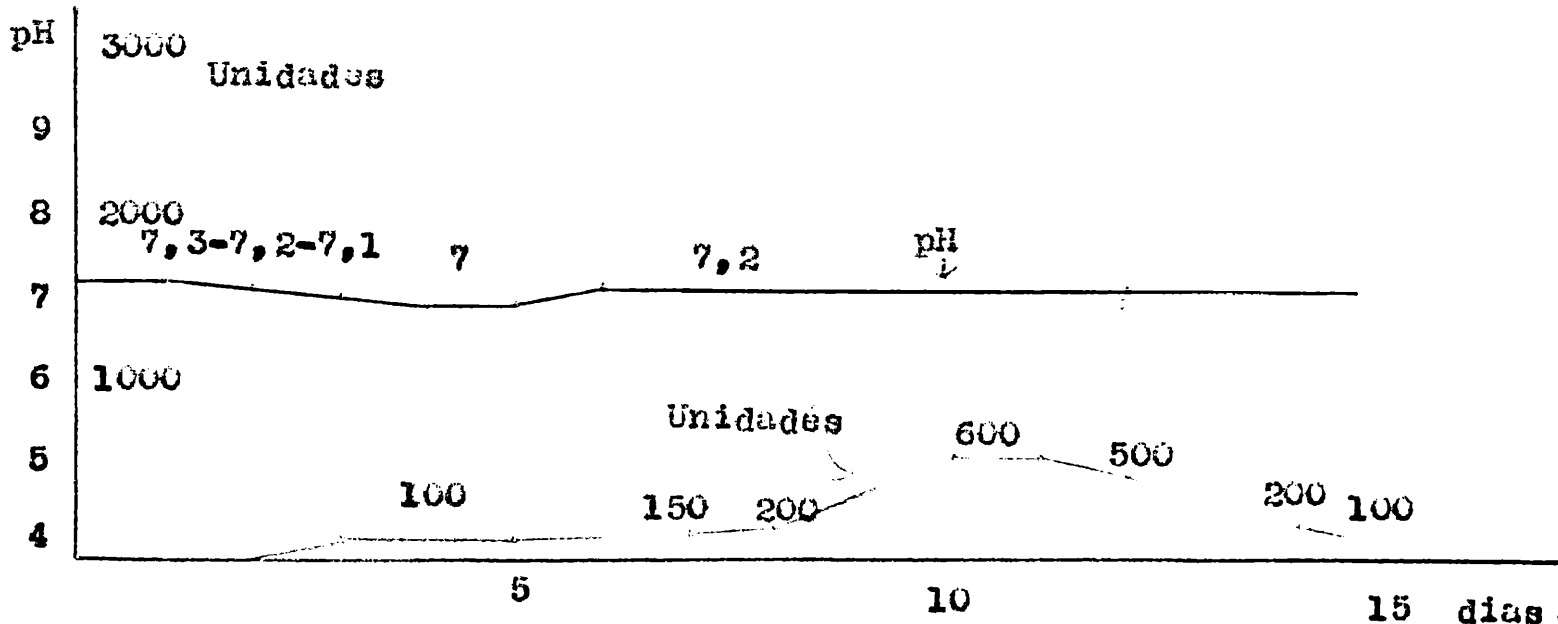
G R A F I C O 2

Bacillus brevis: A T C C 10068

Medio de germinación I



Medio de germinación II



Medio de germinación III

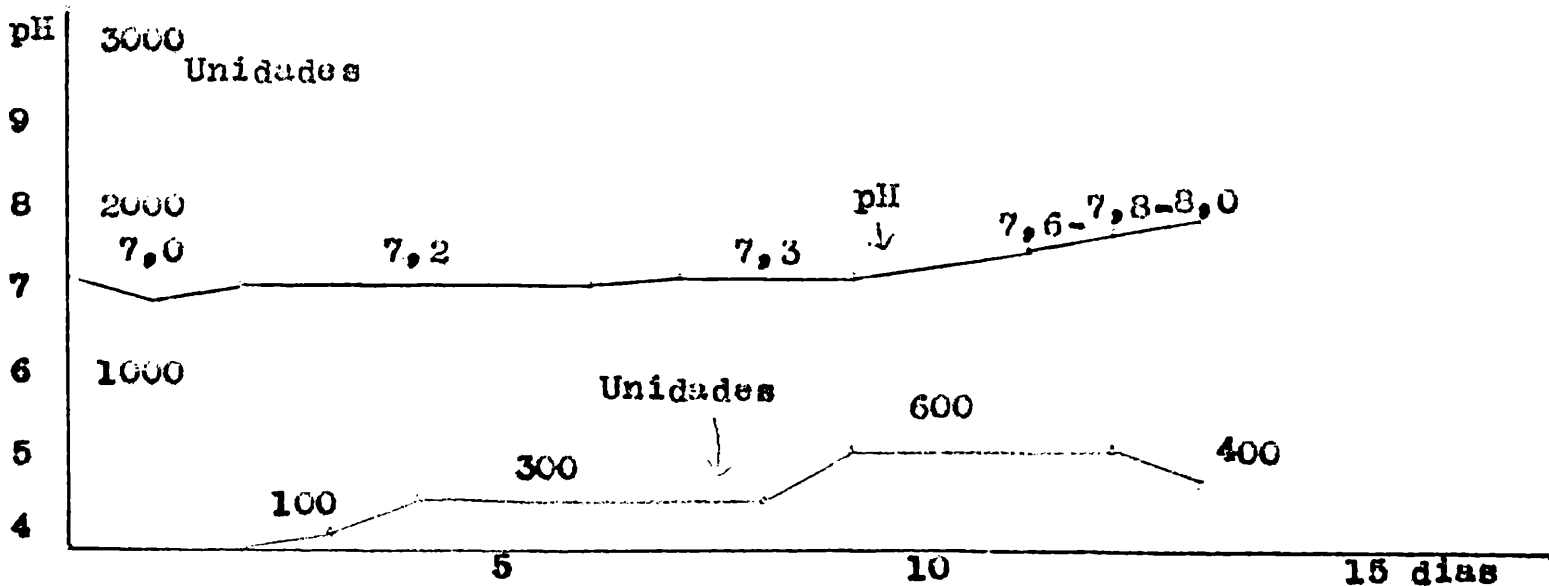
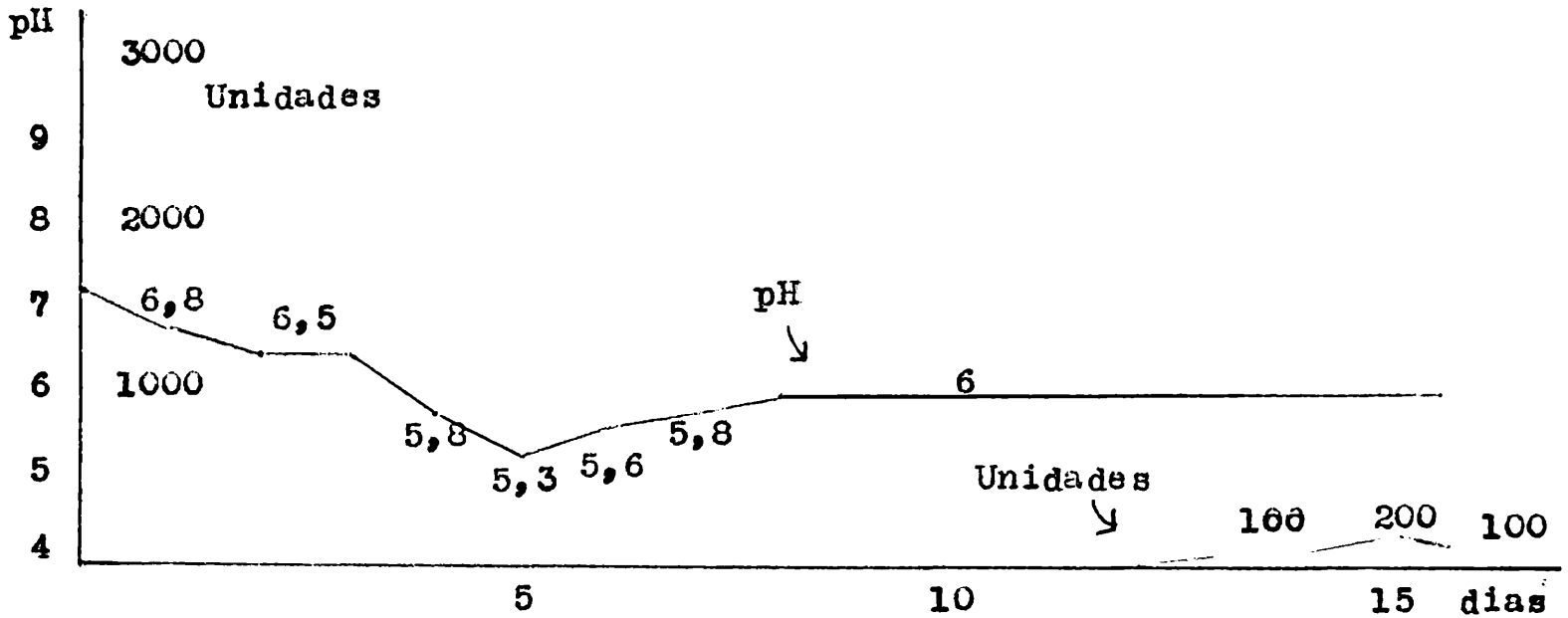


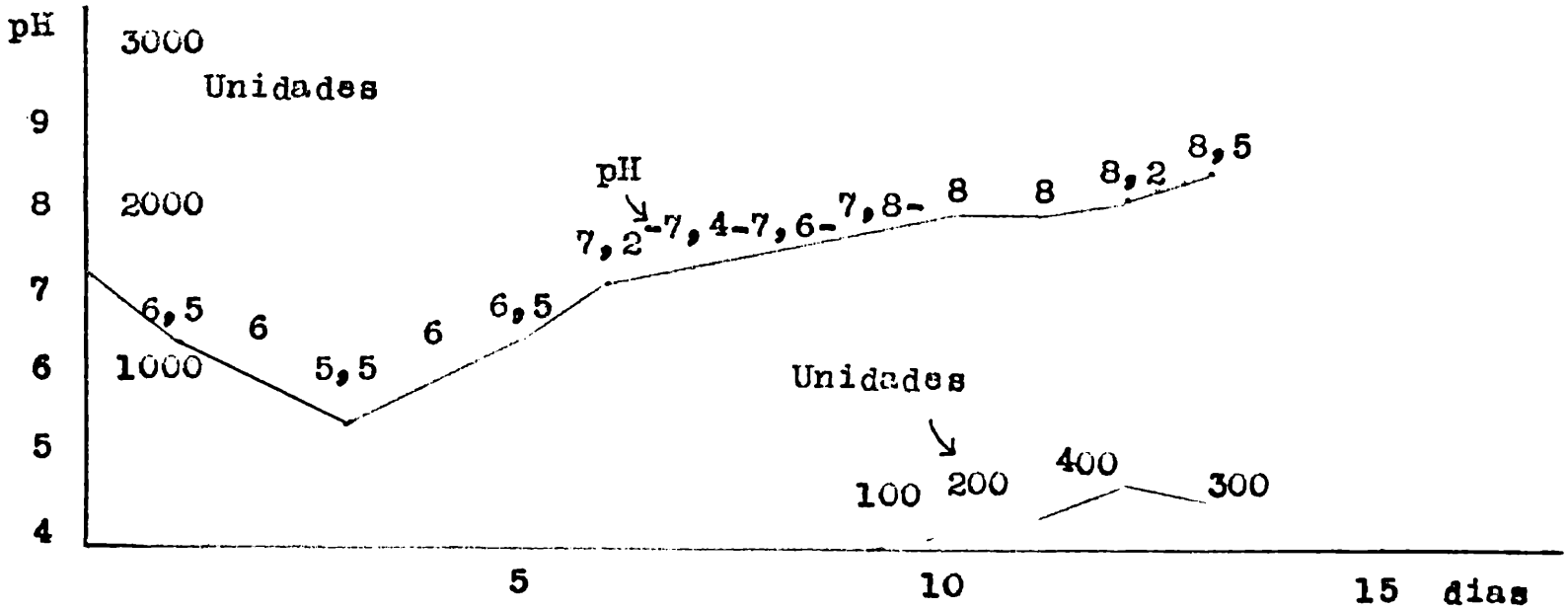
GRAFICO 2

Streptomyces olivaceus N R R L B-1125 (L.O. 194)

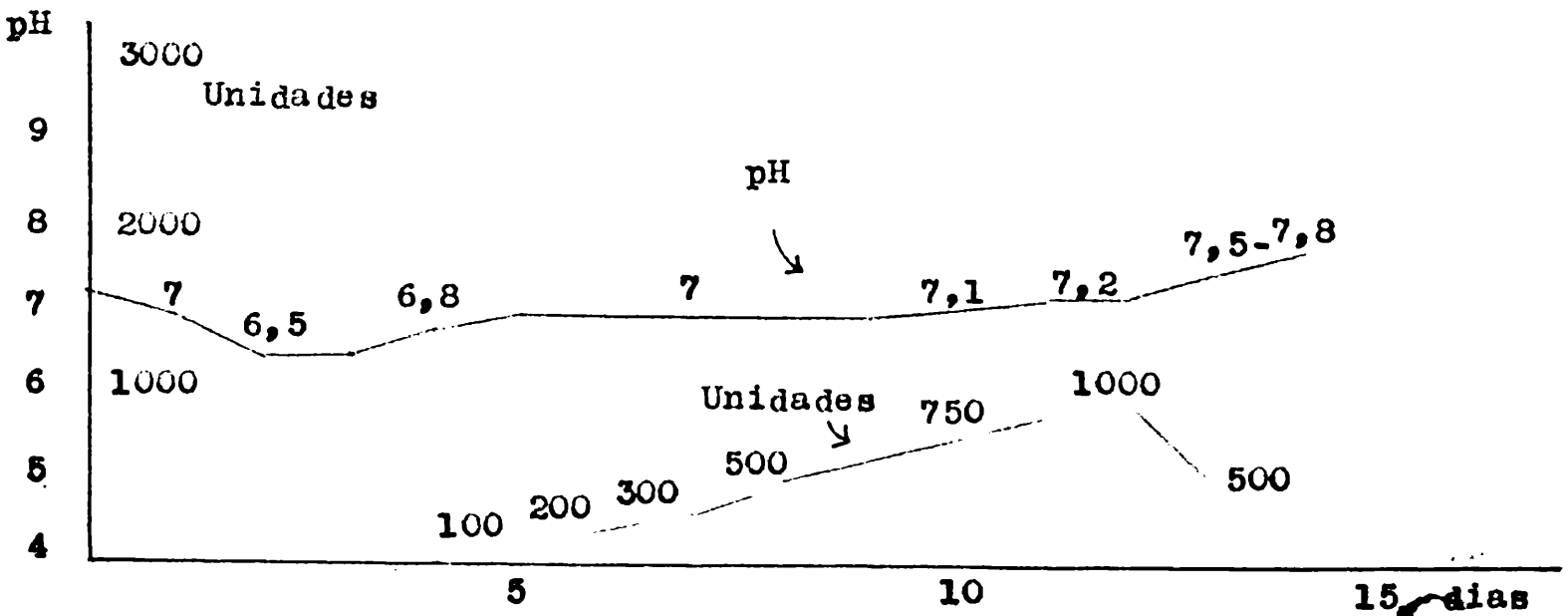
Medio de germinación I



Medio de germinación II



Medio de germinación III



FERMENTACION POR CULTIVO
EN SUPERFICIE

Selección de medios de fermentación

Fermentación por cultivo en superficieSelección de medios de fermentación

Para conducir la fermentación propiamente dicha ensayamos los siguientes medios de fermentación:

Medio A, que se basa en el medio indicado para *Streptomyces olivaceus* por PREIFER y colaboradores (1954).

Ante la imposibilidad de obtener algunos de los componentes del medio, lo hemos modificado, asignándole esta composición:

Licor de "corn steep" :	0,5 % (en base a extracto seco)
Peptona de caseína:	1,3 %
Dextrosa:	1,0 %
Ca CO ₃	0,5 %
Co (NO ₃) ₂ · 6 H ₂ O:	10,0 PPM
Agua destilada.	

El "licor de corn steep" empleado ha sido obtenido a partir de maíz germinado, y tiene un extracto seco de 3,30 g % referido a 100 cc de muestra. La técnica de preparación así como los análisis se detallan en el capítulo correspondiente.

El medio original contiene aceite de semilla de soya, que se emplea como antiespumante, pero como se trata aquí de fermentaciones en superficie, podemos prescindir de él.

Medio B, indicado para *Bacillus brevis* por los Doctores LUGONES y MUNDEL (1952).

Está compuesto por:

Peptona de caseína:	1,5	%
KH ₂ PO ₄ :	0,1	%
K ₂ HPO ₄ :	0,02	%
Glucosa :	4,0	%
Ca Cl ₂ :	0,1	%
Fe SO ₄ · 7 H ₂ O:	0,0003	%
Mg SO ₄ · 7 H ₂ O:	0,1	%
Zn SO ₄ · 7 H ₂ O:	0,001	%
Co SO ₄ · 6 H ₂ O:	0,002	%
Mn SO ₄ · 5 H ₂ O:	0,0003	%
Agua destilada.		

Ambos medios se hierven durante 30 minutos para facilitar la disolu-

ción de los componentes, se ajusta el pH a 7- 7,5, se hierven 15 minutos, se llevan al volumen primitivo con agua destilada y se filtran por algodón.

Se colocan 200 ml de cada medio en botellas de 1 litro de capacidad, similares a las ya descritas, las que se tapan con tapones de algodón recubiertos con gasa y se esterilizan en autoclave durante media hora a 120 °C (1 atmósfera de sobrepresión).

En el caso del medio B, la glucosa esterilizada aparte se agrega asépticamente a cada botella.

Con los distintos gérmenes en estudio preparamos cultivos en el medio III de germinación (caldo que seleccionamos al ensayar los tres medios de germinación) y con ellos procedemos a inocular los dos medios de cultivo, A y B.

Agregamos a cada botella en forma aséptica, 10 ml de inóculo con una pipeta, y colocamos las botellas en estufas donde incubamos cada medio a las temperaturas correspondientes: 28-30 °C para los *Streptomyces*; 36- 37 °C para los *Bacillus brevis*.

Diariamente sacamos muestra de los distintos medios en forma aséptica y en ellas realizamos determinaciones colorimétricas del pH y valoramos la Vitamina según la técnica que se describe en el capítulo correspondiente.

Los resultados obtenidos se observan en los gráficos Nº 4, 5, 6 y 7. No figura en ellos el *S. griseus* pues no se obtuvieron rendimientos apreciables de Vitamina B₁₂ en ninguno de los dos medios de cultivo.

Solamente en forma esporádica se valoraron hasta 1000 unidades de Vitamina B₁₂ por cc.

De la observación de los gráficos extraemos las siguientes conclusiones De los caldos A y B ensayados, el A resulta superior al B para la mayoría de los gérmenes, y de igual eficiencia para el *S. olivaceus* L.O. 215.

De las cinco cepas ensayadas, las mejores productoras son: entre los *S. olivaceus*, el *S. olivaceus* L.O. 194, y entre los *B. brevis*, el *B. brevis* L.O. 195.

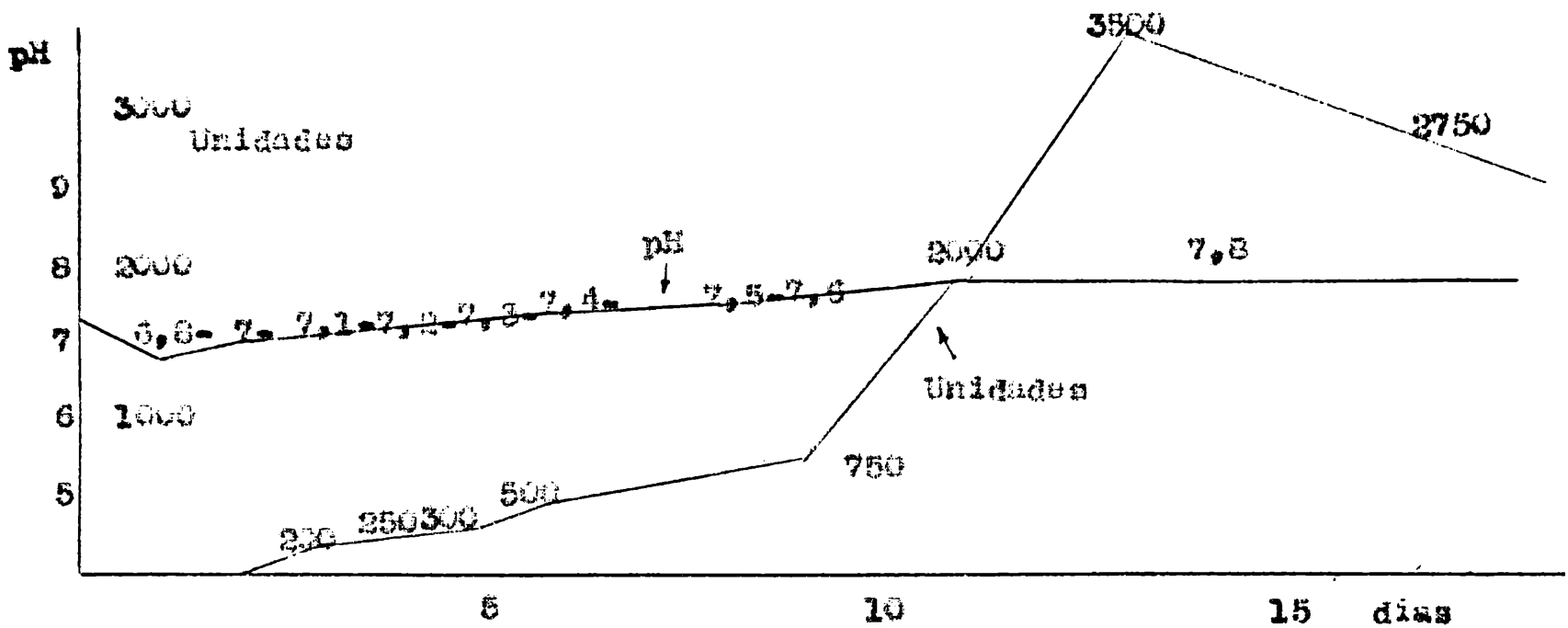
Por lo tanto, en los ensayos subsiguientes reducimos el número de cepas empleadas a estas dos, y utilizamos el medio A, en el cual efectuamos variaciones con el objeto de estudiar los rendimientos de Vitamina B₁₂.

Como una excepción, en el estudio de la fuente de carbono, además del medio A empleamos el medio B.

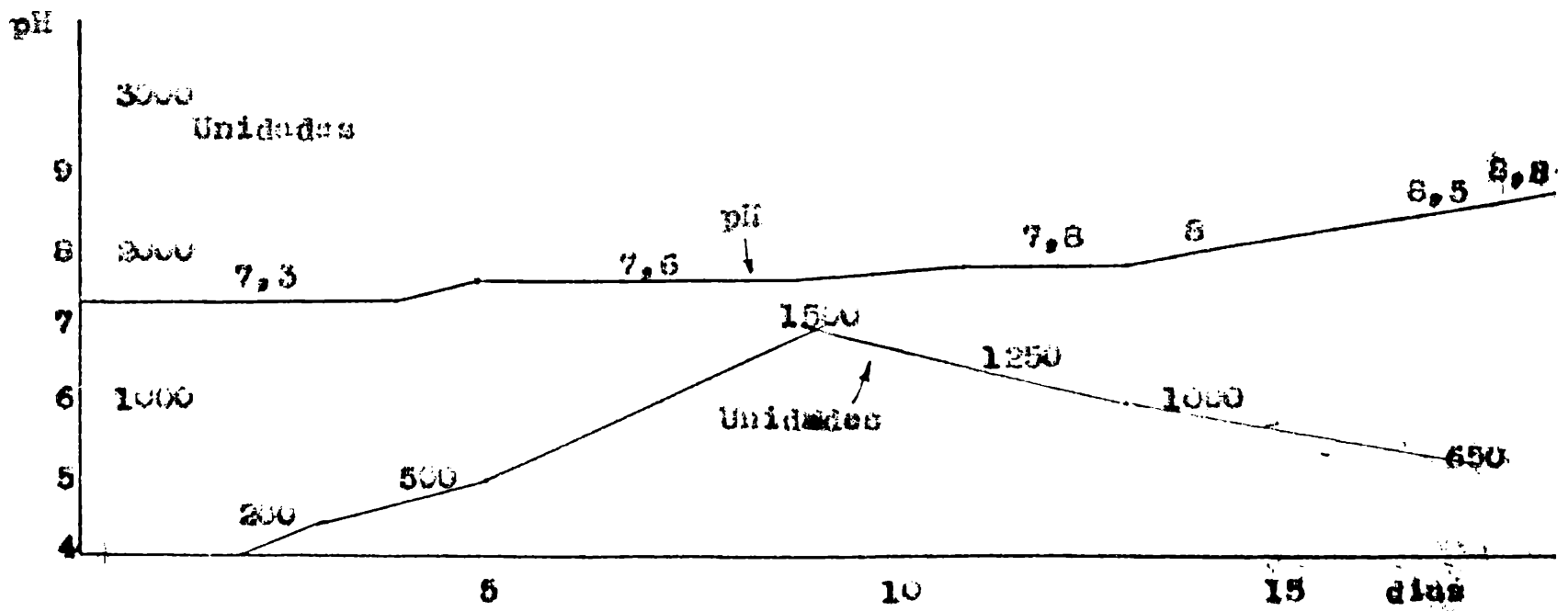
GRAFICO 4

Streptomyces olivaceus N R R L B-1125 (L.O. 194)

Medio A



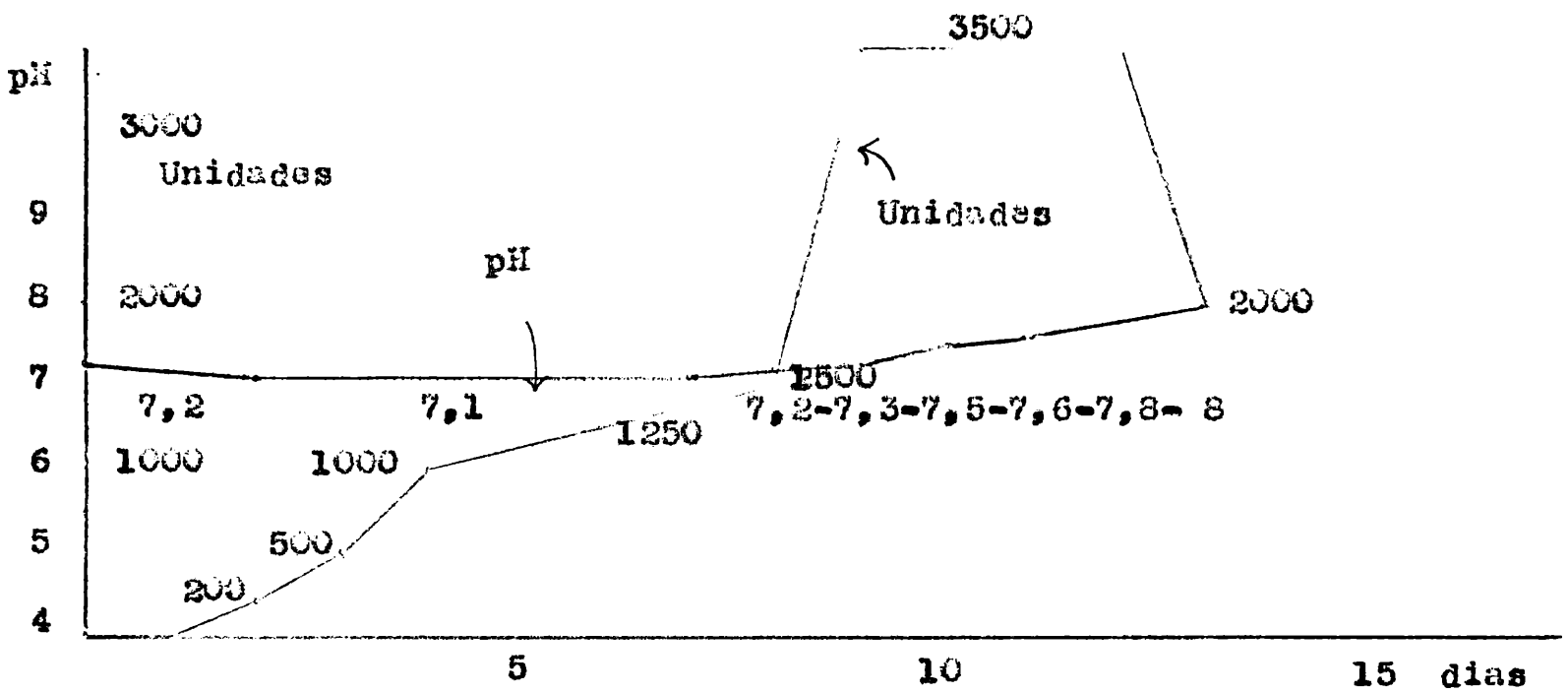
Medio B



G R A F I C O 8

Bacillus brevis Tucuman 307 (L.O. 195)

Medio A



Medio B

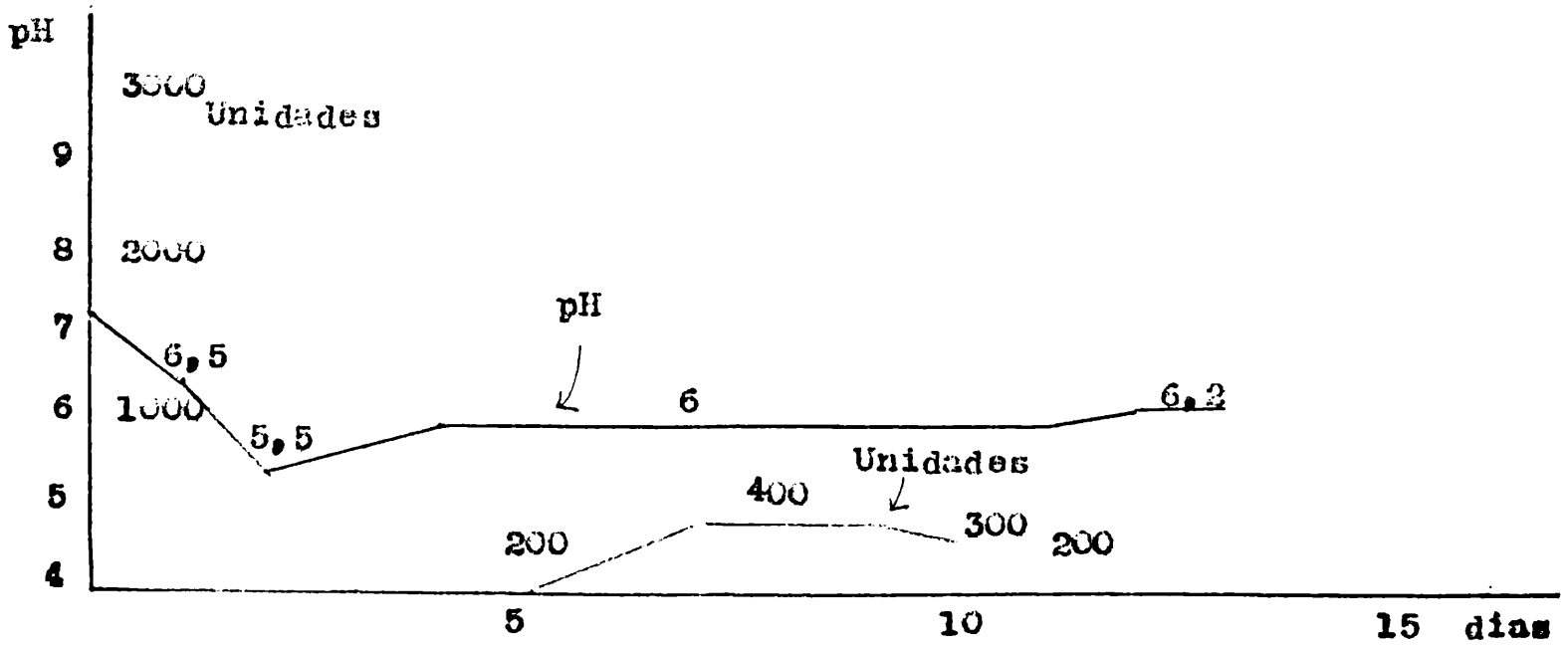
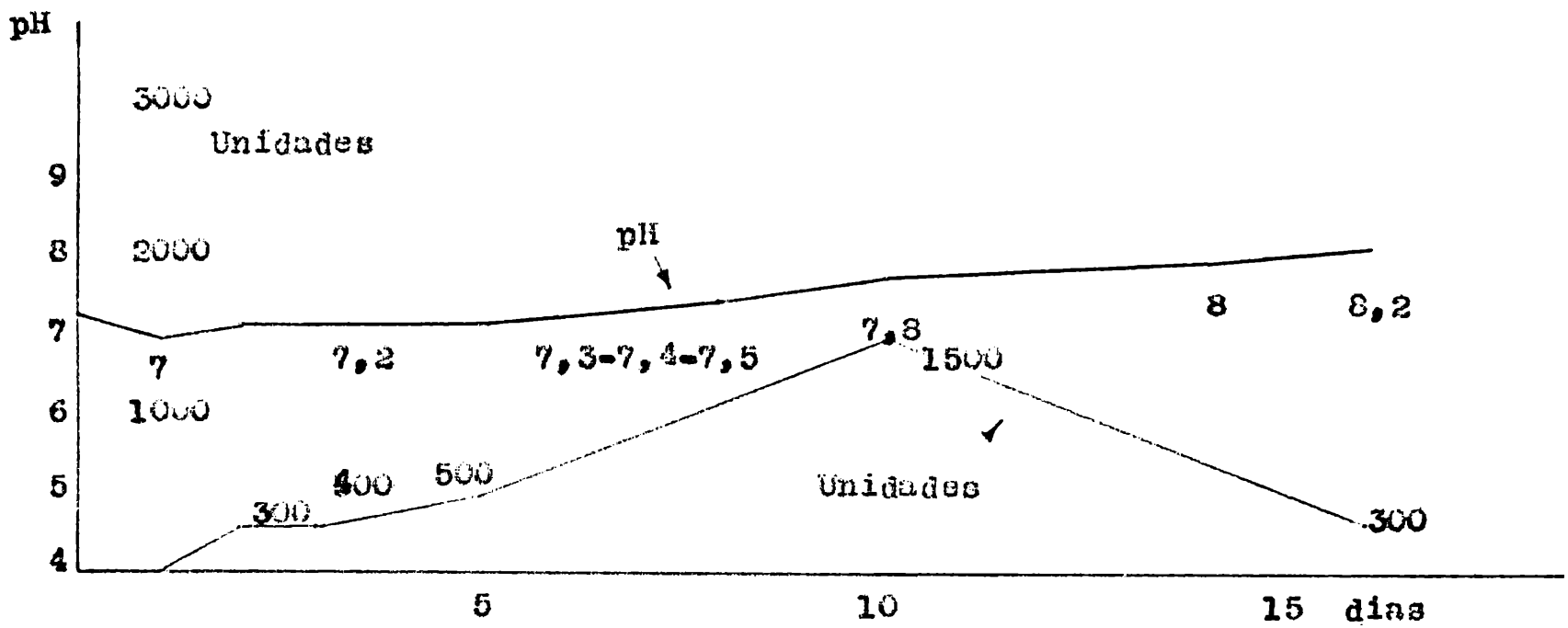


GRAFICO 6

Bacillus brevis. A T C C 10068

Medio A



Medio B

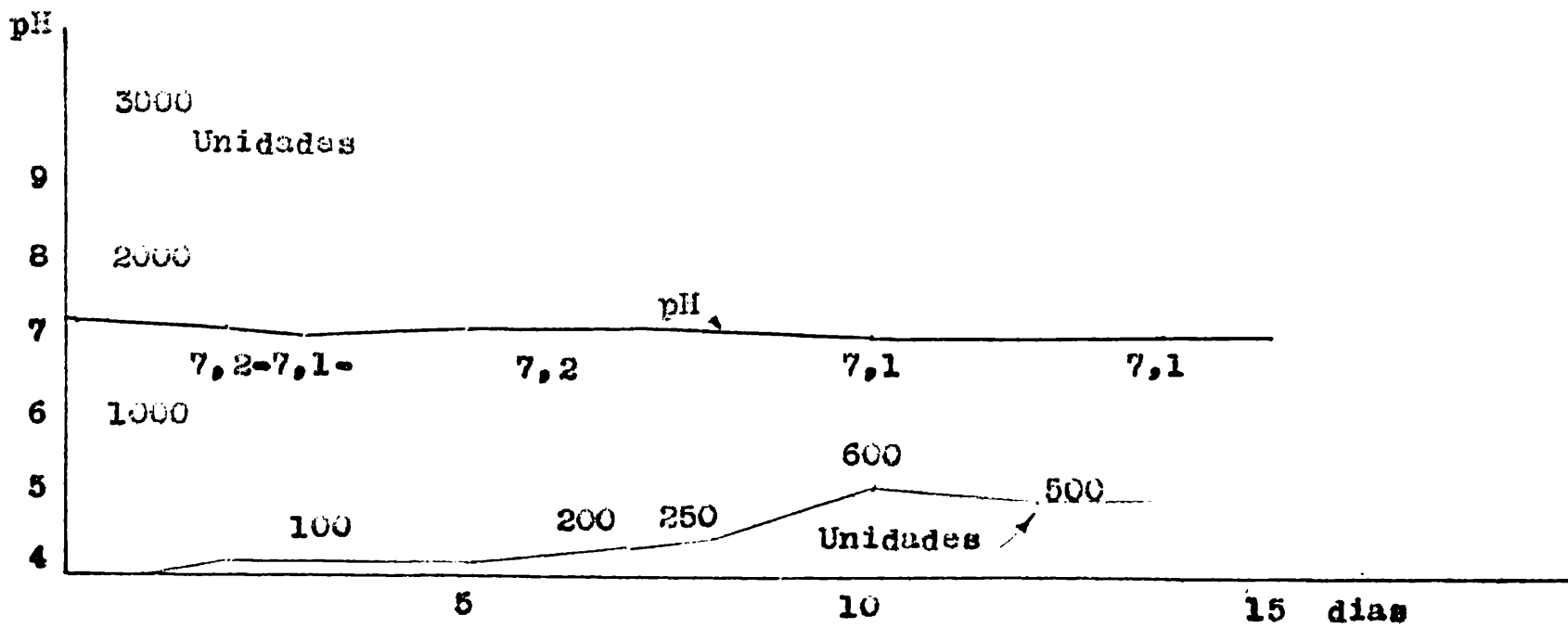
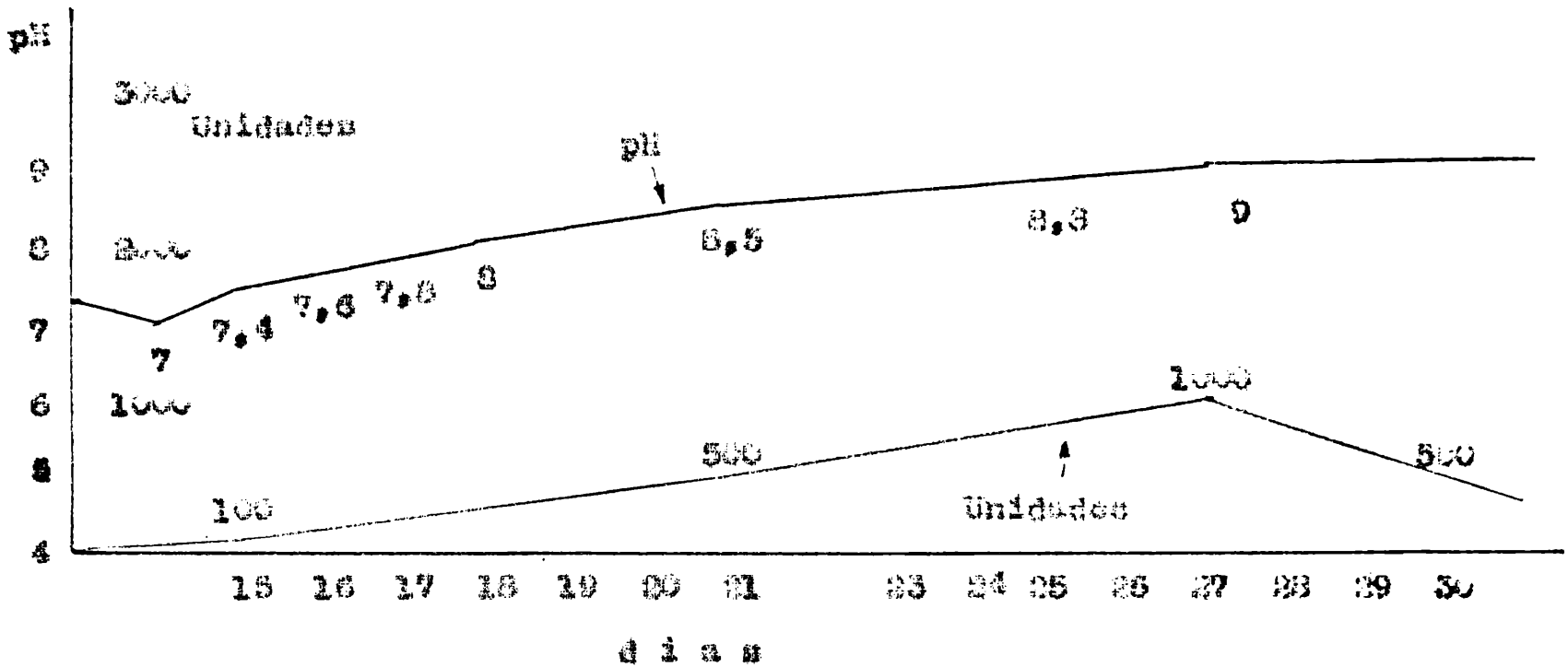


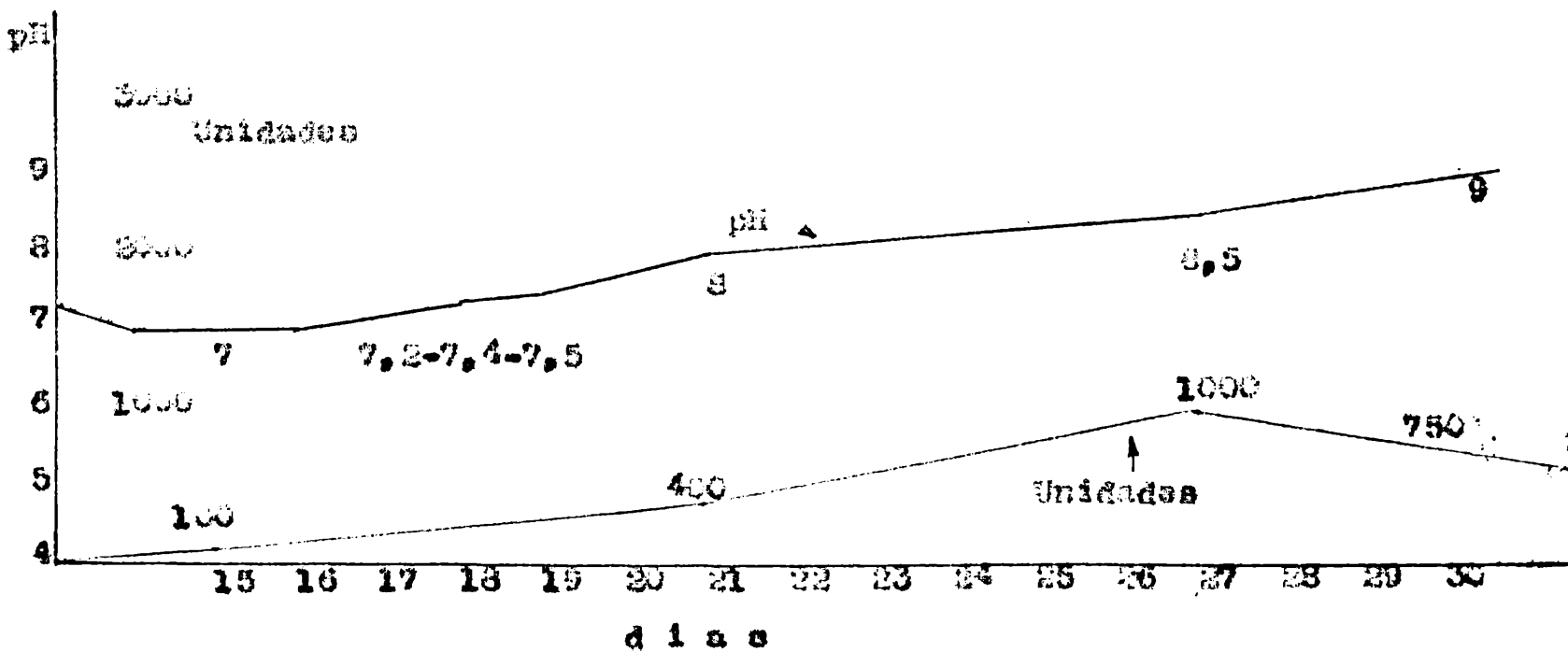
GRÁFICO 7

Streptomyces olivaceus M R R L B- 1125 (L.O. 215)

Medio A



Medio B



VARIABLES INTRODUCIDAS EN EL ESTUDIO DE LOS RENDIMIENTOS

Variables introducidas en el estudio de los rendimientos

Las variables estudiadas en fermentación por cultivo en superficie son 1) Fuente de Carbono; 2) Fuente de nitrógeno; 3) Fuente de factores minerales y accesorios.

Las cepas empleadas son las seleccionadas como mejores productoras de Vitamina B₁₂: Streptomyces olivaceus L.O. 194 y Bacillus brevis L.O. 195.

1) Fuente de Carbono:

Empleamos como fuente de carbono glucosa comercial (cerelose) de las Refinerías Argentinas de Maíz. El título de glucosa de la partida empleada es de 77,1 %.

Observamos el efecto de la variación del porcentaje de glucosa en los medios A y B sobre la producción de Vitamina B₁₂ a partir de las dos cepas citadas.

Para ello preparamos el medio A con 1% (porcentaje original) y con 4% de glucosa; y el medio B con 1% y con 4% (porcentaje original) de glucosa.

Las composiciones son las siguientes:

Medio A :

Licor de corn steep(germinado):	0,5 %	(en base a extracto seco)
Peptona de caseína:	1,3 %	
Dextrosa :	1 %	- 4%.
Ca CO ₃ :	0,5 %	
Co (NO ₃) ₂ · 6 H ₂ O :	10,0 PPM	
Agua destilada.		

El "licor de corn steep" es el utilizado en la selección de Medios de Fermentación.

Medio B.

Peptona de caseína:	1,5	%	
K H ₂ PO ₄ :	0,1	%	
K ₂ HPO ₄ :	0,02	%	
Glucosa :	1	%	- 4 %
Ca Cl ₂ :	0,1	%	
Fe SO ₄ · 7 H ₂ O :	0,0003	%	
Mg SO ₄ · 7 H ₂ O :	0,1	%	

Zn SO ₄ · 7 H ₂ O :	0,001	%
Co SO ₄ · 6 H ₂ O :	0,002	%
Mn SO ₄ · 5 H ₂ O :	0,0003	%
Agua destilada.		

La preparación de los medios y las condiciones de trabajo son similares a las fermentaciones anteriores.

Con los dos gérmenes seleccionados preparamos cultivos en el Medio III de germinación y con ellos procedemos a inocular los cuatro medios de fermentación. La incubación se realiza a las temperaturas ya fijadas.

Con los resultados obtenidos se trazaron los gráficos N^o 8, 9, 10 y 11.

De la observación de los gráficos se deduce que la concentración de glucosa ejerce un efecto marcado sobre el rendimiento de Vitamina B₁₂ obtenido empleando *S. olivaceus* L.O. 194, y que éste es mayor para el 1% que para el 4% de glucosa. (ensayamos estos porcentajes por ser los indicados en los dos medios de fermentación en ensayo: A y B.)

La concentración de glucosa también ejerce un efecto sobre el rendimiento en Vitamina B₁₂ obtenido empleando *B. brevis* L.O. 195. Pero en este caso observamos que con caldo B, un aumento en la concentración de glucosa determina un aumento en el rendimiento de Vitamina B₁₂, en cambio con caldo A los resultados se invierten (mayor rendimiento para el 1% que para el 4% de glucosa.)

Considerando los rendimientos obtenidos al emplear el caldo A con ambos gérmenes, resulta más conveniente el agregado del 1% de glucosa, al medio.

Respecto al caldo B, la misma proporción (1%) es la más conveniente para el *S. olivaceus*.

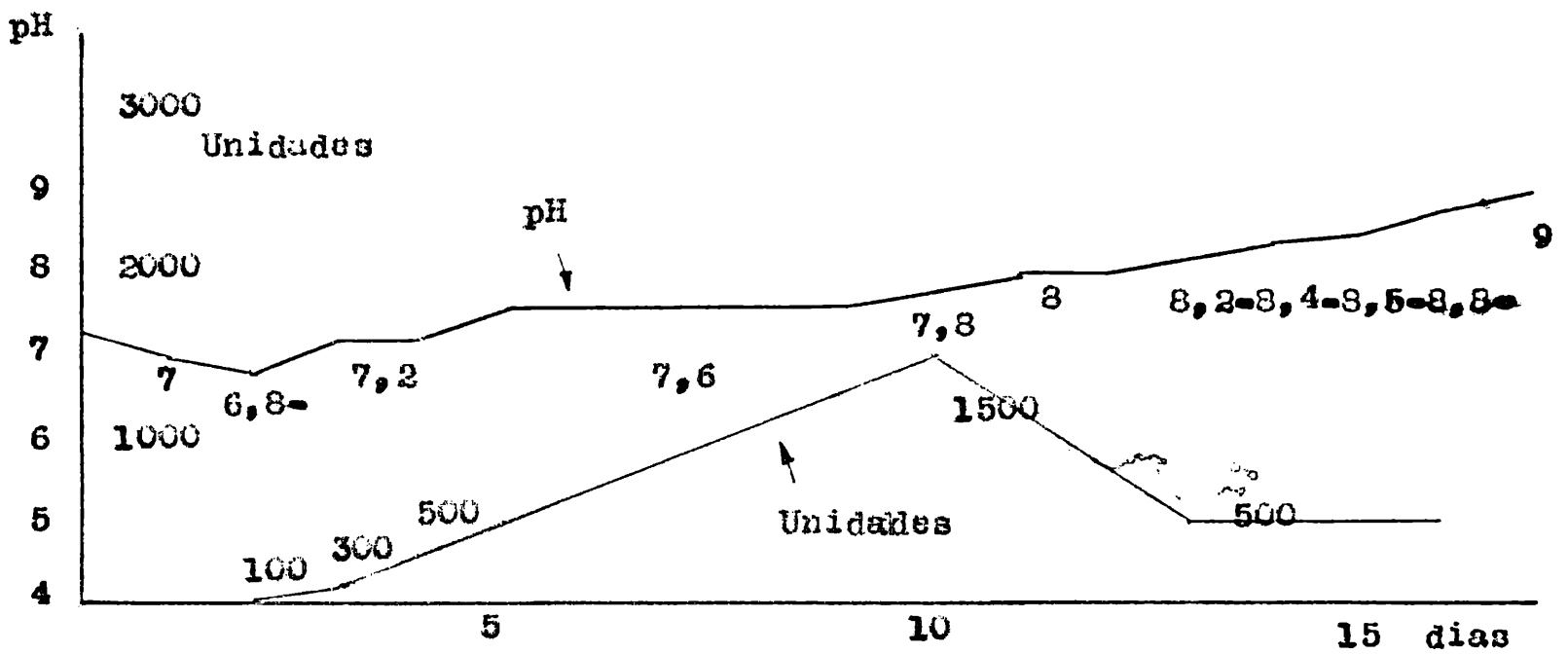
Para el *B. brevis* los resultados se invierten empleando el medio B. Es decir, que en este segundo caso no podemos asegurar nada respecto a la influencia de la concentración de glucosa en el medio.

De todos modos, al emplear el medio A, de acuerdo con los rendimientos obtenidos, el porcentaje de glucosa correspondiente a ambas cepas será del 1%.

GRAFICO 8

Streptomyces olivaceus N R R L B-1125 (L.O. 194)

Medio B con 1% de glucosa



Medio B con 4% de glucosa

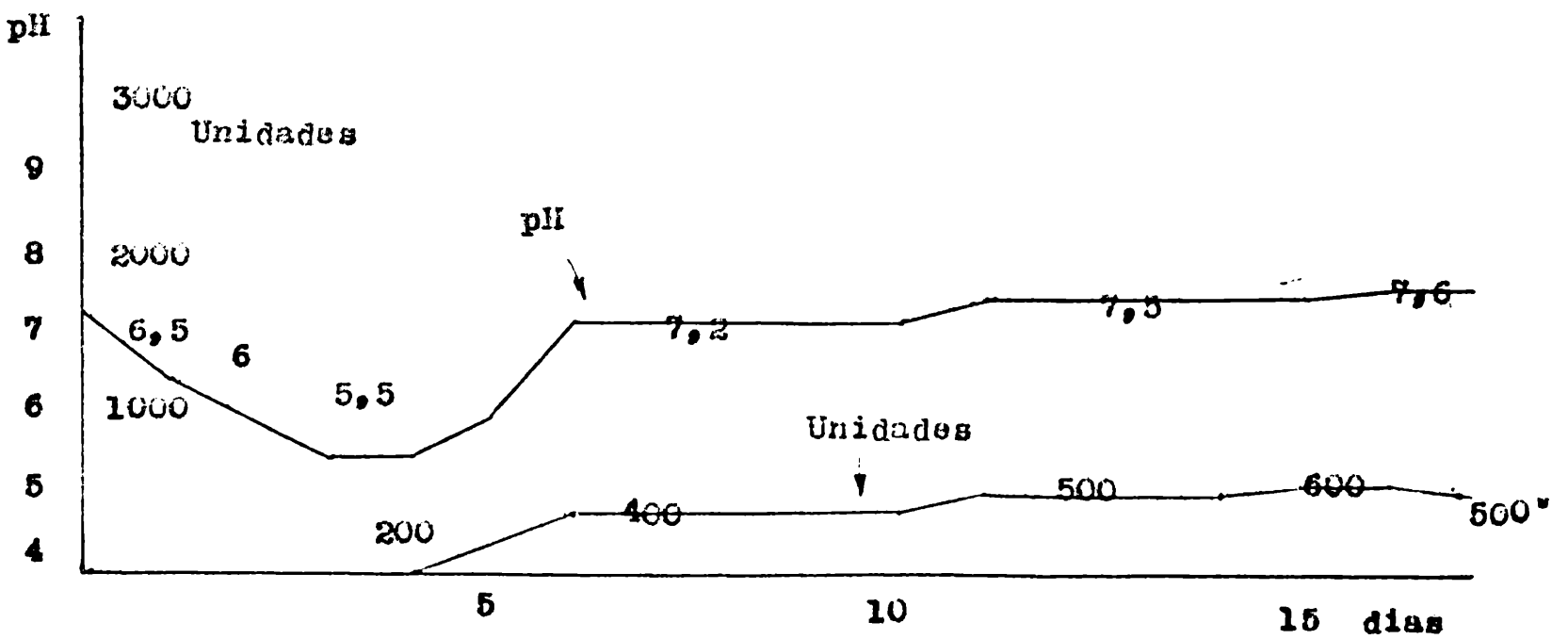
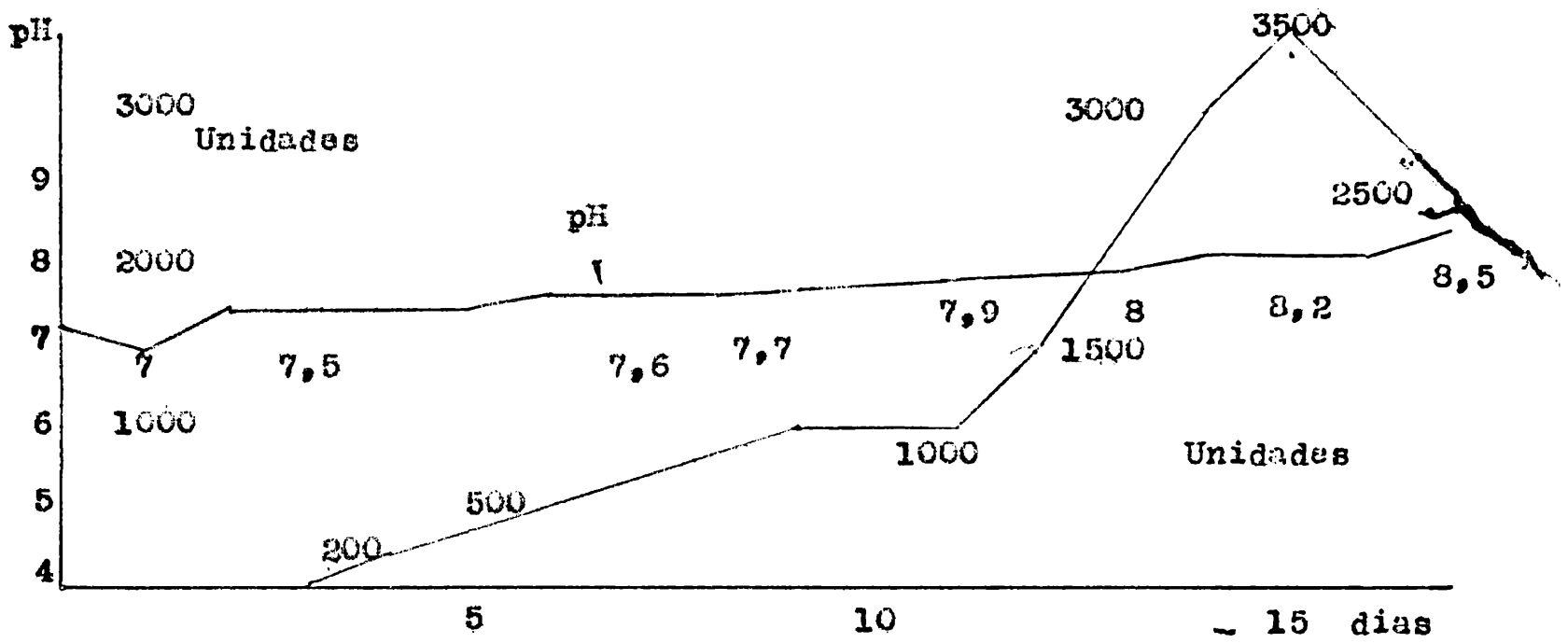


GRAFICO 9

Streptomyces olivaceus N R R L B-1125 (L.O. 194)

Medio A con 1% de glucosa



Medio A con 4% de glucosa

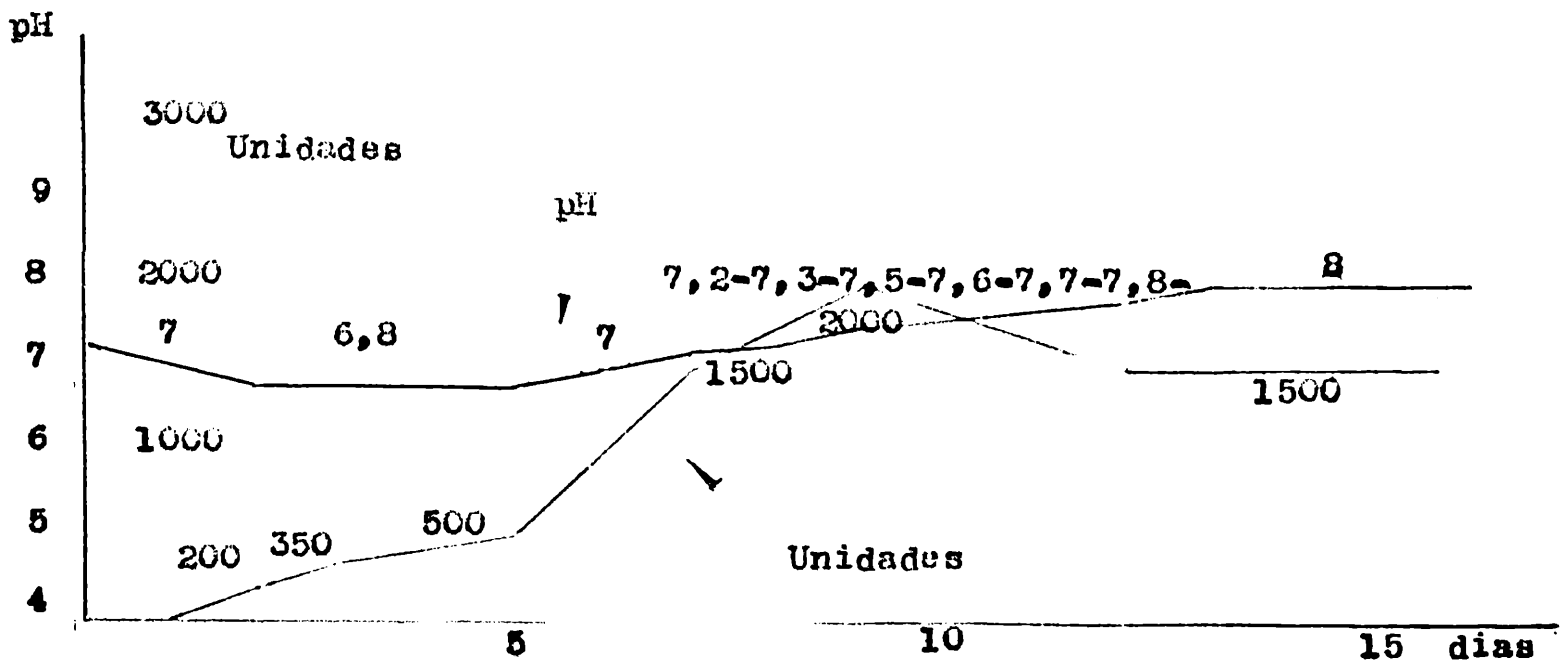
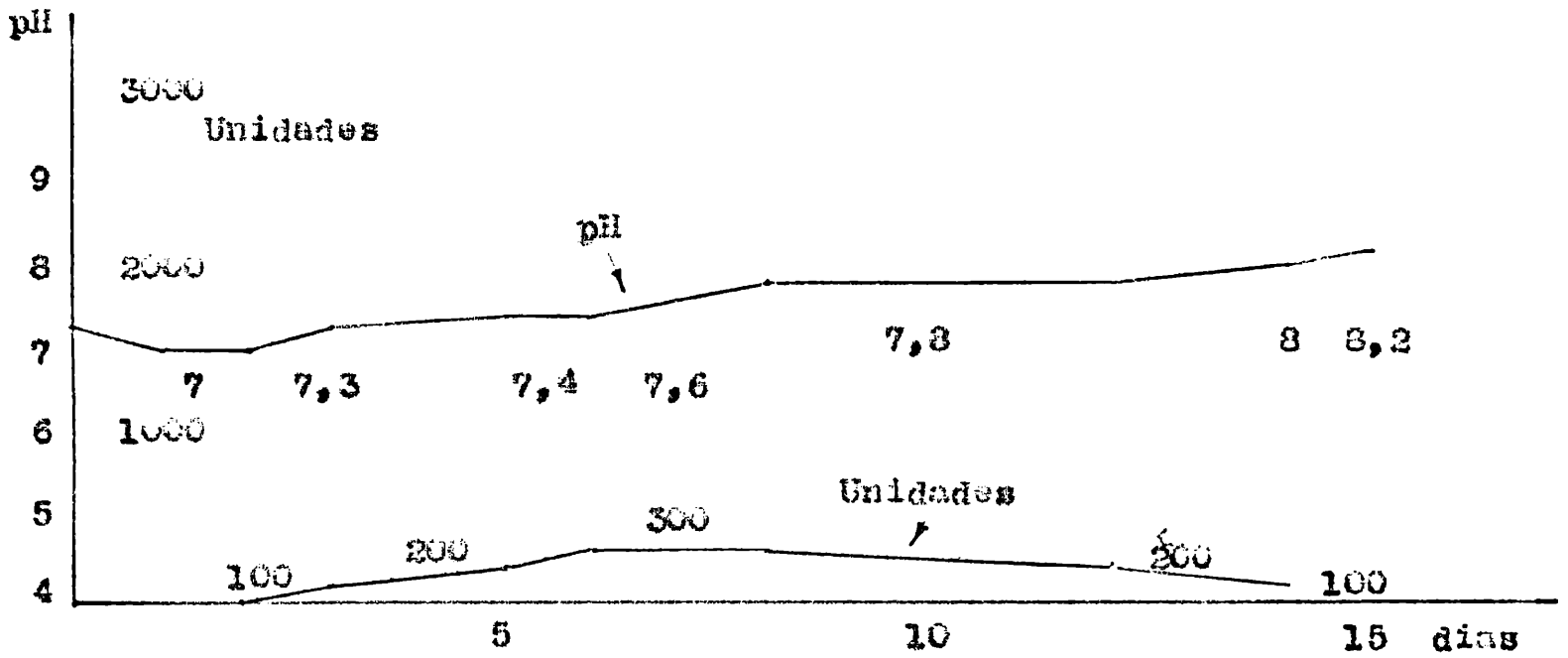


GRAFICO 10

Bacillus brevis Tucuman 307 (I.O. 195)

Medio B con 1% de glucosa



Medio B con 4% de glucosa

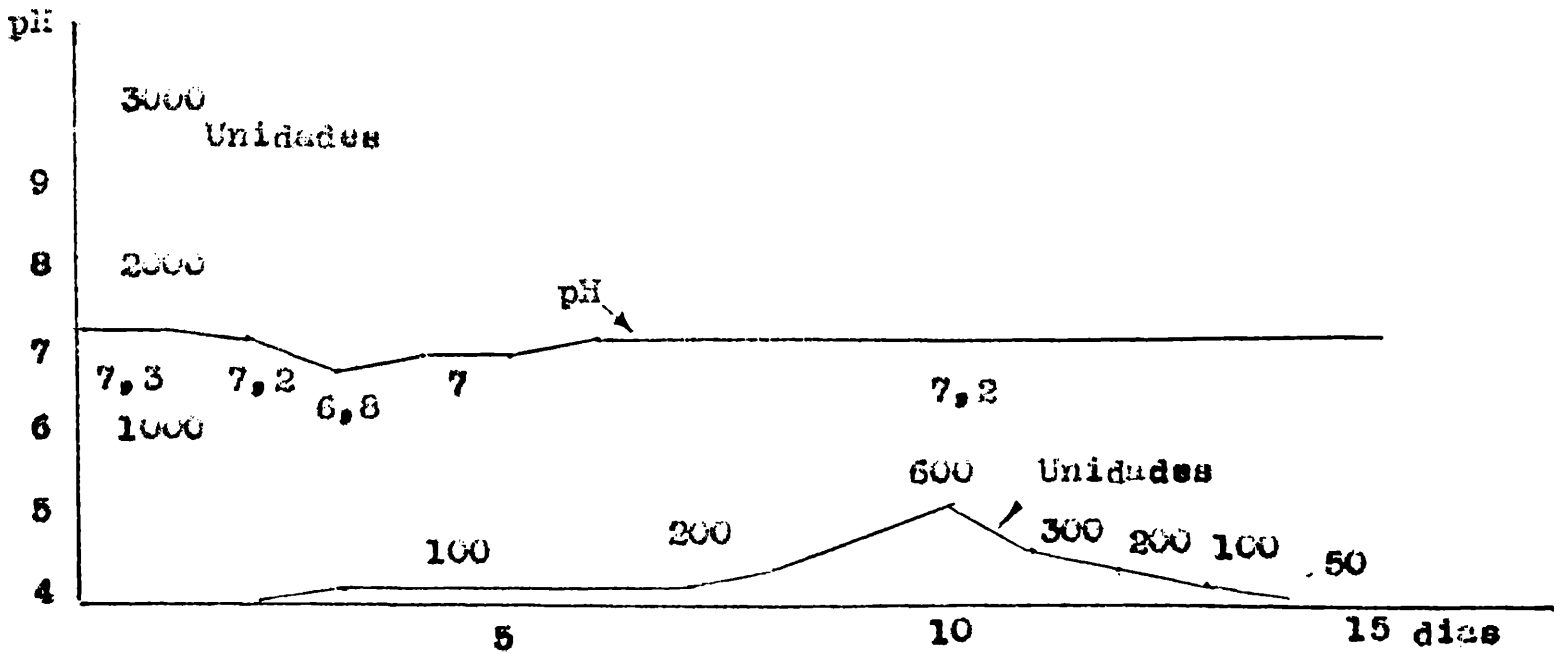
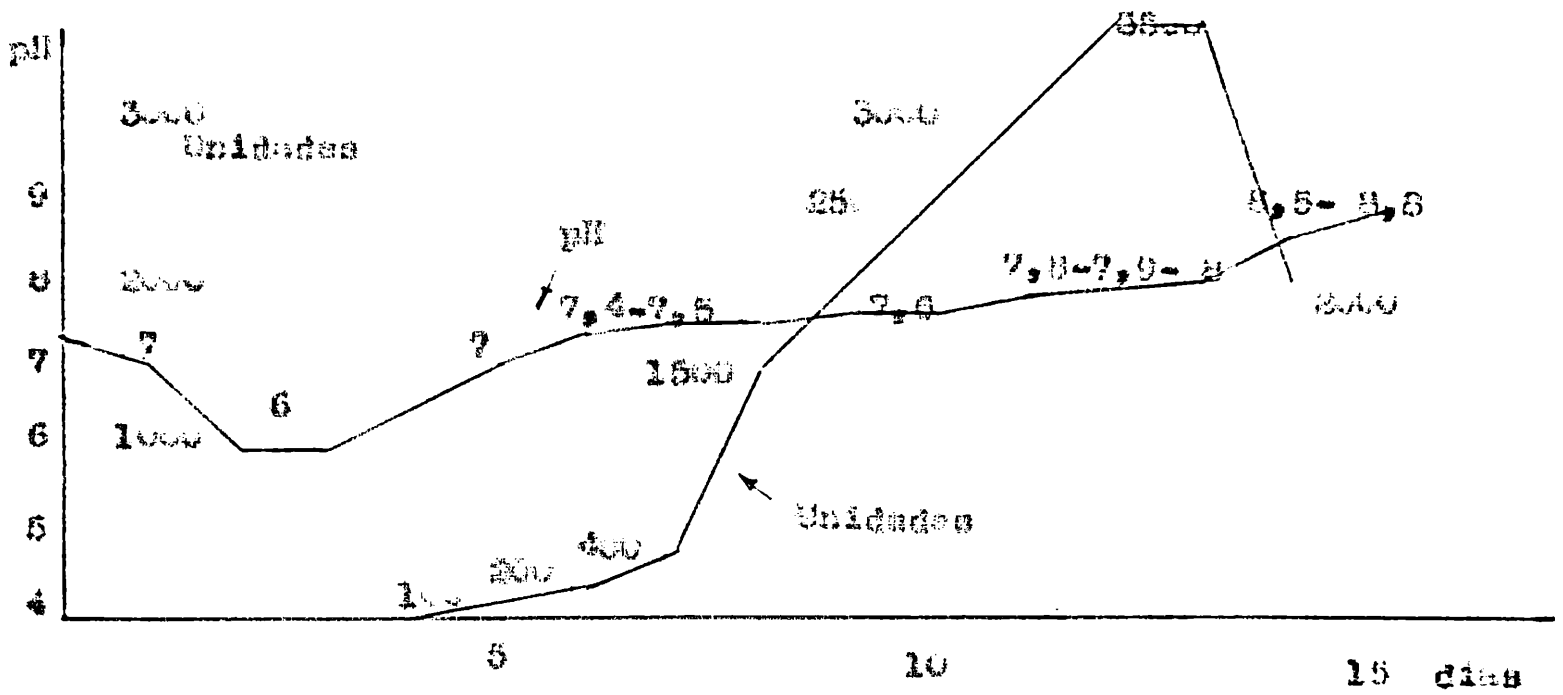


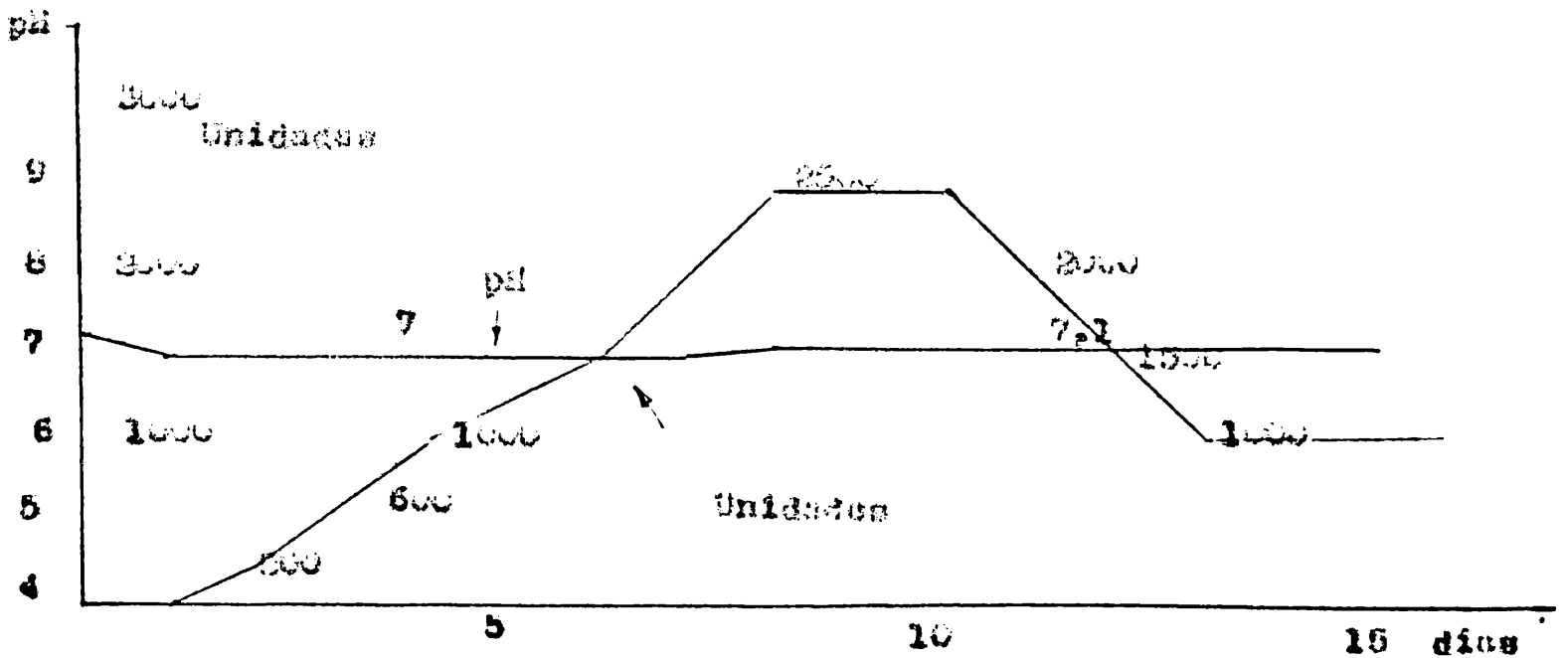
GRÁFICO 11

Aspergillus brevipes Tucuman 307 (L.C. 195)

Medio A con 1% de glucosa



Medio A con 4% de glucosa



2) Fuente de Nitrógeno:

Para proveer de nitrógeno al medio de fermentación, en reemplazo de la peptona de caseína empleada en el medio A de fermentación, recurrimos a las siguientes sustancias: Peptona de carne, Peptona de gluten y ácido glutámico (clorhidrato).

Los porcentajes de nitrógeno total respectivos son:

Peptona de caseína:	12,46	%	(según método de Kjeldahl)
Peptona de carne :	11,76	%	" " " "
Peptona de gluten:	10,50	%	" " " "
Acido glutámico (clorhidrato)	9,52	%	

El modo preparatorio así como el análisis de las tres peptonas indicadas se detallan en el capítulo correspondiente.

En base a los porcentajes de N_2 calculamos las cantidades que equivalen a 1,3 g % de peptona de caseína, cantidad que agregamos al medio A de fermentación.

Esas cantidades son:

Acido glutámico (clorhidrato):	1,6	%
Peptona de carne:	1,4	%
Peptona de gluten:	1,5	%

Tomando como base el caldo A preparamos tres caldos de la siguiente composición:

a) Licor de "Corn steep" (germinado)	0,5	%	(extr. seco)
Peptona de carne:	1,4	%	
Dextrosa:	1,0	%	
Ca CO ₃ :	0,5	%	
Ca (NO ₃) ₂ · 6 H ₂ O:	10,0	PPM	
Agua destilada-			
b) Licor de "Corn steep" (germinado):	0,5	%	(extr. seco)
Peptona de gluten :	1,5	%	
Dextrosa:	1,0	%	
Ca CO ₃ :	0,5	%	
Ca (NO ₃) ₂ · 6 H ₂ O:	10,0	PPM	
Agua destilada-			
c) Licor de "Corn steep" (germinado):	0,5	%	(extr. seco)
Acido glutámico :	1,6	%	

Dextrosa:	1,0	%
Ca CO ₃ :	0,5	%
Co (NO ₃) ₂ · 6 H ₂ O :	10,0	PPM
Agua destilada.		

La preparación de los medios es similar a la ya indicada en las fermentaciones anteriores.

Con los dos gérmenes seleccionados: *S.olivaceus* L.O.194 y *B.brevis* L.O.195 preparamos cultivos en el Medio III de germinación y con ellos inoculamos los tres medios de fermentación. La incubación de los medios y extracción de muestras se realizan como se indicó anteriormente.

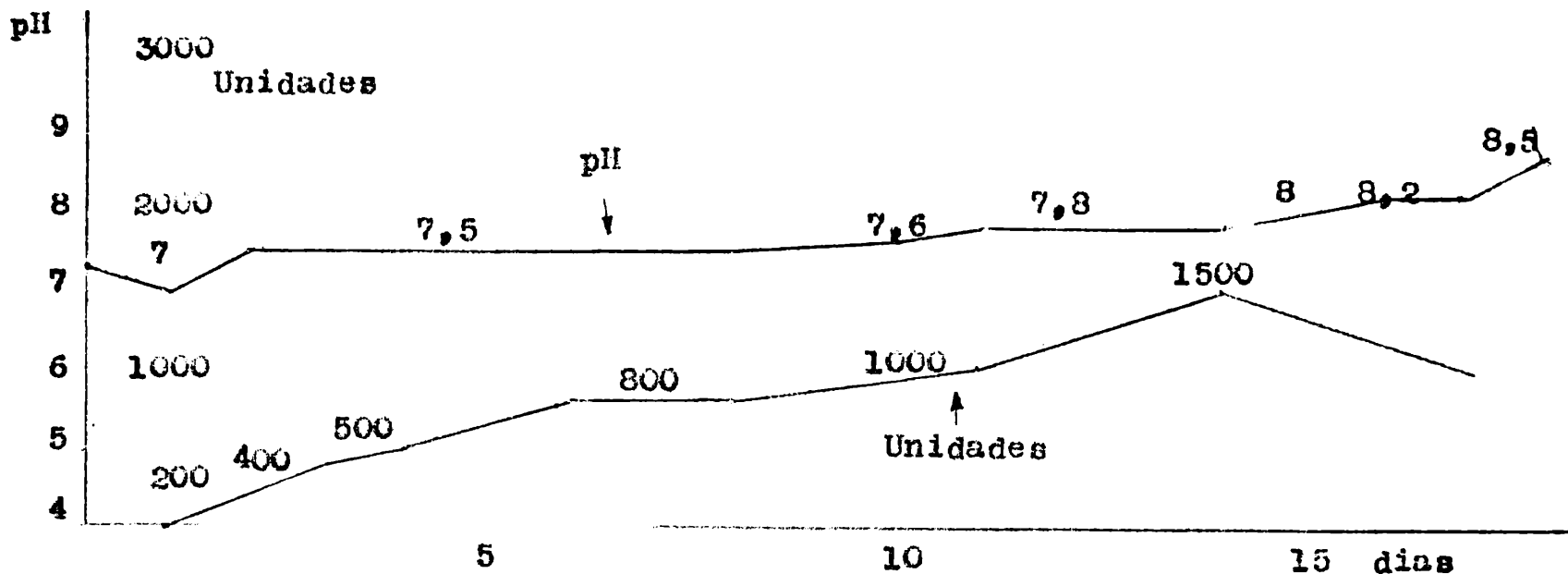
Los resultados obtenidos se observan en los gráficos Nº 12 y 13.

De la observación de los mismos y de su comparación con los gráficos Nº 4 y 5 en la parte correspondiente al medio A, se deduce que el medio que permite obtener mayores rendimientos ya sea empleando *S.olivaceus* L.O.194 o *B.brevis* L.O. 195 es el que lleva como fuente nitrógenada peptona de caseína, siguiéndole en orden decreciente la peptona de carne, peptona de gluten y ácido glutámico.

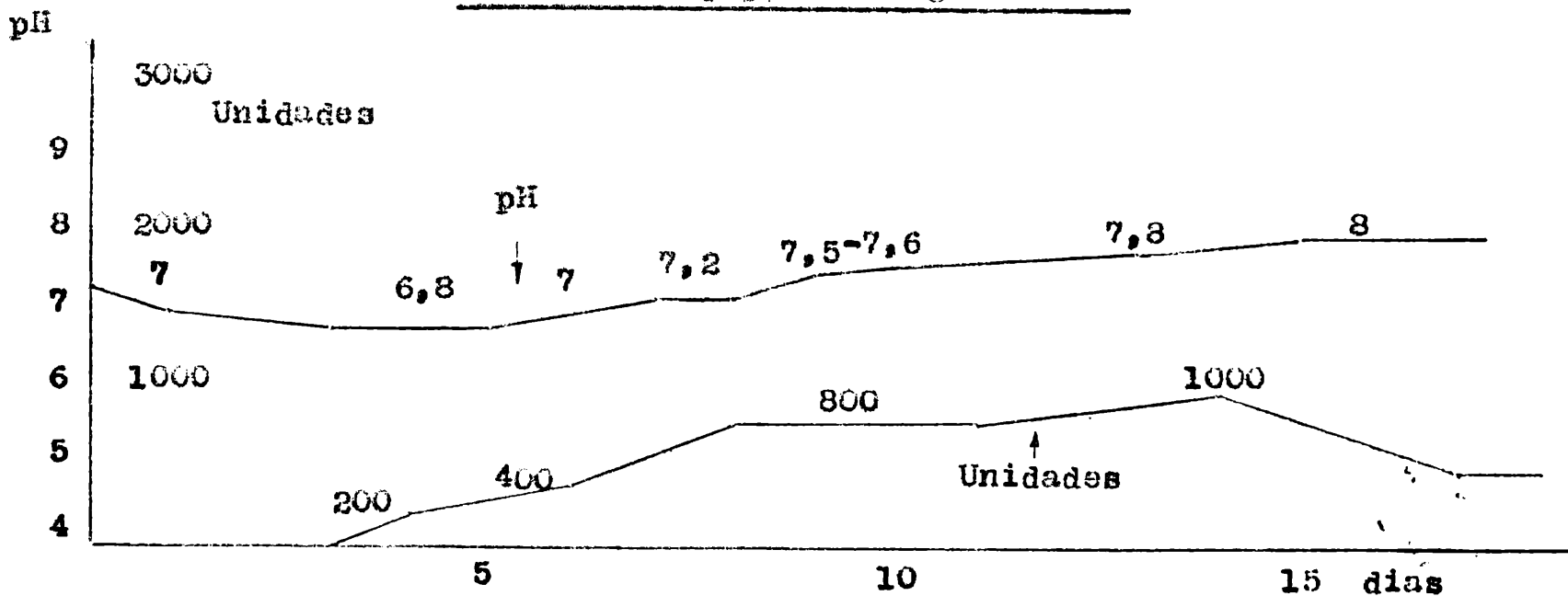
GRAFICO 12

Streptomyces olivaceus N R R L B-1125 (LoO. 194)

Medio con peptona de carne



Medio con peptona de gluten



Medio con ácido glutámico

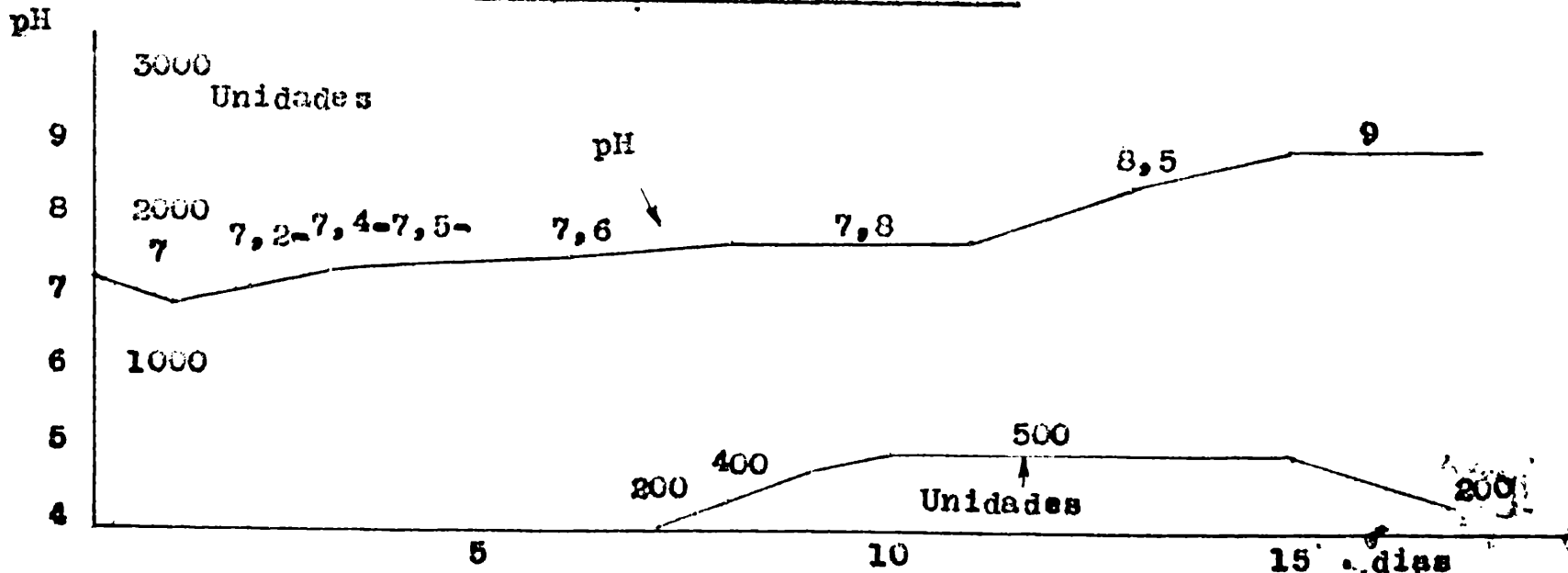
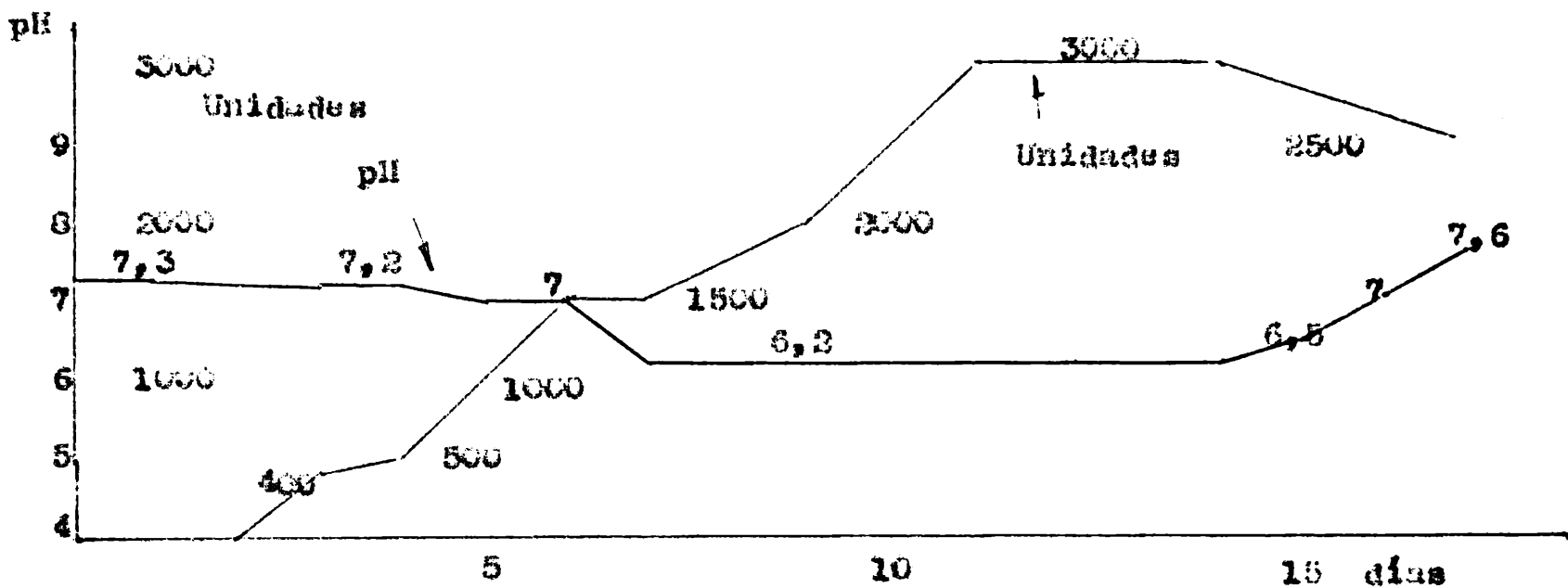


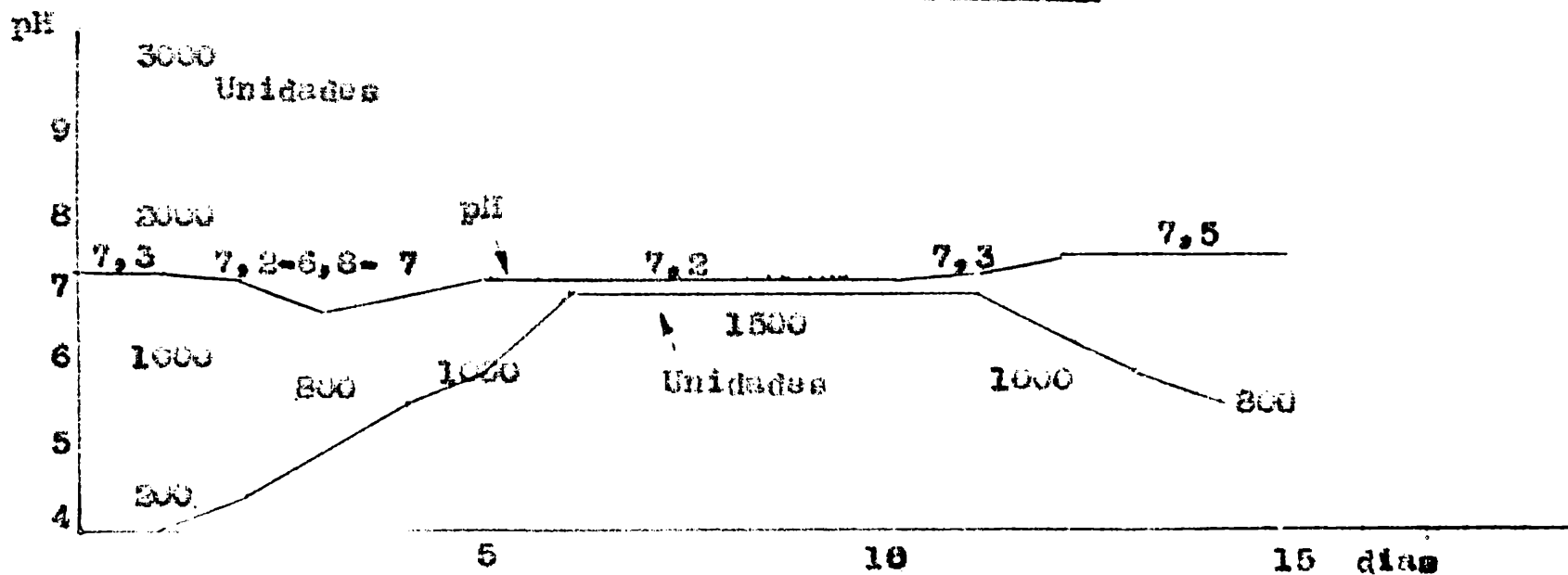
GRAFICO 13

Bacillus brevis- Tuoman 307 (L.O. 195)

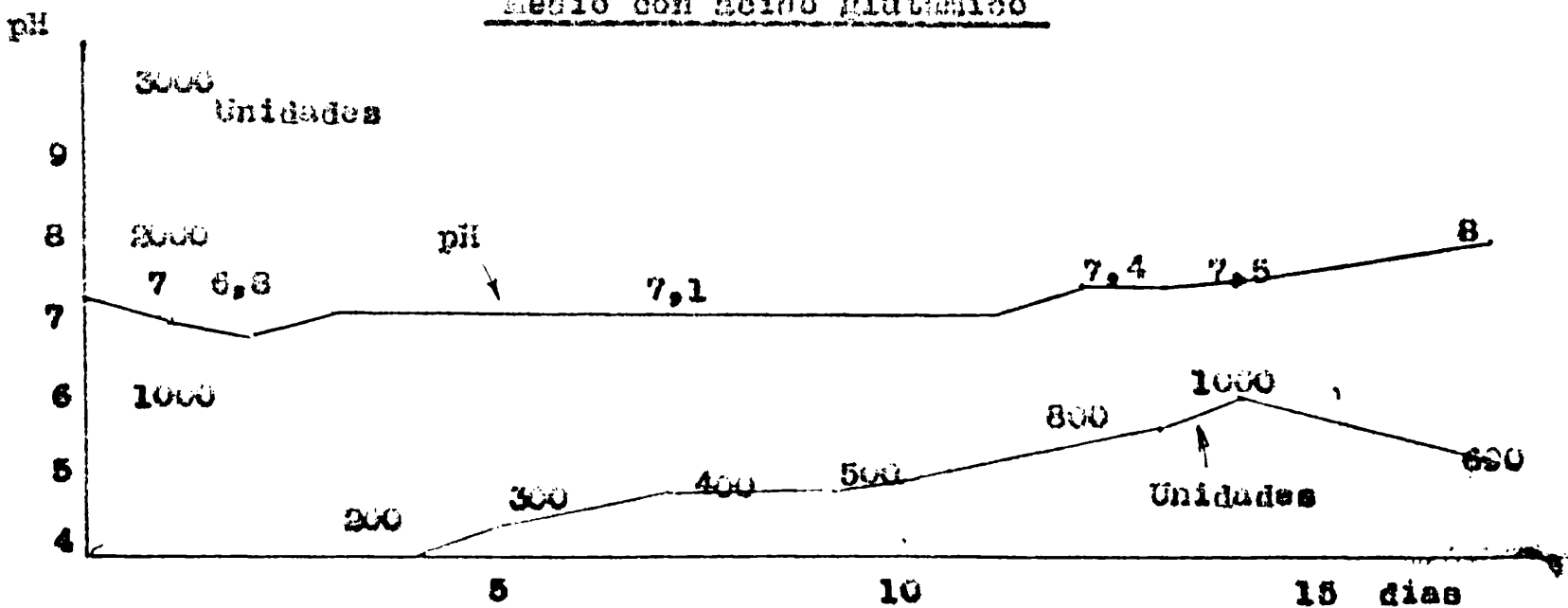
Medio con peptona de carne



Medio con peptona de cereales



Medio con ácido glutámico



3) Fuente de factores minerales y accesorios:

Como fuente de factores minerales y accesorios (también es fuente de nitrógeno) ensayamos tres tipos de "corn steep": un "corn steep" concentrado proveniente de las Destilerías Argentinas de Maíz (cedido por Squibb) y dos "licores de corn steep", es decir, "corn steep" sin concentrar, obtenidos en el laboratorio con técnicas que se describen en el capítulo correspondiente.

La diferencia existente entre los dos tipos de "licor de corn steep" consiste en que uno se obtiene a partir de maíz sin germinar y el otro a partir de maíz previamente germinado.

Para estudiar la influencia de los distintos "corn steep" sobre la producción de Vitamina B₁₂ tomamos como base el medio A de fermentación, que lleva 0,5 g % de "corn steep" (en base a extracto seco), y preparamos tres caldos con los distintos "corn steep".

Para que las cantidades de cada "corn steep" sean equivalentes debemos determinar el extracto seco de cada uno:

Extracto seco del "corn steep":	58,85 g %
Extracto seco del licor de "corn steep" (sin germinar)	1,64 g %
Extracto seco del licor de "corn steep" (germinado) ^x	3,30 g %

(x) Este "corn steep" es similar al empleado en la selección de medios de fermentación; los porcentajes se refieren a 100 cc de muestra.

Considerando los volúmenes de "corn steep" por agregar, la composición de los tres medios es ésta:

a) Corn steep (Ref. Arg. de Maíz) :	8,5 ml %
Peptona de caseína :	1,3 %
Dextrosa:	1,0 %
Ca CO ₃ :	0,5 %
Co (NO ₃) ₂ · 6 H ₂ O:	10,0 PPM
Agua destilada:	
b) Licor de Corn steep (sin germinar):	30,5 ml %
Peptona de caseína:	1,3 %
Dextrosa:	1,0 %
Ca CO ₃ :	0,5 %
Co (NO ₃) ₂ · 6 H ₂ O :	10,0 PPM
Agua destilada:	

c) Licor de "corn steep" (germinado):	15,2 ml	%
Peptona de caseína:	1,3	%
Dextrosa:	1,0	%
Ca CO ₃ :	0,5	%
Co (NO ₃) ₂ 6 H ₂ O:	10,0	PPM
Agua destilada.		

Las condiciones de trabajo son las mismas que en fermentaciones anteriores, empleando siempre el *S. olivaceus* L.O. 194 y el *B. brevis* 195, y preparando los inóculos con el medio III de germinación.

Con los resultados obtenidos se realizan los diagramas N^o 14 y 15.

De la observación de los mismos se deduce que el Licor de "corn steep" (germinado) es superior al Licor de "corn steep" (sin germinar), y éste al "corn steep" proveniente de las Destilerías Argentinas de Maíz. La poca eficacia de este último se debe probablemente a la presencia de sustancias preservadoras o al tiempo de almacenamiento.

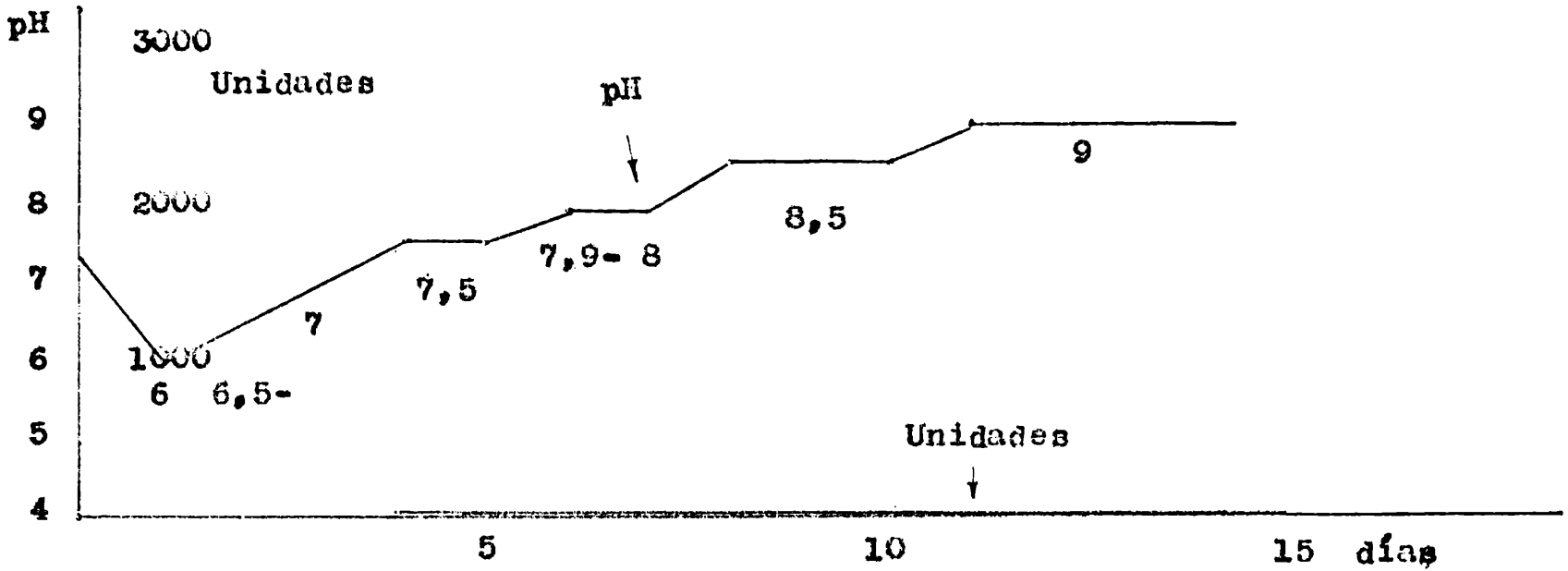
Además, se observa que el *B. brevis* es más resistente que el *S. olivaceus* a las condiciones adversas del medio pues en el caldo que contenía "corn steep" con sustancias preservadoras el *S. olivaceus* no produjo prácticamente nada de Vitamina, en cambio, el *B. brevis* llegó a producir 1500 unidades de Vitamina B₁₂ por cc.

En general, los rendimientos máximos de Vitamina B₁₂ obtenidos con ambas cepas son similares, pero el *Bacillus brevis* L.O. 195 mantiene la máxima producción de Vitamina B₁₂ durante más días que el *Streptomyces olivaceus* L.O. 194.

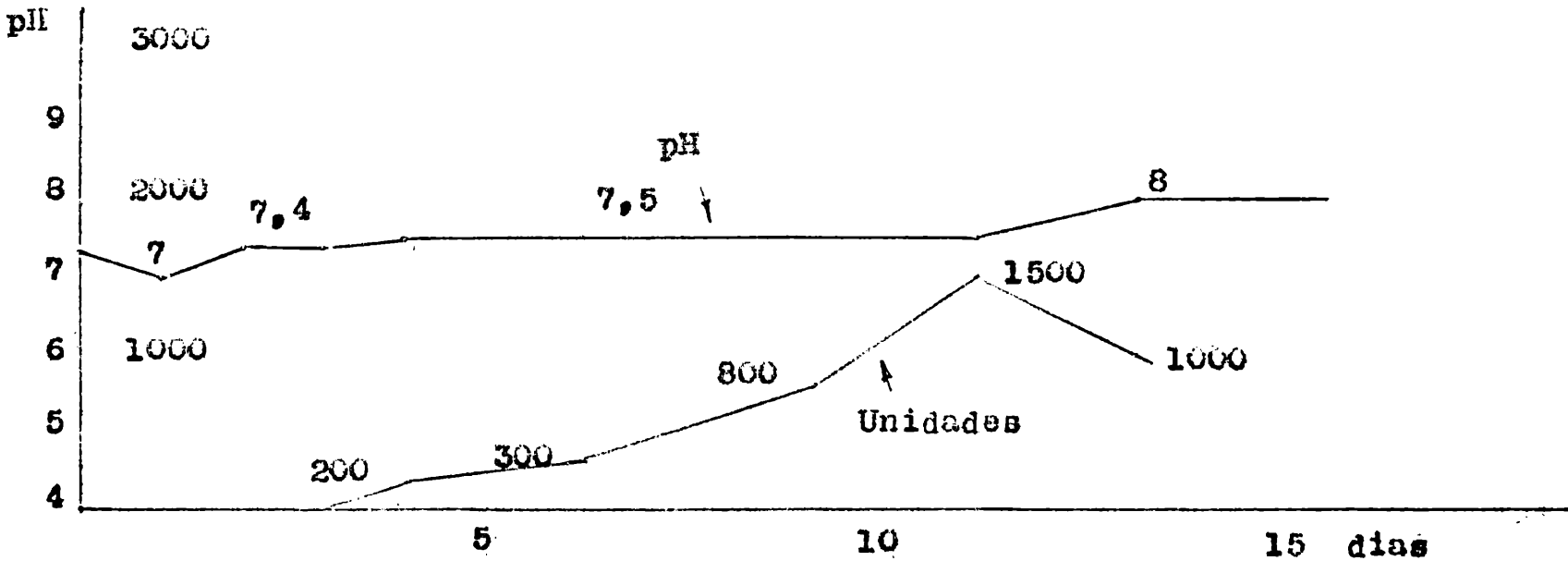
GRAFICO 14

Streptomyces olivaceus N R R L B-1125 (L.O. 194)

Medio con "Corn steep"



Medio con Licor de "Corn steep" (sin germinar)



Medio con Licor de "Corn steep" (germinado)

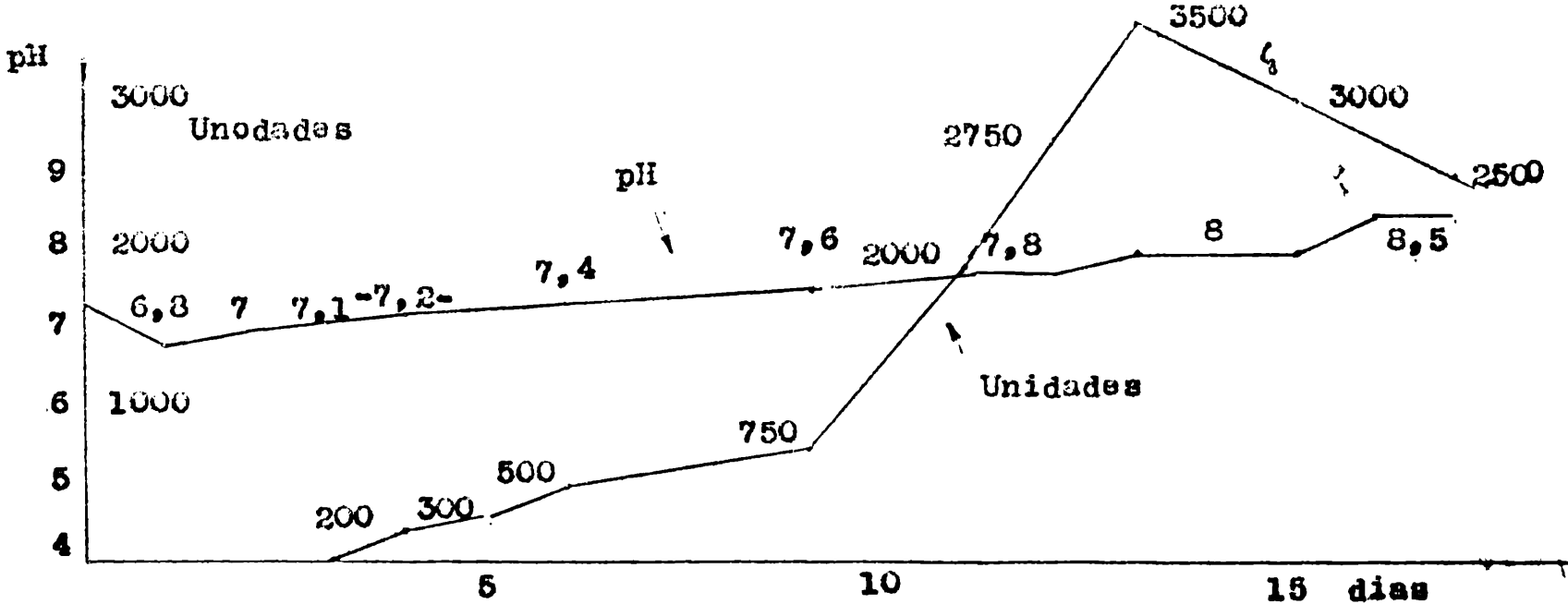
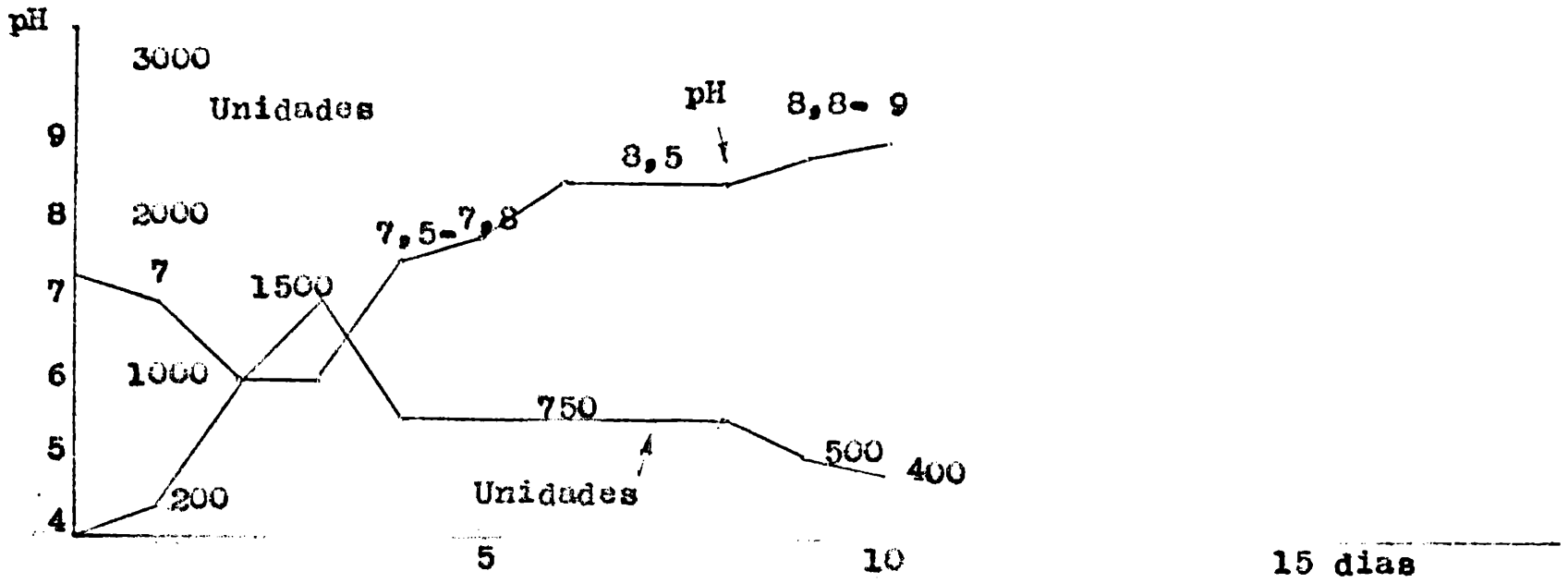


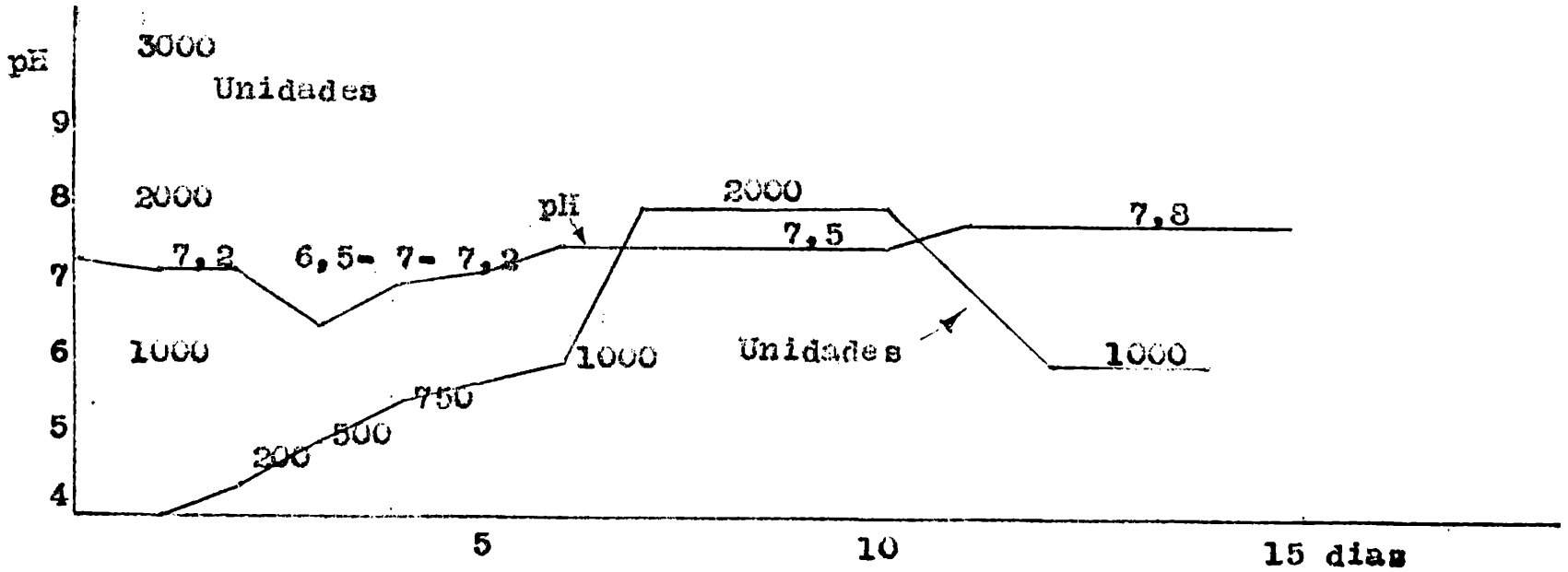
GRAFICO 15

Bacillus brevis Tucuman 307 (L.O. 195)

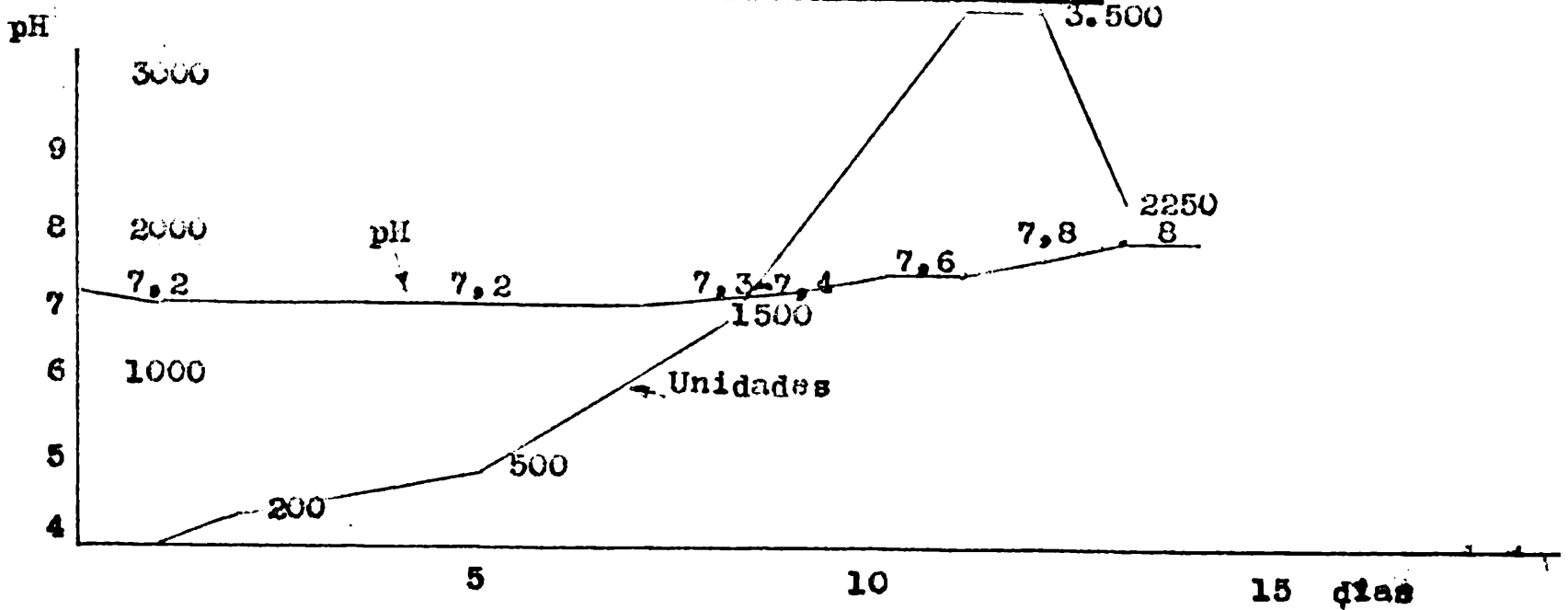
Medio con "Corn steep"



Medio con Licor de "Corn steep" (sin germinar)



Medio con Licor de "Corn steep" (germinado)



F E R M E N T A C I O N S U M E R G I D A

Selección de medios de fermentación

Fermentación sumergida

Selección de medios de fermentación

Basándonos en los resultados obtenidos en las fermentaciones por cultivo en superficie, empleamos como cepas productoras para realizar los ensayos en fermentaciones sumergidas, el *S. olivaceus* L.O. 194 y el *B. brevis* L.O. 195.

Para inocular cada germen al medio de fermentación debemos preparar un inóculo. El medio de germinación empleado con tal fin es el medio III de germinación (denominado caldo vitamínico) que seleccionamos anteriormente.

Su composición es:

a) Caldo común, compuesto por:

Peptona de carne:	10	g
Extra cto de carne:	10	g
Na Cl :	2,5	g
Na ₂ HPO ₄ :	1,3	g
Agua destilada: csp	1,0	litro.

b) Extracto de tomate : 30 cc

c) Extracto de levadura: 2 g

d) Glucosa : 5 g

e) Extracto de hígado 1:100 : 2 g

f) Jarabe polivitamínico: 2 cc.

El jarabe polivitamínico es el mismo que empleamos para la preparación del agar vitamínico, y cuya fórmula se detalló anteriormente.

El caldo se hierve durante 30 minutos para facilitar la disolución de los componentes, se ajusta su pH a 7-7,2, se vuelve a hervir durante 15 minutos, se filtra por algodón y se esteriliza en autoclave a 1 atmósfera de presión manométrica durante 30 minutos.

El medio se coloca en un frasco de Mariotte de un litro.

Una campana de vidrio para inoculación, unida a un brazo lateral del frasco por medio de un tubo de goma permite hacer una transferencia aséptica al fermentador.

Se tapa la boca superior del frasco y la boca de la campana con tapones de algodón recubiertos de gasa, se cierra el tubo de goma (que une la campana de inoculación al tubo lateral) con una pinza de

Mohr y se esteriliza todo durante 30 minutos a 1 atmósfera de sobre-presión.

Una vez frío el medio lo sembramos ya sea agregando con el ansa una porción de esporas provenientes de los tubos con agar inclinado donde se mantienen las cepas, o bien agregando con pipeta estéril una suspensión acuosa de esporas obtenida agregando 1 cm³ de agua destilada estéril al tubo donde se mantiene la cepa y suspendiendo las esporas por agitación.

Incubamos el medio sembrado durante 24 horas en una estufa a la temperatura correspondiente a cada germen, y luego colocamos el frasco de Mariotte en un sistema agitador de vaivén donde lo mantenemos a la misma temperatura durante 48 horas más. El aparato agitador se observa en el esquema adjunto y su descripción fué hecha al detallar los sistemas de fermentación empleados.

Para conducir la fermentación sumergida ensayamos los dos medios de fermentación siguientes:

Medio A, modificación del medio indicado para *Streptomyces olivaceus* por PFEIFER y colaboradores (1954). Es el mismo medio A ensayado para realizar fermentaciones por cultivo en superficie.

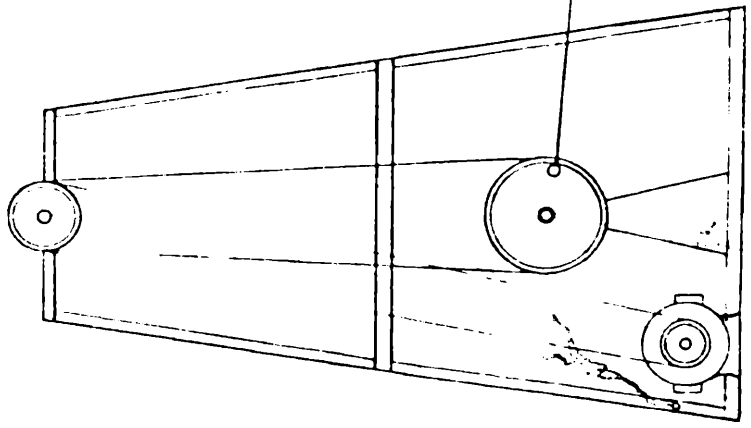
Su composición es ésta:

Licor de corn steep :	0,5 %	(en base a extracto seco)
Peptona de caseína :	1,3 %	
Dextrosa :	1,0 %	
Ca CO ₃ :	0,5 %	
Co (NO ₃) ₂ 6H ₂ O :	10,0 PPM	
Agua destilada		

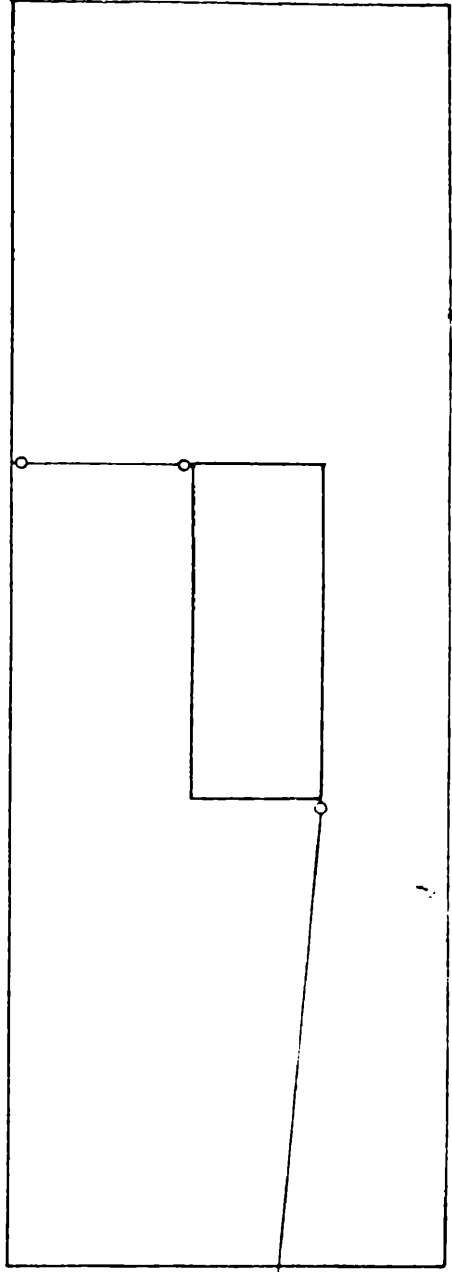
Medio C, indicado para *Bacillus brevis* por los Dres LUGONES y MUNDEL (1952).

Está compuesto por :

KH ₂ PO ₄ :	0,10	%
K ₂ H PO ₄ :	0,02	%
Glucosa :	2,0	%
Acido glutámico :	0,4	%
Fe SO ₄ 7 H ₂ O :	0,0003	%
Mg SO ₄ 7H ₂ O :	0,1	%
Zn SO ₄ 7H ₂ O :	0,001	%



mecanismo motor



Estufa con agitador de vapor

Co SO ₄ 6 H ₂ O :	0,002	%
Mn SO ₄ 5H ₂ O :	0,0003	%
Na Cl :	0,005	%
Agua destilada.		

De acuerdo con lo deducido al estudiar la fuente de carbono en lugar del 2 % agregamos el 1 % de glucosa al medio.

Ambos medios se hierven durante 30 minutos para facilitar la disolución de los componentes, se ajusta el pH a 7-7,5, se hierven 15 minutos, se llevan al volumen primitivo con agua destilada y se filtran por algodón.

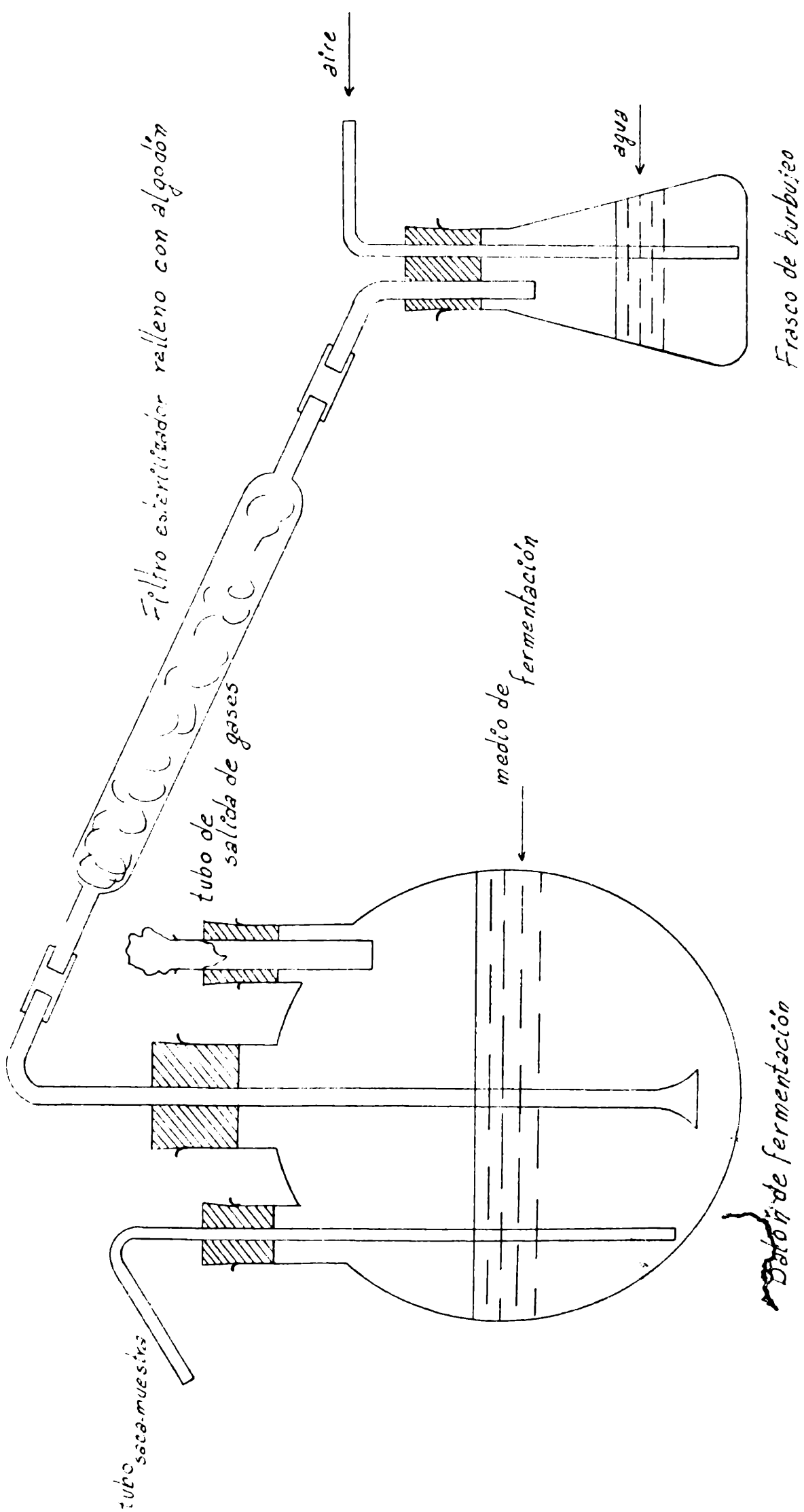
Se colocan tres litros de caldo en un balón de fermentación cuya descripción se realizó anteriormente y se esteriliza a una atmósfera de sobrepresión durante 30 minutos el conjunto integrado por el balón, el filtro de algodón y las uniones que deben ser de látex para evitar deterioros por efecto del calor. Estas se obturan con pinzas de Hoffmann para impedir que ascienda el caldo por las mismas y llegue a inutilizar el filtro de algodón. En el caso del medio C, una vez frío el caldo se agrega asépticamente la cantidad necesaria de glucosa en solución estéril al 50 %.

Puede procederse ahora a inocular el balón. Para ello se quita el tapón de algodón recubierto con gasa que obtura el tubo de salida de gases del balón y se flamea el tubo con la llama del mechero. Se hace circular un caudal pequeño de aire para asegurar la asepsia de la operación.

Se quita inmediatamente el tapón de algodón y gasa que obtura la boca de la campana de siembra del frasco de Mariotte, se la flamea con la llama del mechero y se hace coincidir el pico de descarga que lleva en su interior la campanita con el tubo de salida de gases del balón.

Se abre la pinza de Mohr y penetra así el inóculo en el balón. La cantidad de inóculo por agregar, según calculamos anteriormente, al tratar de la fermentación por cultivo en superficie, es de un 5 %, es decir: 150 ml de inóculo para 3000 ml de caldo.

Terminada la inoculación retiramos la campana de siembra, flameamos el tubo de salida de gases del balón y lo obturamos nuevamente con el tapón de algodón y gasa.



tubo muestra

Filtro esterilizador relleno con algodón

tubo de salida de gases

aire

agua

medio de fermentación

Botón de fermentación

Frasco de burbujeo

Luego aumentamos el caudal de aire para proveer de aereación y agitación al medio, e incubamos el medio sembrado a la temperatura conveniente: 28-30 °C para *Streptomyces olivaceus*, 36-37 °C para *Bacillus brevis*, en una estufa de cultivo en la cual se han practicado orificios para la introducción de los tubos de goma que conducen el aire al interior del balón.

La inyección de aire en el balón, necesaria dado el carácter aerobio de los gérmenes empleados, provoca la formación de espuma a medida que se desarrollan los mismos. Este inconveniente se subsana agregando al medio substancias antiespumantes. Entre ellas se encuentran: aceite de semilla de soya, aceite de manteca de cerdo; el mismo adicionado de un 1 % de alcohol octadecílico; alcohol etílico de 95° con un 1 % de alcohol octadecílico, emulsión de silicones, etc.

Empleamos en nuestro trabajo los silicones en emulsión acuosa, pues a su valor como antiespumantes agregan la propiedad de ser inertes respecto a los gérmenes en estudio.

El agregado de los silicones (esterilizados durante 30 minutos a 1 atmósfera de presión manométrica) se efectúa a medida que la formación de espuma así lo requiere, mediante pipeta estéril a través del tubo de salida de gases previamente destapado y flameado con la llama de un mechero.

Generalmente, el volumen de antiespumante que se agrega cada vez no excede de unas pocas gotas.

Tratándose de gérmenes aerobios, es importante determinar el caudal óptimo de aire para la fermentación, aire que además produce la agitación del medio.

Con tal fin, ensayamos en distintas fermentaciones con ambos caldos el pasaje de caudales crecientes de aire: en una fermentación el caudal es de $\frac{1}{2}$ litro de aire por litro de medio de fermentación y por minuto; en otra es de 1 litro por litro y por minuto, y en una tercera es de $1\frac{1}{2}$ litro por litro y por minuto, sacamos muestras cada 24 horas determinando en ellas Vitamina B_{12} y pH y observamos que la producción de Vitamina B_{12} crece al aumentar el caudal de aire, pero ya un caudal de $1\frac{1}{2}$ litro de aire por litro de medio y por minuto es demasiado grande y provoca la formación de tanta espuma que resulta imposible de controlar.

Por consiguiente, adoptamos en lo sucesivo el caudal de 1 litro de aire, por litro de medio y por minuto.

Para el caudal óptimo de 1 litro por litro por minuto, los resultados obtenidos ensayando los caldos A y C se observan en los gráficos Nº 16 y Nº 17. El agregado de antiespumante se inició a las 24 horas de comenzada la fermentación y se suspendió a los 7 días.

Observamos que el caldo A es superior al C para los dos gérmenes en estudio: *Streptomyces olivaceus* L.O.194 y *Bacillus brevis* L.O.195, y que los títulos obtenidos con *B. brevis* son superiores a los logrados con *S. olivaceus*.

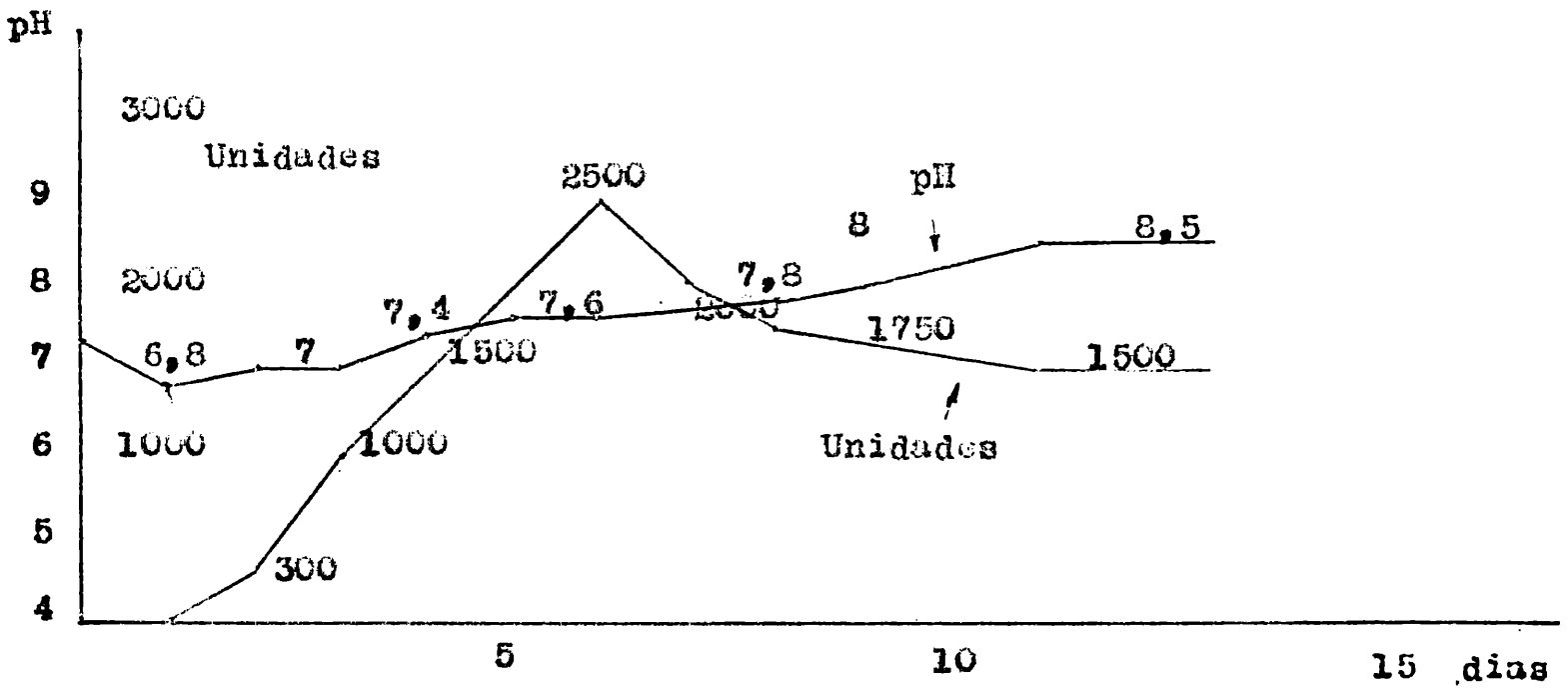
Por lo tanto, en los ensayos subsiguientes utilizamos el medio A, en el cual efectuamos variaciones para estudiar los rendimientos de Vitamina B₁₂.

En estas fermentaciones y las siguientes, el "licor de corn steep" empleado es el obtenido a partir de maíz germinado, con un extracto seco de 3,30 g % referido a 100 cc de muestra.

GRAFICO 16

Streptomyces olivaceus N R R L B-1125 (L.O. 194)

Medio A



Medio C

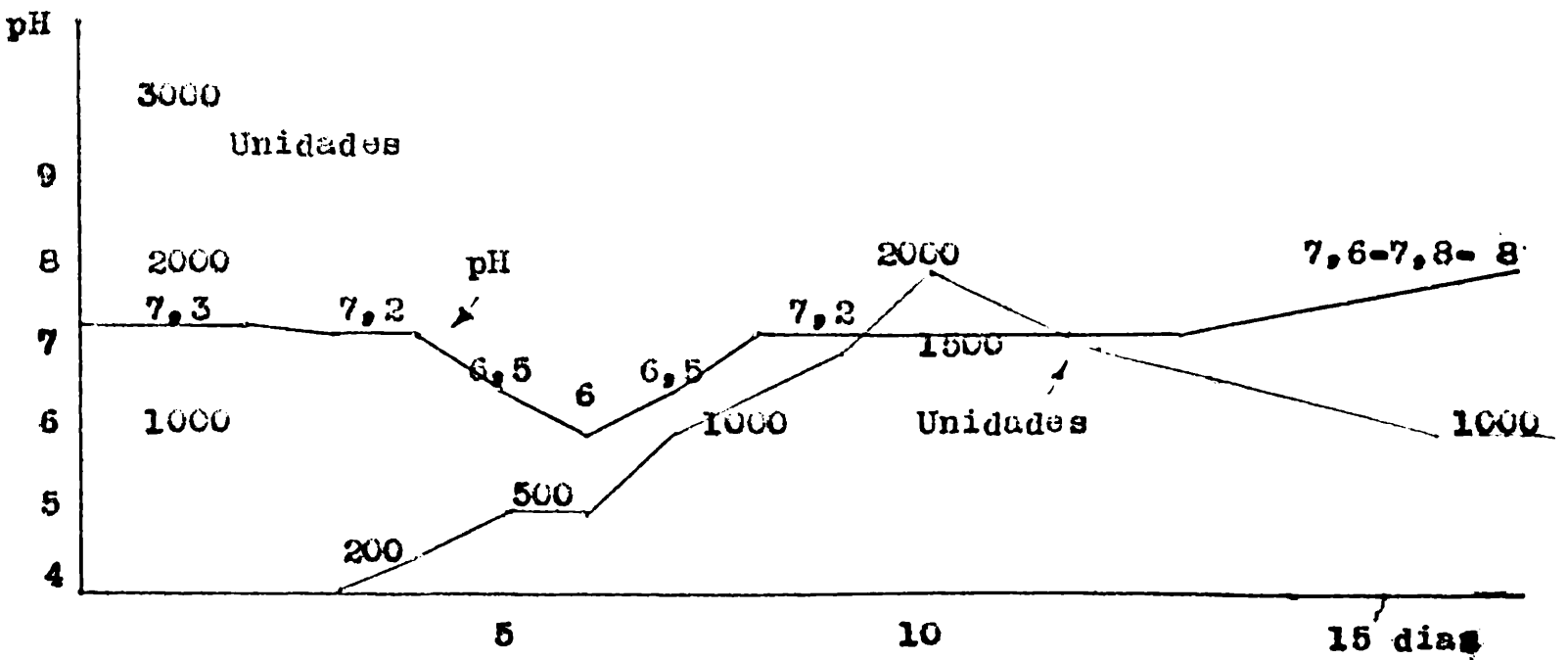
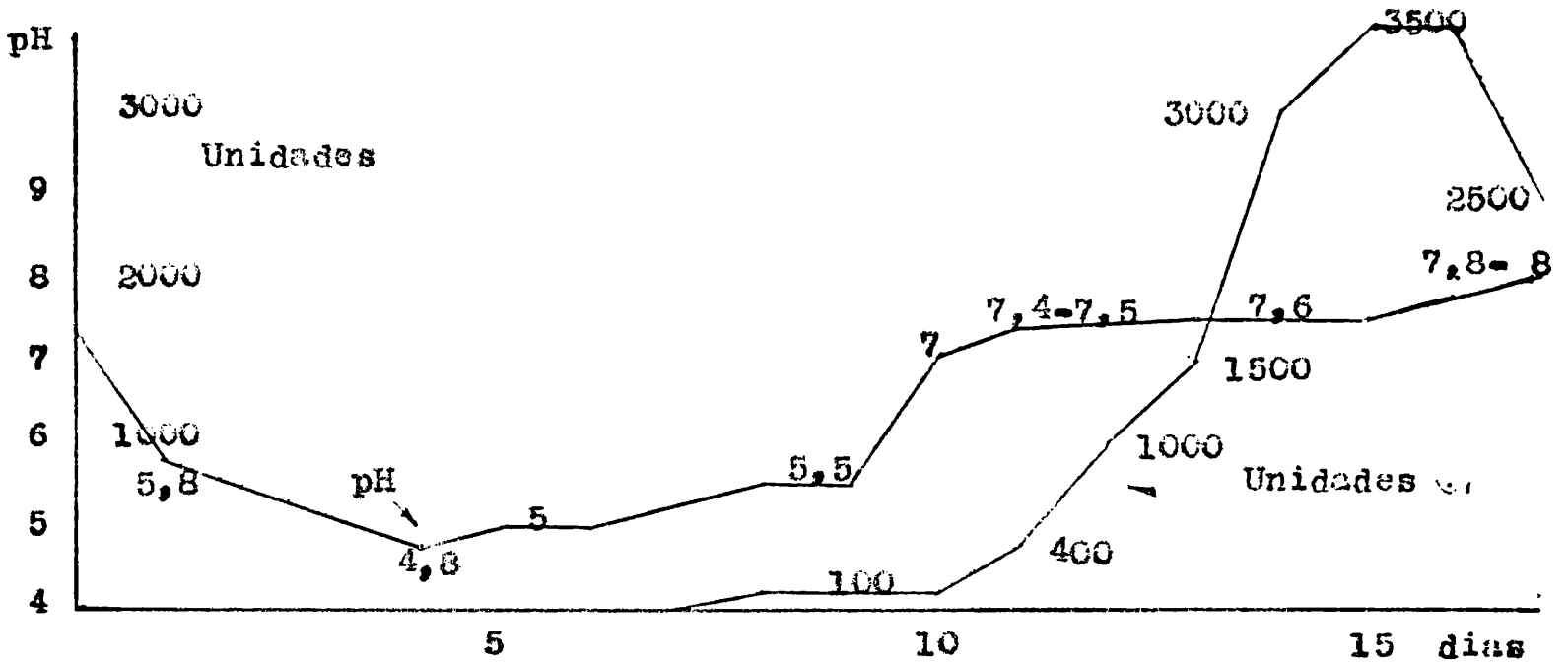


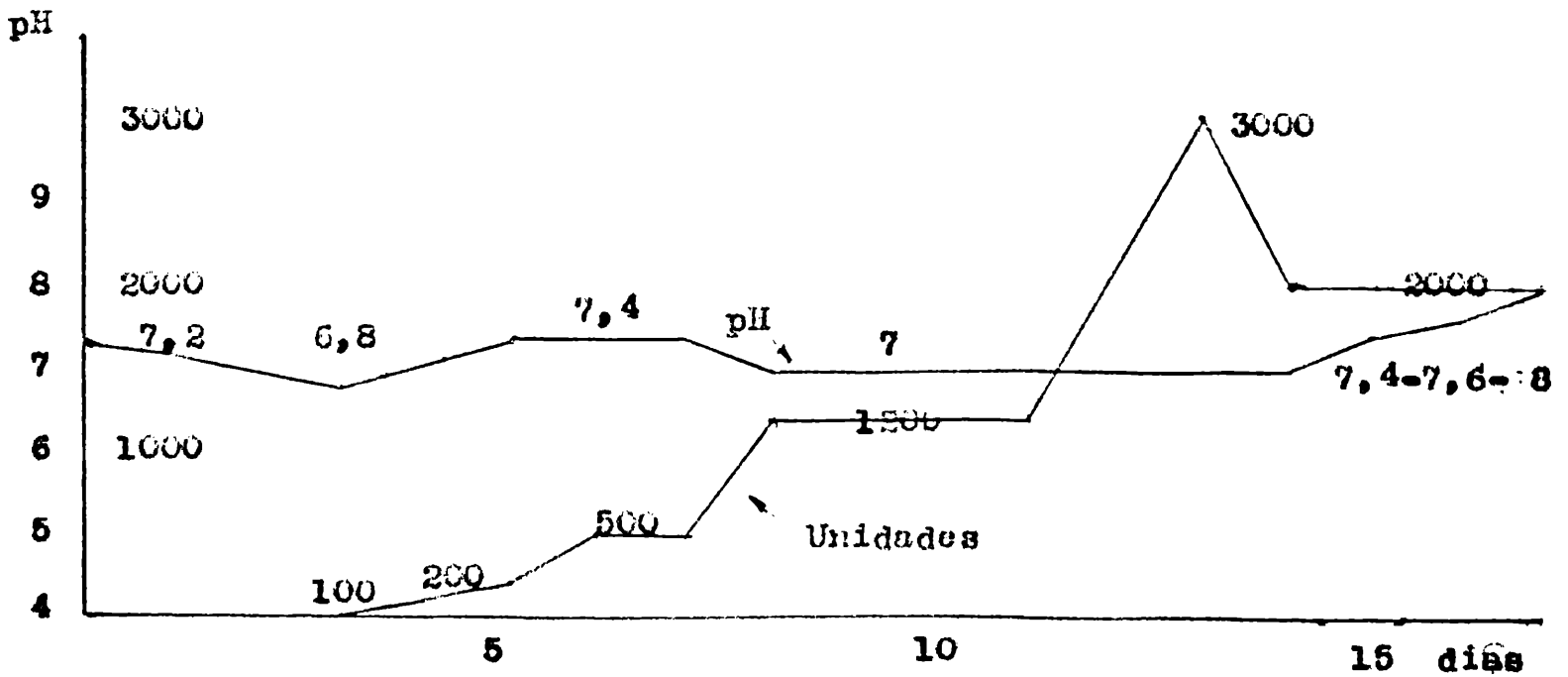
GRAFICO 17

Bacillus brevis Tucuman 307 (L.O. 195)

Medio A



Medio C



Variables introducidas en el estudio de los tendimientos

Variables introducidas en el estudio de los rendimientos

La variable estudiada en fermentación sumergida es: Fuente de nitrógeno.

Las cepas empleadas son las seleccionadas en los ensayos realizados por fermentación en superficie: *Streptomyces olivaceus* L.O.194 y *Bacillus brevis* L.O. 195.

Como fuente de nitrógeno, en reemplazo de la peptona de caseína empleada en el medio A de fermentación, recurrimos a las siguientes sustancias: Peptona de carne, nitrato de amonio y urea.

Los porcentajes de nitrógeno total respectivos son:

Peptona de carne :	11,76 % (Según método de Kjeldahl)
Nitrato de amonio:	17,5 %
Urea :	23,3 %
Peptona de caseína:	12,46 % (" " " ")

El modo preparatorio así como el análisis de las dos peptonas indicadas se detallan en el capítulo correspondiente.

Basándonos en los porcentajes de N_2 calculamos las cantidades que equivalen a 1,3 g % de peptona de caseína, cantidad que agregamos al medio A de fermentación.

Esas cantidades son:

Peptona de carne :	1,4 %
Nitrato de amonio:	0,89 %
Urea :	0,67 %

Tomando como base el caldo A preparamos tres caldos de la siguiente composición:

1) Licor de corn steep (germinado) 0,5% (en base a extracto seco)

Peptona de carne :	1,4%
Dextrosa :	1,0%
Ca CO ₃ :	0,5%
Co (NO ₃) ₂ ·6 H ₂ O :	10,0 PPM
Agua destilada:	

2) Licor de corn steep (germinado) 0,5% (en base a extracto seco)

Nitrato de amonio:	0,89 %
Dextrosa :	1,0 %

Co (NO₃)₂·6 H₂O : 10,0 PPM

Agua destilada.

3) Licor de corn steep (germinado) 0,5 % (en base a extracto seco)

Urea : 0,67 %

Dextrosa : 1,0 %

Ca CO₃ : 0,5 %

Co (NO₃)₂·6 H₂O : 10 PPM.

Agua destilada:

La preparación de los medios que llevan peptona de carne y nitrato de amonio respectivamente es similar a la indicada en las fermentaciones anteriores.

El medio que lleva urea en su composición impone una variante debido a la esterilización, pues si se esterilizan todos los componentes del mismo en autoclave se produce una pérdida de amoníaco proveniente de la urea. Por lo tanto, procedemos a esterilizar en autoclave el resto de los componentes ya dentro del balón de tres bocas y agregamos luego asépticamente al balón de fermentación una solución acuosa de urea previamente esterilizada por filtración a través de filtro Seitz.

Un ajuste final de pH se realiza agregando ácido ó alcali estériles en forma aséptica.

Con los dos germenés ya citados preparamos cultivos con agitación en el medio III de germinación y con ellos inoculamos los balones que contienen los medios de fermentación.

La técnica de estas operaciones se describió al tratar de la selección de medios de fermentación (fermentación sumergida). Luego regulamos el caudal de aire que penetra en los balones de modo que circulen 3 litros de aire por minuto (es decir: 1 litro de aire por litro de medio y por minuto), y colocamos los balones en estufas de cultivo a la temperatura correspondiente a cada germen: 28-30 °C para *Streptomyces olivaceus*; 36-37 °C para *Bacillus brevis*.

A las 24 horas de iniciada la incubación comenzamos el agregado de antiespumante y lo suspendimos al octavo día dado que la producción de espuma había disminuído notablemente.

Como en las fermentaciones anteriores, cada 24 horas extrajimos muestra de los balones en que se realizan las fermentaciones.

La extracción se hizo según la técnica indicada anteriormente. En cada muestra se determinó el pH y se valoró la Vitamina B₁₂ producida.

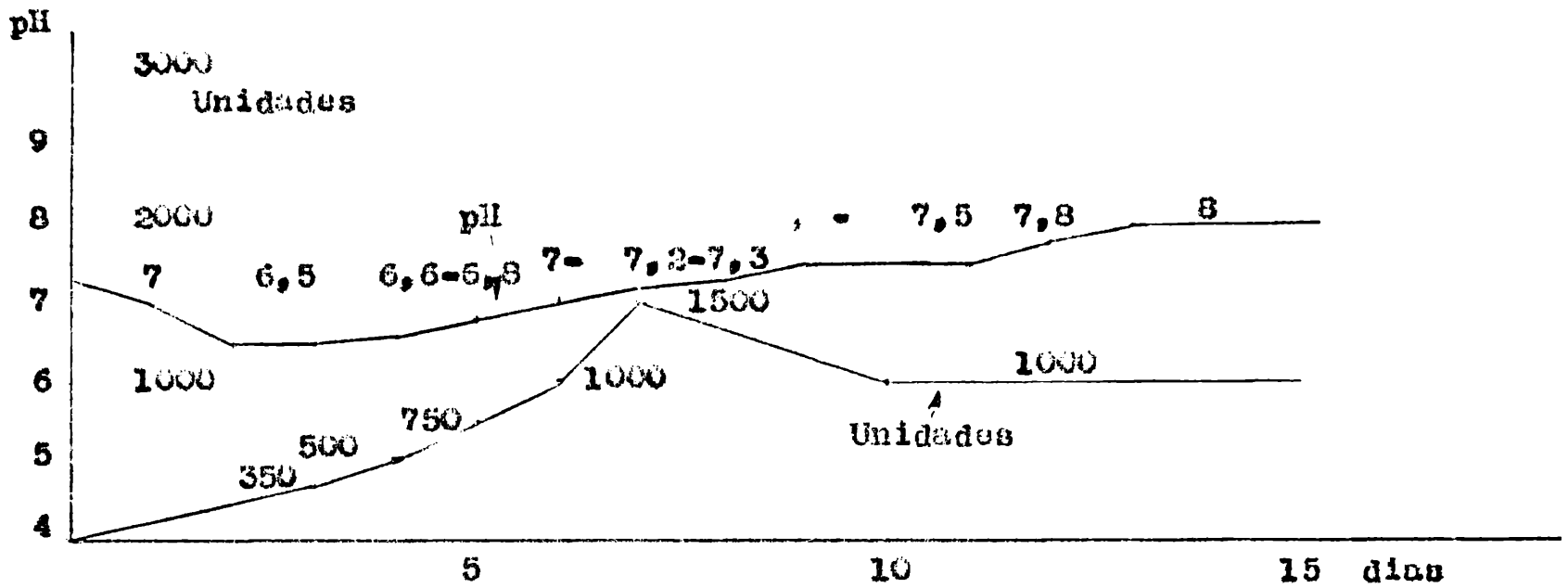
Con estos valores se construyeron los gráficos Nº 18 y 19. De la observación de los mismos y de su comparación con los gráficos Nº 16 y 17 en la parte correspondiente al medio A, se deduce que el medio que permite obtener mayores rendimientos ya sea empleando *S. olivaceus* L.O. 194 o *B. brevis* L.O. 195 es el que lleva como fuente nitrogenada peptona de caseína, siguiéndole en orden decreciente la peptona de carne y la urea en un mismo nivel para ambos gérmenes, y luego el nitrato de amonio con resultados bastante inferiores.

Observamos también que los títulos obtenidos con *B. brevis* son superiores a los logrados con *S. olivaceus* y que la producción máxima de Vitamina B₁₂ se mantiene durante un tiempo más largo con aquél germen.

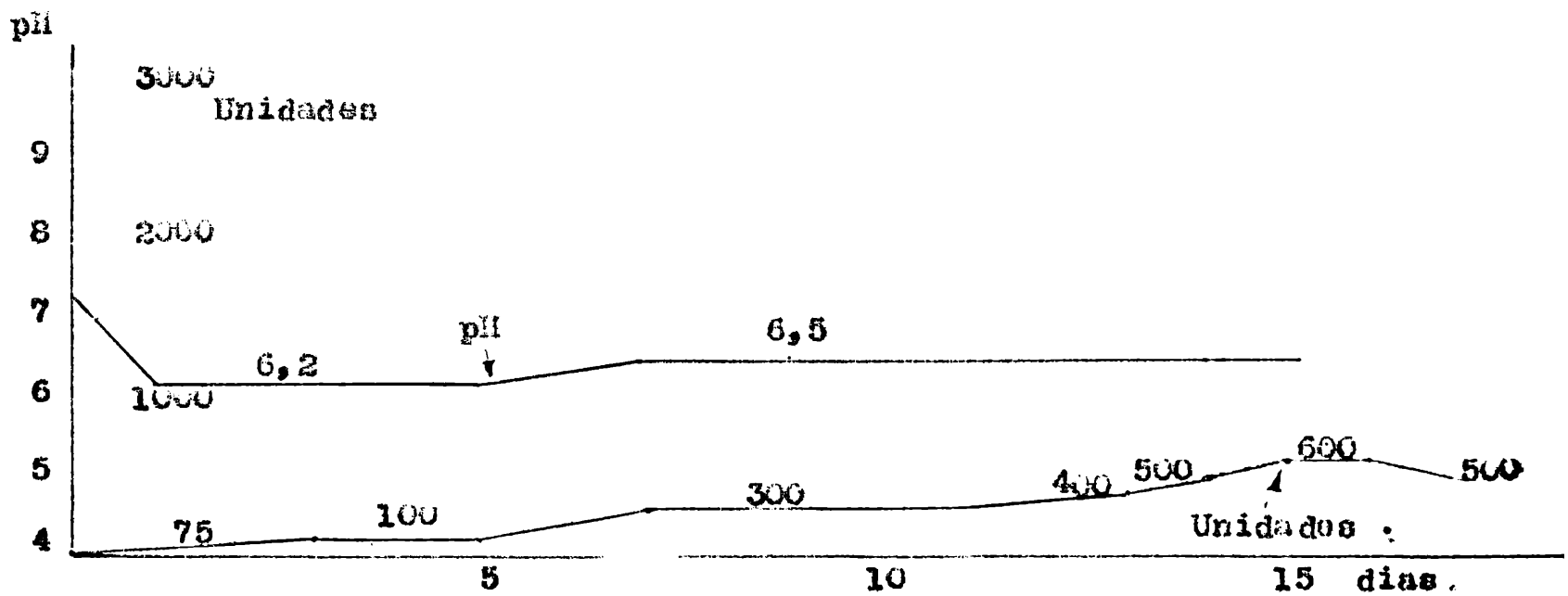
GRAFICO 18

Streptomyces olivaceus N R R L- B- 1125 (L.O. 194)

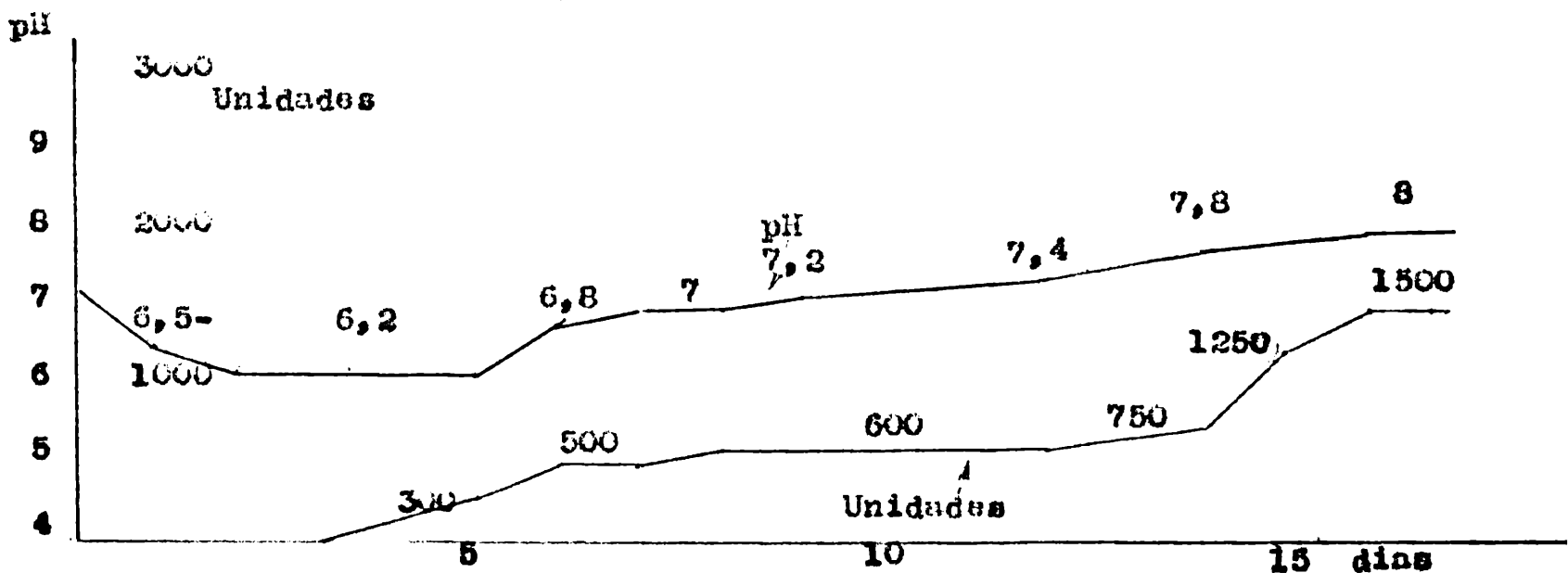
Medio con peptona de carne



Medio con nitrato de amonio



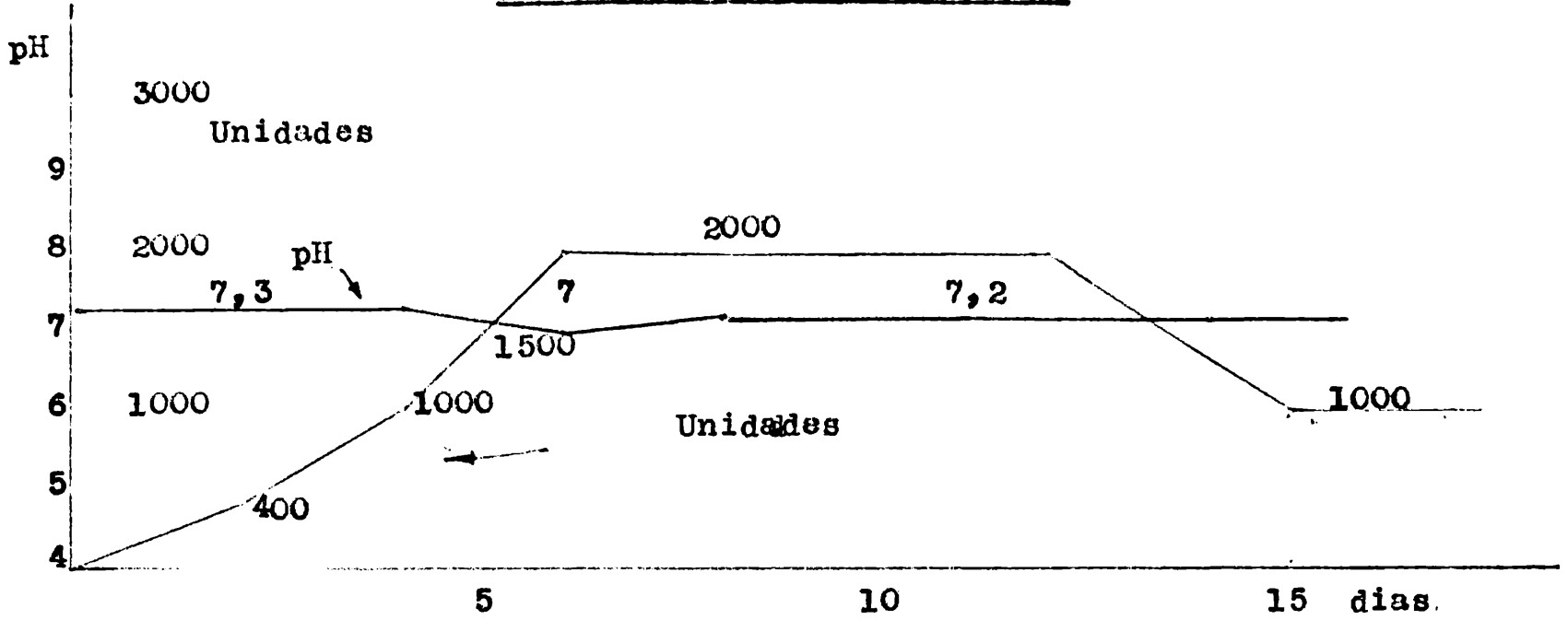
Medio con urea



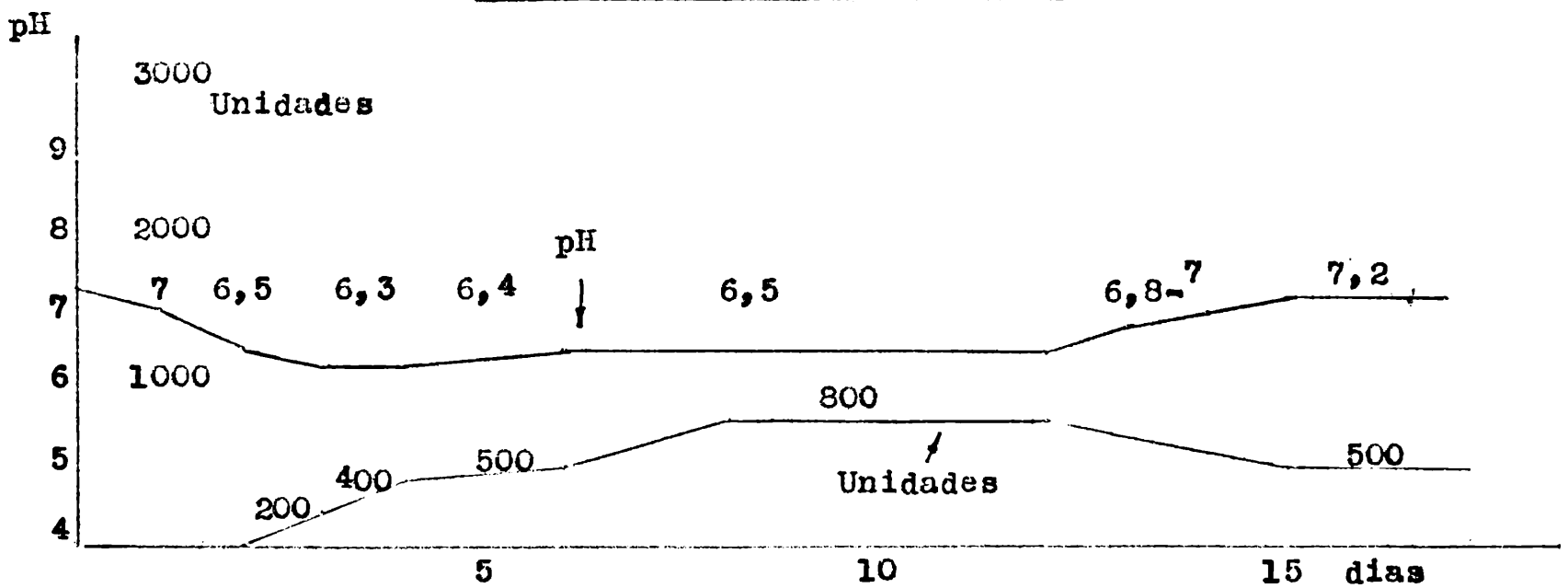
G R A F I C O 19

Bacillus brevis - Tucuman 307 (L.O. 195)

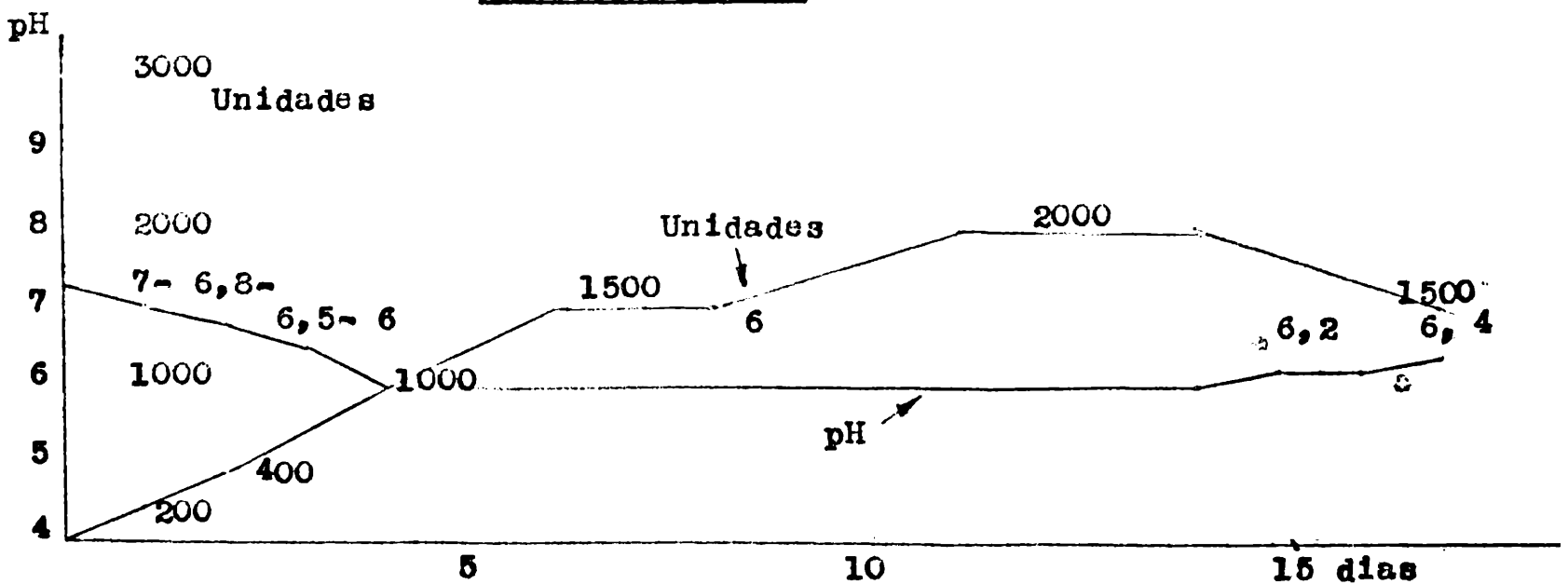
Medio con peptona de carne



Medio con nitrato de amonio



Medio con urea



V A L O R A C I O N M I C R O B I O L O G I C A

D E L A V I T A M I N A B₁₂

VALORACION MICROBIOLOGICA DE LA VITAMINA B₁₂

Para valorar la Vitamina B₁₂ producida, utilizamos un método microbiológico que se basa en el desarrollo del *Lactobacillus leichmannii* A.T.C.C. 4797 por el agregado de Vitamina B₁₂ a un medio de cultivo sintético deficiente solamente en ese factor. Este desarrollo es directamente proporcional a la concentración de Vitamina.

La medida del desarrollo se establece por turbidimetría o por titulación acidimétrica. Como término de comparación se usa una solución patrón de Vitamina B₁₂, que se agrega en cantidad y diluciones conocidas, y se somete a las mismas condiciones de trabajo que la muestra por valorar.

Este método, que utiliza como medio de cultivo el indicado por CAPPs, ha sido manejado con una amplia experiencia anterior por el Doctor MUNDEL, quien ha introducido un conjunto de modificaciones sucesivas no publicadas en la literatura.

Preparación de los elementos necesarios para realizar la valoración:

1) Medio básico de cultivo.

Como medio de cultivo utilizamos el medio básico indicado por Capps, el que contiene como fuente de aminoácidos caseína hidrolizada libre de Vitaminas, lo cual evita las dificultades de agregar los aminoácidos por separado. Es un medio de doble concentración.

Su fórmula es ésta:

Caseína hidrolizada libre de Vitaminas :	12	g
Dextrosa	40	g
Acetato de sodio	20	g
Cistina	0,2	g
Triptófano	0,2	g
Adenina	0,01	g
Guanina	0,01	g
Uracilo	0,01	g
Xantina	0,001	g
Clorhidrato de tiamina	0,002	g
Riboflavina	0,002	g
Niacina	0,002	g
Clorhidrato de piridoxina	0,004	g

d- Pantotena to de calcio	0,2	mg
Acido fólico	0,1	mg
Biotina	0,01	mg
Acido p- aminobenzoico	0,2	mg
Tween 80	0,25	ml
Fosfato dipotásico	0,1	g
Fosfato monopotásico	0,1	g
Sulfato de magnesio	0,4	g
Cloruro de sodio	0,02	g
Sulfato ferroso	0,02	g
Sulfato de manganeso	0,02	g
Agua destilada	1.000	ml

Algunos de sus componentes requieren una preparación previa :

a) Caseína hidrolizada libre de Vitaminas:

Para prepararla se procede a hidrolizar 200 g de caseína libre de Vitaminas con 1.000 ml de ácido clorhídrico al 20 % por ebullición a reflujo durante 8 horas. Se destila al vacío hasta concentración siruposa, se adicionan 750 ml de agua destilada y se repite la destilación.

Se disuelve el residuo en agua destilada, se ajusta pH 3 la solución con hidróxido de sodio y se diluye a 2 litros.

Se agita la solución con 40 g de "Morit A" a 50- 60 °C durante 1 hora y se filtra.

Se ajusta a pH 8 el filtrado con hidróxido de sodio y se vuelve a completar el volumen a 2 litros.

Se conserva la solución en heladera bajo tolueno.

b) Solución de cistina y triptófano.

Para prepararla se suspenden 4 g de l- cistina y 4 g de d-l- triptófano (o 2 g de l-triptófano) en 700 -800 ml de agua destilada, se calientan a 70-85 °C y se agrega ácido clorhídrico diluido al 1:2, gota a gota agitando hasta que las dos sustancias se hayan disuelto.

Se enfría y se agrega agua destilada hasta completar un volumen de 1.000 ml.

Se conserva bajo tolueno a una temperatura no inferior a 10°C .De esta solución se utilizan 50 ml para 1 litro de medio de cul-

tivo.

c) Solución de adenina, guanina y uracilo.

Se disuelven en caliente 100 mg de sulfato de adenina, clorhidrato de guanina y uracilo respectivamente en 10 ml de ácido clorhídrico al 17 %; se enfría y se agrega agua destilada hasta completar un volumen de 100 ml.

Se conserva en heladera bajo tolueno.

De esta solución se utilizan 10 ml para 1 litro de medio de cultivo.

d) Solución de xantina.

Se suspenden 200 mg de xantina en 30-40 ml de agua destilada. Se calientan hasta cerca de 70 °C, se agregan 6 ml de solución de amoníaco al 10 % y se agita hasta disolución total.

Se enfría y se agrega agua destilada hasta completar un volumen de 200 ml.

Se conserva en heladera bajo tolueno.

Se utiliza 1 ml de esta solución para 1.000 ml de medio de cultivo.

e) Solución de riboflavina, tiamina, biotina y ácido nicotínico.

Se prepara una solución de ácido acético 0,02 N de modo que cada ml contenga 200 microgramos de riboflavina, 200 microgramos de clorhidrato de tiamina, 200 microgramos de ácido nicotínico y 1 microgramo de biotina.

Se conserva en heladera, en la oscuridad, bajo capa de tolueno.

Se utilizan 10 ml de esta solución para 1.000 ml de medio de cultivo.

f) Solución de ácido p-aminobenzoico, pantotenato de calcio, piridoxina y ácido fólico.

Se prepara una solución en alcohol neutro al 25 % que contenga por ml: 10 microgramos de pantotenato de calcio, 200 microgramos de clorhidrato de piridoxina y 5 microgramos de ácido fólico.

Se conserva en heladera.

Se emplean 20 ml de esta solución para 1.000 ml de medio de cultivo.

g) Solución reguladora.

Se disuelven 1 g de fosfato monopotásico y 1 g de fosfato

dipotásico en agua destilada, y se llevan con agua destilada hasta un volumen de 200 ml. Se agregan 2 gotas de ácido clorhídrico. Se conserva bajo tolueno.

h) Solución salina.

Se disuelven en agua destilada: 4 g de sulfato de magnesio; 0,2 g de cloruro de sodio; 0,2 g de sulfato ferroso, y 0,2 g de sulfato de manganeso, completando a un volumen de 200 ml con agua destilada. Se agregan 2 gotas de ácido clorhídrico. Se conserva bajo tolueno.

Para preparar el medio de cultivo básico se procede a disolver en unos 500 ml de agua destilada la caseína hidrolizada libre de Vitaminas, la dextrosa y el acetato de sodio.

Se agregan luego las soluciones preparadas con los demás componentes en las cantidades indicadas en cada preparación. Se adiciona luego el Tween 80, se ajusta el pH a 6,8- 6,9 por agregado de hidróxido de sodio 0,1 N y se completa el volumen a 1.000 ml con agua destilada.

El medio se conserva sin esterilizar, bajo capa de tolueno en la heladera, hasta unos seis meses después de su elaboración.

2) Soluciones standard de Vitamina B₁₂.

Partiendo de Vitamina B₁₂ cristalizada (Vitamina B₁₂ Merck) preparamos las siguientes soluciones:

a) Solución standard concentrada de Vitamina B₁₂-

Una cantidad exactamente pesada de Vitamina B₁₂ se disuelve en alcohol al 25 % de modo que cada ml contenga 10 γ de Vitamina B₁₂. Se conserva en la heladera bajo capa de tolueno.

A partir de esta solución concentrada preparamos las siguientes soluciones:

b) Solución standard de Vitamina B₁₂ Nº 1.

Se diluye 1 ml de la solución standard concentrada de Vitamina B₁₂ con agua destilada hasta un volumen de 100 ml; por consiguiente, cada ml de la nueva solución contiene 0,1 γ de Vitamina B₁₂.

c) Solución standard de Vitamina B₁₂ Nº 2.

Se diluye 1 ml de la solución standard Nº 1 de Vitamina B₁₂ con agua destilada hasta un volumen de 200 ml; por consiguiente, cada ml de la nueva solución contiene 0,5 m γ de Vitamina B₁₂.

d) Solución standard de Vitamina B₁₂ N° 3-

Se diluyen 10 ml de la solución standard N° 2 con agua destilada hasta un volumen de 100 ml; por consiguiente, cada ml de la nueva solución contiene 0,05 m γ de Vitamina B₁₂.

3) Mantenimiento de la cepa de *L. leichmannii* ATCC 4797.

El cultivo stock de *Lactobacillus leichmannii* se mantiene en agar vitamínico, cuya composición se detalló en el capítulo de selección de cepas productoras de Vitamina B₁₂.

La siembra se realiza por punción. Se incuba en estufa a 36-37 °C durante 24 horas y se conserva luego en la heladera hasta el próximo repique.

4) Preparación del inóculo.

El inóculo se prepara 24 horas antes de su empleo, a partir del cultivo stock, sembrando el germen en un tubo de ensayo que contiene 1 ml de la solución standard N° 2 (que contiene 0,5 m γ de Vitamina B₁₂ por cm³), 1 ml de agua destilada y 2 ml de medio de cultivo básico, y que ha sido esterilizado previamente en autoclave durante media hora a 3/4 de atmósfera de presión manométrica-

Se incuba en estufa a 36-37 °C durante 24 horas.

En el momento de ser usado se diluyen 0,2 ml (unas 4 gotas) del inóculo en 5 ml de agua destilada estéril por dos veces consecutivas. La dilución final es de 1:625 aproximadamente.

5) Preparación de las muestras.

Para valorar las muestras extraídas de las distintas fermentaciones se realizan con las mismas una serie de diluciones.

a) Solución 1: 100

Solución original : 1 ml

Agua destilada: 99 ml

b) Solución 1: 1.000 :

Solución 1 : 100 : 0,5 ml

Agua destilada: 4,5 ml

c) Solución 1: 10.000 :

Solución 1: 1.000 : 0,5 ml

Agua destilada : 4,5 ml.

Como se trata de Vitamina B₁₂ obtenida por fermentación, no es necesario,

realizar diluciones mayores de las muestras.

6) Preparación de la escala de ensayo:

Se dispone una serie de 10 tubos de ensayo en la siguiente forma:

Tubo	Solución 1:100 cc	Solución 1:1000 cc	Solución 1:10000 cc	Agua dest. cc	Medio basal cc	Dilución por tubo
1	2,0	-	-	-	2	1:50
2	1,0	-	-	1,0	2	1:100
3	0,5	-	-	1,5	2	1:200
4	-	2,0	-	-	2	1:500
5	-	1,0	-	1,0	2	1:1000
6	-	0,5	-	1,5	2	1:2000
7	-	-	2,0	-	2	1:5000
8	-	-	1,0	1,0	2	1:10000
9	-	-	0,5	1,5	2	1:20000
10	-	-	0,2	1,8	2	1:50000

7) Preparación de la escala control

Esta escala se prepara por duplicado.

Se dispone una serie de 5 tubos de ensayo en la siguiente forma:

Tubo	Solución standard Nº 3 cc	Agua dest. cc	Medio basal cc	m de B ₁₂ por tubo
1	2	-	2	0,1
2	1	1,0	2	0,05
3	0,5	1,5	2	0,025
4	0,2	1,8	2	0,010
5	0	2,0	2	0

8) Esterilización:

Se mezcla el contenido de cada tubo por agitación. Se tapan los tubos con tapas de algodón recubiertos de gasa, y se esteriliza todo en autoclave durante 30 minutos a $3/4$ de atmósfera de presión manométrica.

9) Inoculación e incubación:

Se dejan enfriar los tubos por debajo de la temperatura de incubación y se inoculan asépticamente con 0,1 ml (2 gotas) del inóculo diluido dos veces como se indicó anteriormente.

Se incuban a 36-37 °C durante 36-48 horas.

Pasado ese tiempo puede realizarse la lectura de la turbidez provocada por el desarrollo bacteriano empleando un colorímetro fotoeléctrico; o bien puede valorarse la acidez láctica producida por el germen

por titulación con hidróxido de sodio 0,1 N.

Para realizar la lectura turbidimétrica:

- a) Se agita cada tubo por inversión para suspender los gérmenes, evitando la formación de burbujas de aire.
- b) Se mide la turbiedad en un fotocolorímetro, con un filtro en los 6.400 Å.
- c) Con los datos de la escala control se construye la curva control relacionando densidades turbidimétricas con m % de Vitamina B₁₂.
- d) Utilizando esta curva se calcula el contenido de Vitamina B₁₂ de cada tubo del ensayo, por interpolación en la curva control de los valores turbidimétricos obtenidos.

Para que un ensayo sea satisfactorio, por lo menos los valores de 2 o 3 tubos del ensayo deben caer dentro de la curva control. Teniendo en cuenta la dilución a que se sometió la muestra se calcula el contenido en Vitamina B₁₂ en la misma, y se saca el valor promedio de las 2 o 3 lecturas que caen en la curva control. Los valores no deben diferir entre sí en más de un 10 %.

Para realizar la valoración acidimétrica:

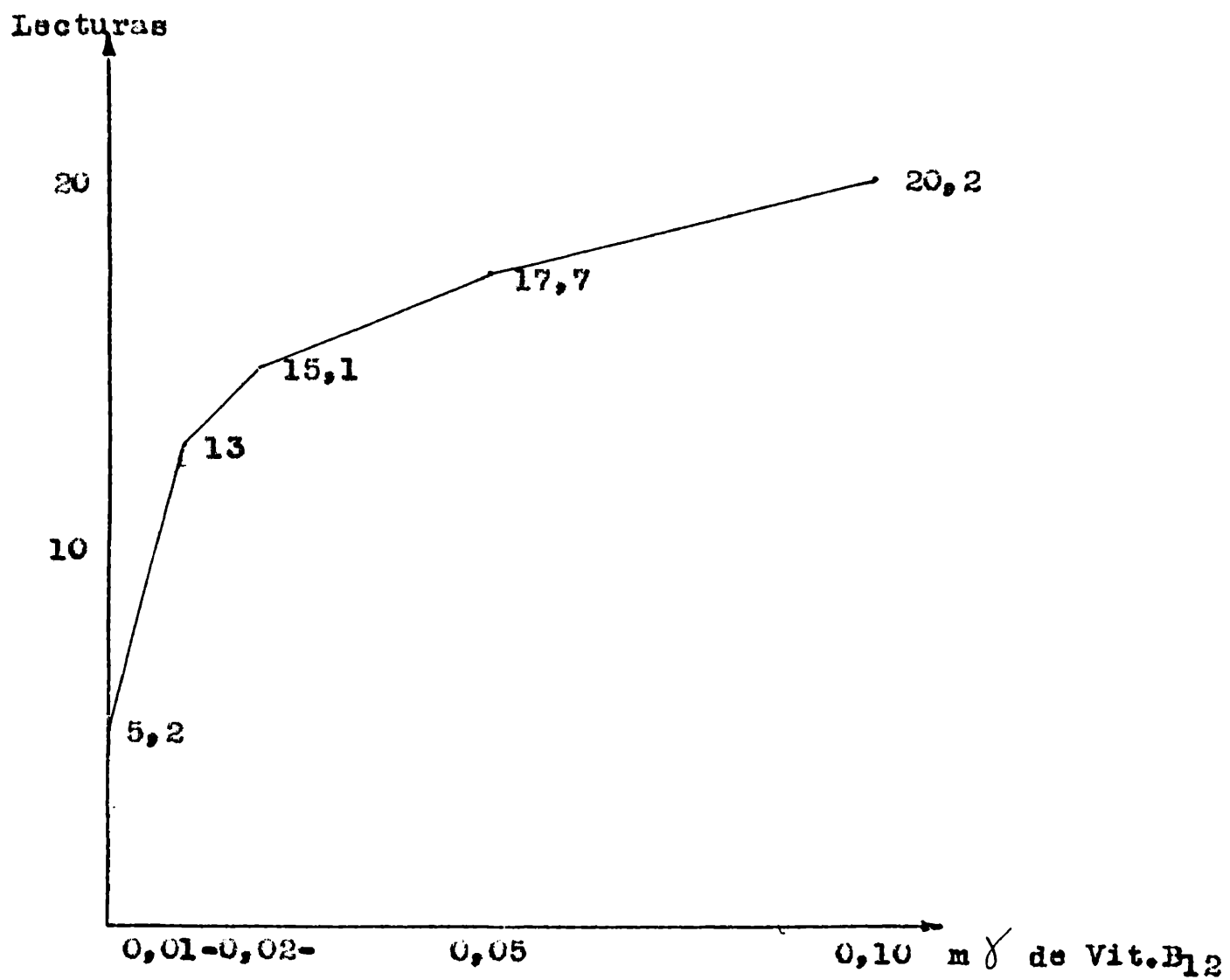
- a) En cada tubo de la escala control se valora la acidez láctica producida, por titulación con Na OH 0,1 N empleando azul de bromotimol como indicador.

b) Con los valores obtenidos se construye una curva control relacionando los ml de Na OH 0,1N con los m % de Vitamina B₁₂. El cálculo de resultados se realiza en igual forma que para la lectura turbidimétrica.

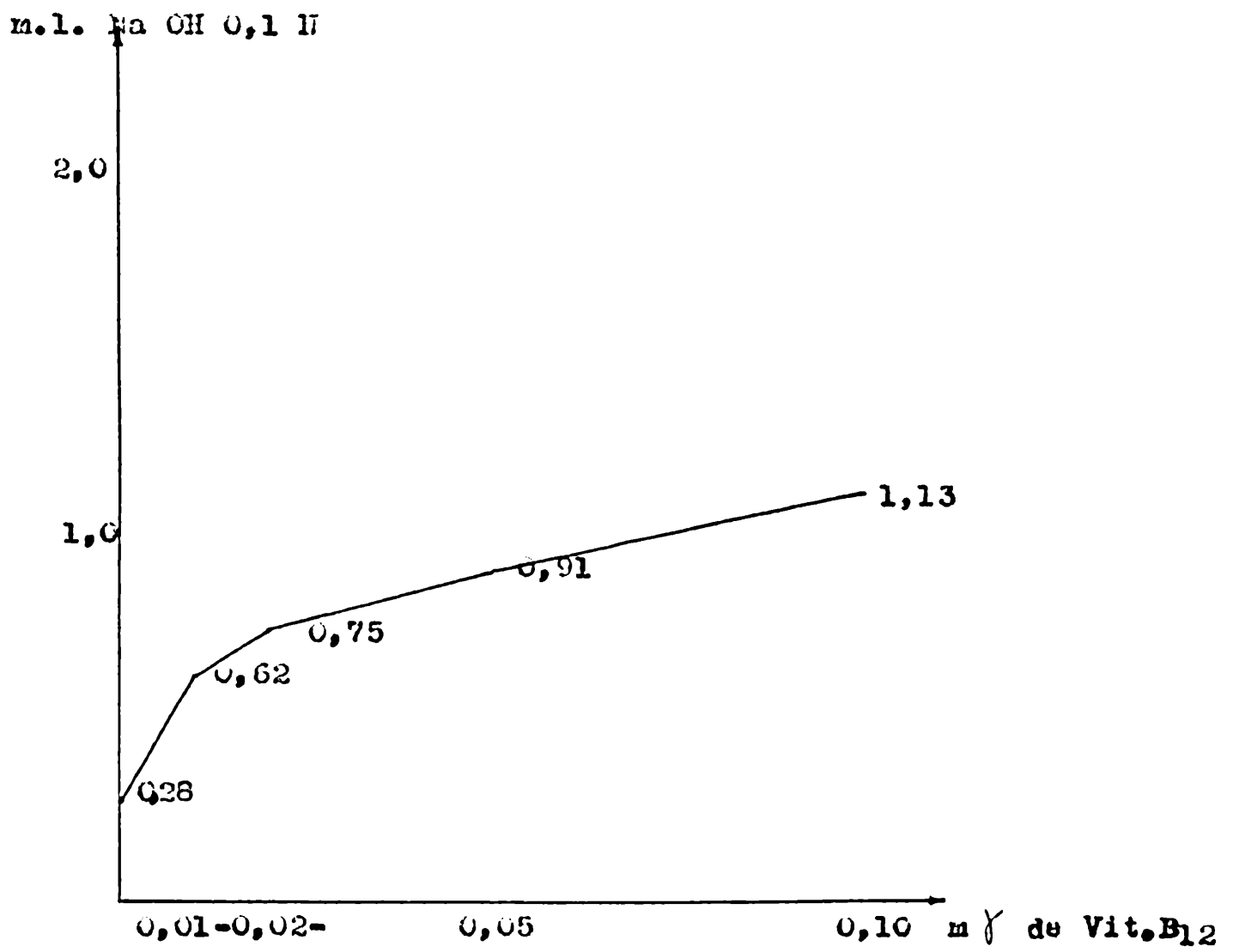
En el gráfico adjunto observamos las curvas control correspondientes a la lectura turbidimétrica y a la titulación acidimétrica.

Debemos hacer notar que en los gráficos de valoración de los distintos medios de fermentación expresamos el contenido de Vitamina B₁₂ en unidades, siendo una unidad = 0,1 m % de Vitamina B₁₂.

Curva de control correspondiente a la
lectura turbidimétrica



Curva de control correspondiente a la
Titulación Acidimétrica



TECNICA DE PREPARACION Y ANALISIS

TECNICAS DE PREPARACION Y ANALISIS CORRESPONDIENTES A LAS
SUBSTANCIAS EMPLEADAS COMO FUENTE DE NITROGENO, DE FACTORES MINERALES
Y ACCESORIOS.

Peptona de carne:

Se limpia un estómago porcino para quitarle la grasa y mucus y se lo pica finamente. Se lo suspende en tres veces su peso de agua. El pH de la suspensión se lleva a 2 mediante el agregado de ácido clorhídrico concentrado.

Se mantiene la suspensión en estufa a 45-50 °C durante 48 horas, y en el transcurso de las mismas se reajusta el pH cada 4-6 horas con ácido clorhídrico. En este intervalo se produce la autodigestión del estómago.

Pasadas las 48 horas se lleva a ebullición durante 30 minutos (para destruir la enzima) y luego se filtra.

El filtrado se concentra al vacío y el producto resultante se seca y pulveriza, obteniéndose la Peptona de carne.

Su aspecto es el de un polvo seco, suelto, fino, de olor característico, color marrón claro, dejando por reposo de la solución al 10% un regular precipitado de aspecto coposo.

El análisis practicado sobre esta peptona dió los resultados siguientes:

Cenizas :	16,90 %
Humedad :	2,60 %
Fracción soluble en agua:	93,00 %
Nitrógeno total :	11,76 %
Nitrógeno amínico	0,93 %
Reacción de precipitación con ácido tricloroacético:	negativa.
Reacción del biuret:	positiva.

Peptona de caseína:

Un kilogramo de caseína se suspende en 5 litros de agua, se agregan aproximadamente 50 ml de hidróxido de sodio al 40%, agitando constantemente hasta disolución parcial de la caseína. Se ajusta el pH de la suspensión a 8-8,5 con hidróxido de sodio al 10 %.

Aparte, se suspenden en agua 25 gramos de pancreatina (F. & W.) y se adicionan a la suspensión de caseína.

La digestión se realiza calentando en Baño María a 45 °C durante 24 horas.

Pasado este tiempo se hierve durante media hora para destruir la pancreatina, se coloca en la heladera para precipitar las materias grasas, se le agrega supercel, se agita y filtra por papel mojado.

El filtrado se concentra al vacío y se deseca por Spray, obteniéndose así la peptona de caseína.

Su aspecto es el un polvo de color amarillo claro, que deja por reposo de la solución al 10% un precipitado abundante, soluble en ácido clorhídrico.

El análisis practicado sobre esta peptona dió los resultados siguientes:

Cenizas	8,40	%
Humedad :	1,90	%
Fracción soluble en agua:	91,00	%
Nitrógeno total :	12,46	%
Nitrógeno amínico	1,48	%
Reacción de precipitación con ácido tricloroacético: Negativa.		
Reacción del biuret positiva.		

Peptona de gluten:

Se suspende gluten de trigo lavado en solución de ácido clorhídrico al 20%, se calienta en balón provisto de refrigerante a reflujo durante 12 horas.

Pasado ese tiempo se filtra en caliente, se ajusta el pH aproximadamente a 4,5 con solución de hidróxido de sodio al 40 %.

Se concentra al vacío y se deseca también al vacío.

La peptona de gluten así obtenida se presenta como un polvo amarillento, cuya solución acuosa al 10% deja por reposo una abundante floculación.

El análisis practicado sobre esta peptona dió los resultados siguientes:

Cenizas :	21,1	%
Humedad :	2,1	%
Fracción soluble en agua:	94,0	%
Nitrógeno total :	10,5	%
Nitrógeno amínico :	1,24	%

Reacción de precipitación con ácido tricloroacético: negativa.
 Reacción del biuret: positiva.

Los resultados de los análisis correspondientes a las distintas peptonas se refieren a 100 gramos de muestra.

"Corn steep":

Se denomina "corn steep" a un concentrado de solubles de maíz extraídos mediante un proceso de humectación realizado a un pH aproximado de 4 y a una temperatura de 45-52 °C, en presencia de anhídrido sulfuroso y una fermentación láctica activa.

Para obtenerlo se humedece el grano de maíz en tanques de madera abiertos. La proporción es de 20 a 30 litros de agua por cada 35 litros de grano.

La humectación dura 40 - 48 horas y se realiza a una temperatura de 45 - 52°C. Durante ese tiempo los materiales solubles se disuelven, el grano se ablanda y rompe, lo cual facilita la molienda y separación posterior de sus componentes.

Previamente a la entrada del agua a los tanques que contienen el maíz, se agrega 0,1 - 0,2% de anhídrido sulfuroso, para impedir la putrefacción y facilitar la extracción de los compuestos solubles.

Para asegurar la eficacia de la operación se realiza una extracción en contra-corriente.

Cuando se alcanza al agotamiento del grano se suspende la extracción y la solución obtenida se concentra hasta tener un contenido de sólidos del 50%. El producto así obtenido se denomina "corn steep".

El "corn steep" utilizado, proviene de las Refinerías Argentinas de Maíz, y fué cedido por los Laboratorios Squibb.

El análisis practicado sobre el mismo dió los resultados siguientes:

Residuo seco:	58,85g%
Cenizas:	11,67g%
Nitrógeno total:	4,92g%
Nitrógeno amínico:	0,23g%

Los resultados obtenidos se refieren a 100ml de muestra.

Licor de "corn steep" sin concentrar obtenido a partir de maíz sin germinar.

Para prepararlo se agrega a 1 kilogramo de maíz 10 veces su peso en agua. Se le adicionan 10g de sulfito de sodio para evitar la putrefacción. Se lo mantiene a una temperatura de 45 - 50°C durante 72 horas, removiendo el grano con frecuencia y sin reponer el agua perdida por evaporación.

Pasado este tiempo se filtra por algodón y el líquido obtenido (licor de "corn steep" sin concentrar), se coloca en recipientes de vidrio y se esteriliza en autoclave a 1 atmósfera de sobrepresión durante 30 minutos.

En esta forma se mantiene el producto obtenido sin riesgo de alteración.

El análisis practicado sobre 100ml del mismo dió los siguientes resultados:

Residuo seco:	1,64g%
Cenizas:	1,25g%
Nitrógeno total:	0,65g%
Nitrógeno amínico:	0,06g%

Licor de "corn steep" sin concentrar obtenido a partir de maíz germinado.

Para hacer germinar el maíz, se lo humedece bien y se lo coloca en un recipiente amplio con el objeto de que la superficie expuesta sea máxima. Se lo coloca en una estufa a 37°C de temperatura donde se lo mantiene hasta que germine, debiéndose realizar una remoción frecuente del grano para exponerlo al aire. Se mantiene constantemente un grado pronunciado de humedad. Con este maíz germinado se sigue la misma técnica que con el maíz sin germinar, anteriormente citada.

El análisis practicado sobre 100ml de este licor de "corn steep" sin concentrar, dió los siguientes resultados:

Residuo seco:	3,30g%
Cenizas:	0,52g%
Nitrógeno total:	0,96g%
Nitrógeno amínico:	0,15g%

En los análisis sumarios anteriormente citados, la valoración del Nitrógeno total se realizó por el Método de Kjeldhal. El Nitrógeno amínico se determinó por el método de Sörensen.

III _ R E S U M E N Y C O N C L U S I O N E S

RESUMEN

Hemos puesto a punto dos métodos de obtención de Vitamina B₁₂: uno por fermentación por cultivo en superficie y el otro por fermentación sumergida.

Empleando cinco cepas hemos estudiado la capacidad productora de Vitamina B₁₂ de cada una con el objeto de seleccionar las mejores. Las cepas ensayadas son:

Streptomyces olivaceus NRRL B-1125 (L.O. 194)

Streptomyces olivaceus NRRL B-1125 (L.O. 215)

Streptomyces griseus Krainsky. Cepa Actinomyces griseus Kr. U.C.T.C. 6961 (L.O. 124).

Bacillus brevis procedente de Tucumán N° 307 (L.O. 195).

Bacillus brevis ATCC 10.068 .Cepa J.C.Lewis. Western Regional Laboratory.

Ensayamos tres medios de germinación con el fin de formarnos una opinión sobre la eficacia de cada uno de ellos como elemento precursor de la fermentación.

Estos ensayos preliminares nos han permitido:

- a) Tener una idea previa de la capacidad de producción de las cepas.
- b) Determinar la cantidad de inóculo óptima para sembrar los medios de fermentación.
- c) Seleccionar el medio de germinación más conveniente.
- d) Valorar la Vitamina producida en el medio libre de micelio y en el medio total, con el fin de observar si el micelio retiene o no Vitamina B₁₂.
- e) Interpretar las curvas representativas del pH.

Resuelto esto, procedimos a realizar las fermentaciones propiamente dichas.

En los cultivos en superficie ensayamos distintos medios de fermentación, con el fin de seleccionar para cada cepa aquél que permitiera obtener los mayores rendimientos.

Simultáneamente pudimos comparar la capacidad productora de Vitamina B₁₂ de las cepas citadas y realizar una selección de las mismas, reduciendo su número en los ensayos subsiguientes a dos.

En el medio de fermentación elegido, y con las cepas más productoras de Vitamina B₁₂ ensayamos las siguientes variables:

- 1) Fuente de Carbono: Variación de la concentración de dextrosa agregada al medio de fermentación.
- 2) Fuente de Nitrógeno: Empleo de peptona de carne, peptona de gluten y ácido glutámico, como sustrato nitrogenado y su comparación con peptona de caseína desde el punto de vista de los rendimientos de Vitamina B₁₂.
- 3) Fuente de factores minerales y accesorios: Ensayo de un "corn steep" concentrado y dos "licores de corn steep", uno preparado con maíz germinado y otro sin germinar.

En las fermentaciones sumergidas ensayamos distintos medios de fermentación con el fin de seleccionar el más conveniente en base a los rendimientos obtenidos con cada cepa.

Con el fin de acostumbrar las cepas a las condiciones de vida imperantes en la fermentación sumergida, incubamos los inóculos en estufa provista de un agitador de vaivén.

Determinamos las condiciones de inoculación y el caudal de aire más conveniente.

En el medio de fermentación elegido variamos la fuente de nitrógeno para seleccionar aquella que permitiera obtener los mayores rendimientos. Las sustancias empleadas como fuente de nitrógeno son: peptona de carne, nitrato de amonio y urea.

Tratándose de fermentaciones por cultivo en superficie, o de fermentaciones sumergidas, en ambos casos realizamos tres fermentaciones simultáneas, de modo que las curvas de pH y de valoración de la Vitamina son valores promedios.

Cada 24 horas extrajimos muestras, en las que determinamos el pH colorimétricamente y la Vitamina producida según un método microbiológico de diluciones seriadas que emplea el *L. leichmannii* como organismo sensible.

Describimos los métodos de obtención de sustancias utilizadas como fuente de nitrógeno, y de factores minerales y accesorios y el análisis sumario practicado a las mismas.

En nuestras condiciones de trabajo, con *Bacillus brevis* hemos podido reproducir los resultados que informa la literatura; en

cambio, con el *Streptomyces olivaceus* no hemos alcanzado con nuestros medios de cultivo los resultados de otros autores.

Con *Streptomyces griseus*, los rendimientos fueron muy dispares y no pudimos arribar a ninguna conclusión satisfactoria.

CONCLUSIONES

En las condiciones de trabajo descritas por nosotros, al comparar la capacidad productora de las cinco cepas ensayadas, han mostrado mayores rendimientos: el *Streptomyces olivaceus* L.O.194 y el *Bacillus brevis* L.O. 195.

Del ensayo previo realizado con los tres medios de germinación extraemos las siguientes conclusiones:

La cantidad óptima de inóculo para sembrar los medios de fermentación es del 5% expresada en volumen de inóculo respecto a volumen de medio.

El medio de germinación más conveniente en base a la velocidad del desarrollo de los gérmenes, al espesor de la película formada por los mismos, y a la velocidad del desarrollo y títulos de Vitamina B₁₂ provocados en un medio de fermentación, es el Medio III, que denominamos caldo Vitamínico.

El micelio retiene Vitamina B₁₂ durante los 9 primeros días de iniciada la fermentación; pero pasado ese tiempo la libera en su casi totalidad, pasando la Vitamina al caldo de cultivo.

Las curvas representativas del pH acusan en general un descenso en los primeros días de fermentación, debido al aprovechamiento del glúcido por el organismo, y luego experimentan un ascenso paulatino al producirse la desaminación de los aminoácidos de los sustratos nitrógenados.

Fermentaciones propiamente dichas:

1) Fermentaciones por cultivo en superficie:

De los dos medios de cultivo ensayados que denominamos A y B, seleccionamos el A como más conveniente en base a los rendimientos obtenidos con cada cepa.

Fuente de carbono:

La concentración de glucosa ejerce un efecto marcado sobre el rendimiento de Vitamina B₁₂ obtenido empleando *Streptomyces olivaceus* L.O.194. Aquel es mayor para el 1% que para el 4% de glucosa.

La concentración de glucosa también ejerce un efecto sobre el rendimiento de Vitamina B₁₂ obtenido empleando *Bacillus brevis*. Con el caldo B observamos que un aumento en la concentración de glucosa determina un aumento en el rendimiento de Vitamina B₁₂ (mayor rendimiento para el 4% que para el 1%). En cambio con caldo A los resultados se

invierten (mayor rendimiento para el 1% que para el 4%).

Fuente de nitrógeno:

De los sustratos nitrogenados ensayados en nuestro trabajo, el que permite obtener mayores rendimientos, ya sea empleando *Streptomyces olivaceus* L.O. 194, o *Bacillus brevis* L.O. 195, es la peptona de caseína, siguiéndole en orden decreciente: la peptona de carne, peptona de gluten y ácido glutámico.

Fuente de factores minerales y accesorios:

Obtuvimos mayor producción de Vitamina B₁₂ al emplear como fuente de factores minerales y accesorios (y además, de nitrógeno) un "licor de corn steep" obtenido a partir de maíz germinado. Los resultados fueron inferiores cuando el "licor de corn steep" provenía de maíz sin germinar, e inferiores aún para un "corn steep" concentrado, pero en este último caso existían sustancias preservadoras en el "corn steep" y un largo almacenamiento previo.

Las características productoras de Vitamina B₁₂ del *Bacillus brevis* L.O. 195 son más estables que las del *Streptomyces olivaceus* L.O. 194 a las condiciones adversas del medio, pues en el caldo de fermentación adicionado con el último "corn steep" enumerado, el *S. olivaceus* no produjo prácticamente Vitamina B₁₂, en cambio, los títulos logrados con *B. brevis* alcanzaron las 1500 unidades de Vitamina B₁₂ por cm³.

El *Bacillus brevis* presenta una curva de producción cuya máxima se mantiene durante más días que la del *Streptomyces olivaceus*. La producción máxima de Vitamina B₁₂ obtenida por cultivo en superficie en nuestras condiciones de trabajo es similar para *S. olivaceus* L.O. 194 y *Bacillus brevis* L.O. 195. (3.500 unidades de Vitamina B₁₂ por cc).

2) Fermentaciones sumergidas:

De los dos medios de cultivo ensayados, que denominamos A y C, seleccionamos el A como más conveniente en base a los rendimientos obtenidos con *S. olivaceus* L.O. 194 y *Bacillus brevis* L.O. 195.

El caudal óptimo de aire para la fermentación es de 1 litro de aire por litro de medio y por minuto.

Fuente de nitrógeno:

De los sustratos nitrogenados que ensayamos, el que permite obtener los mayores rendimientos, empleando el *Streptomyces olivaceus* L.O. 194 o el

Bacillus brevis L.O. 195, es la peptona de caseína, siguiéndole en orden decreciente la peptona de carne y la urea, en un mismo nivel para ambos gérmenes, y luego el nitrato de amonio, con resultados bastante inferiores.

En las fermentaciones sumergidas, realizadas por nosotros los títulos de Vitamina B₁₂ obtenidos con *B. brevis* L.O. 195 (3.500 unidades de Vitamina B₁₂ por cc) son superiores a los logrados con *S. olivaceus* L.O. 194 (2.000 unidades de Vitamina B₁₂ por cc).

El *Bacillus brevis* L.O. 195 presenta una curva de producción de Vitamina B₁₂ cuyo valor máximo se mantiene durante más tiempo que el del *Streptomyces olivaceus* L.O. 194, en forma similar a lo observado en las fermentaciones por cultivo en superficie.

Jaime R. Ordóñez Ojeda

IV - BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1.- ANSLOW, W.K., BALL, S., EMERY, W.B., FANTES, K.H., LESTER SMITH, E., y WALKER, A.D., Chemistry and Industry, p 574 (1950).
- 2.- ARMITAGE, J.B., CANNON, J.R., JOHNSON, A.W., PARKER, L.J.F., LESTER SMITH, E., STAFFORD, W.H., y TODD, A.R., J. Chem. Soc., 3849 (1953)
- 3.- BETHELL, J.J., y LARDY, H.A., J. Nutrition, 37: 495 (1949).
- 4.- BICKOFF, E.M., LIVINGSTON, A.L., y SNELL, N.S., Archives of Biochemistry, 28: 243 (1950).
- 5.- BIRD, H.R., RUBIN, M., y GROSCHE, A.C., J. Biol. Chem., 174: 611 (1948).
- 6.- BLOM, R.H., PFEIFER, V.F., MOYER, A.D., TRAUFLER, H.F., CONWAY, D.H., CROCKER, C.K., FARISON, R.E., y HANNIBAL, D.V., Ind. and Eng. Chem., 44: 435 (1952).
- 7.- BONNETT, R., CANNON, J.R., JOHNSON, A.W., SUTHERLAND, I., TODD, A.R., LESTER SMITH, E., Nature, 176: 330 (1955).
- 8.- BORENSZTAJN, D., Med. Doświadczalna i Mikrobiol., 6: 25 (1954).
- 9.- BORENSZTAJN, D., y KURYLOWICZ, W., Med. Doświadczalna i Mikrobiol., 4: 483 (1952).
- 10.- BOSSHARDT, D.K., PAUL, W.J., O'DOHERTY, K., HUFF, J.W., y BARNES, R.H.J., J. Nutrition, 37: 21 (1949).
- 11.- BRINK, C., HODKIN, D.C., LINDSEY, J., PICKWORTH, J., ROBERTSON, J. H., y WHITE, J.G., Nature, 174: 1169 (1954).
- 12.- BRINK, N.G., WOLF, D.E., KACZKA, E., RICKES, E.L., KONIUSZY, F.R., WOOD, T.R., y FOLKERS, K., J. Am. Chem. Soc., 71: 1854 (1949).
- 13.- BROCKMAN, J.A., Jr., PIERCE, J.V., STOKSTAD, E.L.R., BROQUIST, H.P., y JUKES, T.H., J. Am. Chem. Soc., 72: 1042 (1950).
- 14.- BROWN, F.B., CAIN, J.C., GANT, D.E., PARKER, L.F.J., y LESTER SMITH E., The Biochemical Journal, 59: 82 (1955).
- 15.- BUCHANAN, J.G., JOHNSON, A.W., MILLS, J.A., y TODD, A.R., Chemistry and Industry, p 426 (1950).
- 16.- CANNON, J.R., JOHNSON, A.W., y TODD, A.R., Nature, 174: 1168 (1954).
- 17.- CASWELL, M.C., KODITSCHKEK, L.K., y HENDLIN, D., J. Biol. Chem., 180: 125 (1949).
- 18.- Chemical Abstracts, 48: 9017 h (1954).

- 19.- Chemical Engineering News, 31: 2563 (1953).
- 20.- COHEN, I.R., y BENNETT, R.E., Unpublished material, available in mimeographed form. Commercial Solvents Corp., Terre Haute, Indiana
- 21.- COMPTON, A.H., y ALLISON, S.K., X Rays in Theory and Experiment, (1948).
- 22.- COOLEY, G., ELLIS, B., PETROW, V., BEAVEN, G.H., HOLIDAY, E.R., y JOHNSON, E.A., J. Pharm. and Pharmacol., 3: 607 (1951).
- 23.- DIEHL, H., y MURIE, R., J. Sci., 26: 555 (1952).
- 24.- ELLIS, B., PETROW, V., y SNOOK, G.F., J. Pharm. Pharmacol, 1: 60 (1949).
- 25.- EMERSON, G.A., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 70: 392 (1949).
- 26.- EMERSON, G.A., WURTZ, E., y ZANETTI, M.E., Federation Proc. 8: 381 (1949).
- 27.- FANTES, K.H.; et coll., Communication to the Biochemical Society Meeting, 24 Mars 1950.
- 28.- FANTES, K.H., y CALLAGHAN, C.H., Biochem. Journ., 59: 79 (1955).
- 29.- FOLKERS, K., Science, 107: 396 (1948).
- 30.- FOLKERS, K., Chem. and Eng. News, 28: 1634 (1950).
- 31.- FOLKERS, K., y coll., Chem. and Eng. News, 28: 1376 (1950).
- 32.- FORD, J.E., HOLDSWORTH, E.S., y KON, S.K., The Biochemical Journal 59: 86 (1955).
- 33.- FOSTER, J.C., LALLY, J.A., y WOODRUFF, H.B., Science, 110: 507 (1949).
- 34.- FRICKE, H.H., LANIUS, B., DE ROSE, A.F., LAPIDUS, M., y FROST D. V., Federation Proc., 9: 173 (1950).
- 35.- FROST, D.V., FRICKE, H.H., y SPRUTH, H.C., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 72: 102 (1949).
- 36.- FEVOLD, H.R., DIMICK, K.P., y KLOSE, A.A., Arch. Biochem., 18: 27 (1948).
- 37.- GARIBALDI, J.A., IJICHI, K., SNELL, N.S., y LEWIS, J.C., Ind. and Eng. Chem., 45: 838 (1953).
- 38.- GREENE, R.D., BROOK, A.J., y Mc CORMAC, R.B., J. Biol. Chem., 178: 999 (1949).
- 39.- HALL, H.H., BENEDICT, R.G., WIESEN, C.F., SMITH, C.E. y JACKSON, R.W., Applied Microbiology, 1: 124 (1953).

- 40.- HALL, H.H., y TSUCHIYA, H.M., U.S. Patent, 2.561.364 (1951).
- 41.- HARTLEY, F., J. Pharm. Pharmacol., 1: 710 (1949).
- 42.- HARTLEY, F., STROSS, P., y STUCKEY, R.E., J. Pharm. Pharmacol., 2: 648 (1950).
- 43.- HENDLIN, D., y SOARS, M.H., J. Biol. Chem., 188: 603 (1951).
- 44.- HESTER, A.S., y WARD, G.E., Ind. and Eng. Chem., 46: 238 (1954).
- 45.- HODGE, H.M., HANSON, C.T. y ALLGEIER, R.J., Ind. and Eng. Chem., 44: 132 (1952).
- 46.- HODGKIN, D.C., PICKWORTH, J., ROBERTSON, J.H., TRUEBLOOD, K.W., PROSEN, R.J., WHITE, J.G., Nature, 176: 325 (1955).
- 47.- HOFFMANN, C.E., STOKSTAD, E.L.R., FRANKLIN, A.L., y JUKES, T.H., J. Biol. Chem., 176: 1465 (1948).
- 48.- HOFFMANN, C.E., STOKSTAD, E.L.R., HUTCHINGS, B.L., DORNBUSH, A.C. y JUKES, T.H., J. Biol. Chem., 181: 635 (1949).
- 49.- HUTNER, S.H., PROVASOLI, L., SCHATZ, A., y HASKINS, C.P., Proc. Am. Phil. Soc., 94: 152 (1950).
- 50.- HUTNER, S.H., PROVASOLI, L., STOKSTAD, E.L.R., HOFFMANN, C.E., BELT, M., FRANKLIN, A.L., y JUKES, T.H., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 70: 118 (1949).
- 51.- JACKSON, W.G., WHITFIELD, G.B., DE VRIES, W.H., NELSON, H.A., y EVANS, J.S., J. Am. Chem. Soc., 73: 337 (1951).
- 52.- JANICKI, J., PAWELKIEWICZ, J., STAWICKI, St., SZEBIOTKO, K. y ZODROW, K., Med. Doświadczalna i Mikrobiol., 5: 283 (1953).
- 53.- JASELKIS, B., y DIEHL, H., J. Am. Chem. Soc., 76: 4345 (1954).
- 54.- JOHNSON, A.W., y TOLD, A.R., Endeavour, Vol XV, No 57, (1956).
- 55.- JONES, K.L., J. Bacteriol., 57: 141 (1949).
- 56.- KACZKA, E.A., DENKELWATER, R.G., HOLLAND, A., FOLKERS, K., J. Chem. Soc., 73: 335 (1951).
- 57.- KACZKA, E.A., WOLF, D.E., y FOLKERS, K., J. Am. Chem. Soc., 71: 1514 (1949).
- 58.- KITAY, E., Mc NUTT, W.S., y SNELL, E.E., J. Biol. Chem., 177: 993 (1949).
- 59.- LANG, C.A., y CHOW, B.F., Federation Proc., 9: 193 (1950).
- 60.- LESTER SMITH, E., Brit. Med. J., 1: 151 (1951).
- 61.- LEVITON, A., y HARGROVE, R.E., Ind. and Eng. Chem., 44: 2651 (1952)
- 62.- LEWIS, U.J., REGISTER, U.D., THOMPSON, H.T., v ELVEHJEM, C.A

- Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., Utica, N.Y., 72: 479 (1949), s/
J.A.M.A., 143: 205 (1950).
- 63.- LUGONES, Z.M., y MUNDEL, O., Rev. Farm., Vol 94, Nº 11 y 12 (1952).
- 64.- Merck & Co., Cobione leaflet, (1949).
- 65.- Merck & Co., Inc. Service Bulletin, (1953-1954).
- 66.- MICHAELIS, L., Arch. Biochem., 17: 201 (1948).
- 67.- MOREAU, R.C., Annales Pharmaceutiques Françaises, 10: 224 (1952).
- 68.- MUNDEL, O., y LUGONES, Z.M., La Prensa Médica Argentina, 38: Nº 14 (1951).
- 69.- NICHOL, C.A., DIETRICH, L.S., CRAVENS, W.W., y ELVEHJEM, C.A.,
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 70: 40 (1949).
- 70.- PAGE, A., y CAMPBELL, E., J. of Biol. Chem., p 162 (1946).
- 71.- PEELER, H.T., YACOWITZ, H., y NORRIS, L.C., Proc. Soc. Exptl. Biol
Med., 72: 515 (1949).
- 72.- PETROW, V., y ELLIS, B., The Pharmaceutical Journal, Vol 175,
Nº 4791 (1955).
- 73.- PETTY, M.A., U.S. Patent, 2.515.135 (1950).
- 74.- REIFER, V.F., VOJNOVICH, C., y HEGER, E.N., Ind. and Eng. Chem.,
46: 843 (1954).
- 75.- PIERCE, J.V., PAGE, A.C., Jr., STOKSTAD, E.L.R., y JUKES, T.H.,
J. Am. Chem. Soc., 71: 2952 (1949).
- 76.- PROCTOR, B.E., y LANG, D.A., Nature, 168: 36 (1951).
- 77.- REGISTER, U.D., LEWIS, U.J., THOMPSON, H.T., y ELVEHJEM, C.A.,
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 70: 167 (1949).
- 78.- REGISTER, U.D., RUEGAMER, W.R., y ELVEHJEM, C.A., J. Biol. Chem.,
177: 129 (1949).
- 79.- RICKES, E.I., BRINK, N.G., KONIUSZY, F.R., WOOD, T.R., y FOLKERS
K., Science, 107 - 108 (1948).
- 80.- RUBIN, M., y BIRD, H.R., J. Biol. Chem., 163: 393 (1946).
- 81.- RUBIN, M., y BIRD, H.R., J. Nutrition, 34: 233 (1947).
- 82.- SHIVE, W., Unpublished data, available in mimeographed form,
Eli Lilly Co., Indianapolis, Indiana.
- 83.- SHORB, M.S., J. Biol. Chem., 169: 455 (1947).
- 84.- SHORB, M.S., y BRIGGS, G.M., J. Biol. Chem., 176: 1463 (1948).
- 85.- SKEGGS, H.R., HUFF, J.W., WRIGHT, I.D., y BOSSHARDT D.K.,
J. Biol. Chem., 176: 1459 (1948).

- 86.- SKEGGS, H.R., NEPPLE, H.M., VALENTIK, K.A., HUFF, J.W., y WRIGHT, L.D., Gordon Research Conferences on Vitamins and Metabolism, New London, New Hampshire, (1949).
- 87.- SKEGGS, H.R., NEPPLE, H.M., VALENTIK, K.A., HUFF, J.W., y WRIGHT, L.D., J. Biol. Chem., 184: 211 (1950).
- 88.- SMILEY, K.L., SOBOLOV, M., AUSTIN, F.L., RASMUSSEN, R.A., SM M.B., VAN LANEN, J.M., STONE, L., y BORUFF, C.S., Ind. and Eng. Chem., 43: 1380 (1951).
- 89.- SMITH, E.L., Nature, 161 - 163 (1948).
- 90.- SMITH, E.L., Proc. Roy. Soc. Med., 43: 535 (1950).
- 91.- SNELL, E.E., KITAY, E., y Mc NUTT, W.S., J. Biol. Chem., 175: 473 (1948).
- 92.- SNELL, E.E., Vitamin Methods, Vol I, Academic Press, New York; (1949).
- 93.- SPORN, E.M., RUEGAMER, W.R., y ELVEHJEM, C.A., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 65: 5 (1947).
- 94.- STORSTAD, E.L.R., JUKES, T.H., BROCKMAN, J.A., PIERCE, J.V., y BROQUIST, H.P., Federation Proc., 9: 122 (1950).
- 95.- TARR, H.L.A., Can. J. Technol., 29: 391 (1951).
- 96.- TARR, H.L.A., SOUTHCOTT, B.A., y NEY, P.W., Food Technol., 4: 354 (1950).
- 97.- THILMANN, K.V., y HARRIS, R.S., Vitamins and Hormones, Vol III (1955).
- 98.- THOMPSON, H.T., DIETRICH, L.S., y ELVEHJEM, G.H., J. Biol. Chem., 184:175 (1950).
- 99.- WEISSBERGER, Physical Methods of Organic Chemistry, (1951).
- 100.- WILLIAMS, T.I., Nature, 161: 19 (1948).
- 101.+ WINSTEN, W.A., y EIGEN, E., J. Biol. Chem., 177 - 181 (1949).
- 102.- WOODRUFF, H.B., y FOSTER, J.C., J. Biol. Chem., 183: 569 (1950)
- 103.- WOODS, R., Borden's Rev. Nutrition Res.; 9: 8 (1948).
- 104.- ZUCKER, T.F. y ZUCKER, L.M., Vitamins and Hormones, 8: 1 (1950)