

OBTENCION DE ACIDO LACTICO POR FERMENTACION CON *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*

MIGUEL FEOLI BONILLA*
CARLOS ESCOBAR GUARÍN
RODRIGO MARÍN MAHECHA

RESUMEN

El sustrato compuesto por sacarosa y suero de sangre de res, utilizado para la producción de ácido láctico, a través de *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*, ofrece al microorganismo los nutrientes necesarios para un buen crecimiento, bajo condiciones óptimas de pH (5,5 - 6,0) y temperatura de 48°C.

La velocidad máxima de crecimiento del microorganismo obtenido bajo estas condiciones es del orden del 0,068/h a un inóculo del 1,0% y disminuye hasta llegar a valores del orden del 0,024/h con inóculo 2,5%; lo contrario sucede con su crecimiento en masa celular o biomasa; esta aumenta a medida que se aumenta el porcentaje de inóculo, partiendo de rendimiento del 0,10% a inóculos del 1,0% hasta llegar a 0,65% con inóculo del 2,5%.

La mayor producción que brinda este medio es del orden del 81,25% para una concentración de sacarosa de 60g/l y un inóculo del 2,5%; mientras que su mayor productividad fue de 0,57 g/lh a una concentración de sacarosa de 100g/l y un inóculo de 2,5%.

SUMMARY

The substrate composed by sucrose and bovinum blood serum used for the production of lactic acid using *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* as inoculum has the nutrient required for a good growth in optimum conditions: pH (5.5 - 6.0) and temperature (48° C).

The maximum growth rate under these conditions was 0.068/h with 1.0% inoculum and decreases to 0.024/h with 2.5% inoculum. On the contrary the biomass increases with the inoculum starting from 0.10 for 1.0% inoculum up to 0.65 for 2.5% inoculum.

The highest yield using this medium was 81.25% with 60 g/l sucrose concentration and 2.5% inoculum and the maximum productivity was 0.57g/lh at 100 g/l sucrose concentration and 2.5% inoculum.

INTRODUCCION

Este trabajo se ocupa de la obtención de ácido láctico por medio de una fermentación homoláctica, utilizando como microorganismo fermentador *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*, que produce ácido láctico a partir de glucosa, sacarosa, almidón de papa, los cuales son reducidos a monosacáridos; utiliza como fuente de nitrógeno, proteínas de malta, a pH 5.5 y temperatura de 48 ° C. (1, 2).

Una modificación de este método se presenta en este trabajo, que consiste en adicionar como fuente de nitrógeno, proteínas provenientes del suero de sangre de res (residuos de matadero). Este sustrato enriquecido reporta mayor rendimiento y eficiencia en la producción de ácido láctico.(1, 2).

En el país se producen unas 200.000 toneladas anuales de sacarosa, de las cuales gran parte son consumidas y el resto se exporta (3), parte de este excedente podría ser usado para la obtención de ácido láctico, por medio de procesos biotecnológicos.

PARTE EXPERIMENTAL.

El diseño experimental se llevó a cabo en cuatro partes, la primera es la identificación, cuantificación y mantenimiento del microorganismo en cepa pura. la segunda parte consiste en

* Departamento de Farmacia. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. A.A. 14490. Santafé de Bogotá. Colombia.

la obtención y esterilización del suero de sangre de res, la tercera es la realización de la fermentación y la cuarta parte describe el método de cuantificación del ácido láctico, después de haber terminado la fermentación.

IDENTIFICACION ADAPTACION, CUANTIFICACION DEL *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*.

El medio de mantenimiento para la familia *Lactobacillaceae* y por ende del *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*, es el agar y el caldo MRS. (Man, Rogosa y Sharpe 1960). (1, 4).

Para mantener el cultivo puro y vivo se inocula aproximadamente 0.5 g de liofilizado en 50 ml de caldo MRS y se incuba a 48 ° C durante 24 horas; después se efectúan inoculaciones sucesivas cada tercer día, en un nuevo caldo MRS.

La adaptación del microorganismo al medio de fermentación se da en forma gradual, usando un medio de adaptación, ya que es el encargado de pasar el microorganismo del medio de mantenimiento a un nuevo medio de características diferentes.(5).

Sacarosa	1.0%
Suero de sangre de res	1.0%
Fosfato diácido de potasio	0.1%
Sulfato de amonio	0.1%
Sulfato de Magnesio Heptahidratado	0.05%
Tiamina	0.005%
Agua destilada c.s.p.	100.0

Se inocula este medio de adaptación con 10.0% (v/v) del microorganismo del medio de mantenimiento y se procede a incubar a 48 ° C durante 24 horas, realizando control de esterilidad al medio.(6).

Una vez adaptado el microorganismo se procede a cuantificarlo en el medio de transporte, mediante a) siembra en superficie y b) peso seco; (7). Con lo cual se podrá calcular la población microbiana por mililitro, sabiendo que se evaluarán concentraciones de inóculo de 1.0 a 2.5% (v/v).

REALIZACION DE LA FERMENTACION.

Para la cual es necesario tener en cuenta dos factores:

- Concentración del inóculo, de 1,0% a 2,5% (v/v).
- Concentración de las fuentes de carbono y de nitrógeno en el medio fermentable.

Del segundo factor, se toma como fuente de carbono la sacarosa no refinada (cruda) en concentraciones que van de

6% al 12% (p/v). Ya que la sacarosa no debe ser menor del 5% porque es improductivo e insuficiente para el crecimiento del microorganismo y no más del 18% porque causa inhibición del crecimiento, debido al aumento de la presión osmótica. La fuente de nitrógeno debe permanecer constante y no menor del 20% en (p/v), para llevar una fermentación eficiente (5). Al sustrato se le adiciona tiamina en una proporción de 0.005%, pues es un requerimiento vital para su crecimiento.

Composición general del medio de fermentación:

Fuente de carbono	Sacarosa de 6% a 12% (p/v)
Fuente de nitrógeno	Suero de sangre de res 20%
Sustancias reguladoras de pH.	Carbonato de calcio.
Tiamina	Tiamina 0.005%
Agua destilada c.s.p.	1 litro.

Estos sustratos son inoculados con el microorganismo, en cabina de flujo laminar. Se incuban durante 120 horas a 48 ° C. (1, 2, 6).

Método de análisis de la cinética de fermentación.

Para la valoración de la cinética de crecimiento del *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* en la fermentación se realiza determinación de azúcar, biomasa y producción de ácido láctico.

Los métodos utilizados en el desarrollo del trabajo guardan la máxima confiabilidad, exactitud y precisión. Los cuales permiten conocer la cinética de fermentación en forma exacta y rápida.

La toma de la muestra se realiza cada 12 horas, debido a que la fermentación es lenta y no sería cuantitativo tomar muestras en tiempos mas cortos. (8).

La determinación de azúcares se realiza por el método de o-toluidina, el cual se basa en la formación de un complejo base de Schiff entre el aldehído y la o-toluidina. La coloración es medida espectrofotométricamente a 635 nm (9, 10).

La determinación de biomasa por peso seco se realiza tomando un medio de cultivo en donde se ha sembrado el microorganismo, este medio de volumen conocido se filtra mediante una membrana de 0.22 micras de diámetro de poro, la cual es calcinada hasta peso constante, con este dato se realiza una curva de calibración para las determinaciones posteriores de biomasa por densidad óptica.(8, 11, 12, 13).

La determinación de ácido láctico utiliza el método de valoración con NaOH por potenciometría diferencial. (14).

RESULTADOS Y DISCUSION.

De acuerdo a la metodología establecida para este estudio, se divide la presentación de los resultados en tres partes.

IDENTIFICACION, ADAPTACION Y CUANTIFICACION

Identificación del microorganismo.

Al realizar observaciones microscópicas con tinción de Gram del *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* en medio líquido y sólido de la cepa pura y del inóculo a utilizar en las fermentaciones se comprobó la identidad del bacilo por las características microscópicas que presenta: Bacilo no esporulado, largo simple y en cadenas Gram positivo y por las características macroscópicas observadas en cuanto a: tamaño 1-3 mm, forma circular, aspecto untuoso, color blanco crema, borde dentado, elevación plana, características comunes en inóculo sembrado en medio sólido como en la cepa pura concidiendo con las características reportadas en la literatura.(3, 15).

Adaptación del microorganismo.

La adaptación del *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* se realiza como se describió anteriormente, obteniendo los siguientes resultados.

TABLA 1. INOCULO DE 10% T = 48°C pH 5,5 - 6,0

TIEMPO	CRECIMIENTO
18 Horas	++
24 Horas	+++
35 Horas	+++

Se observa que en el medio de adaptación presenta un buen crecimiento el microorganismo a las 24 horas bajo las condiciones establecidas de pH y temperatura. Tabla No. 1

Cuantificación del microorganismo.

Después de haber adaptado el microorganismo al nuevo medio de crecimiento se procede a cuantificarlo.(7). Obteniendo los siguientes resultados.

TABLA 2. CUANTIFICACION DEL MICROORGANISMO

DILUCION	U.F.C.	
	Vertido	Superficie
10 ⁻⁵	>300	>300
10 ⁻⁷	>300	>300
10 ⁻⁹	287	>300
10 ⁻¹¹	150	269
10 ⁻¹³	<30	176
10 ⁻¹⁵	<30	<30

Como se ve en la tabla No. 2 la mejor dilución corresponde a 10⁻¹¹ en donde la población cuantificable está entre 30 y 300 u.f.c., que es lo recomendado. En esta dilución se determinó el peso seco y se realizaron diluciones para construir la curva patrón.

VALORACION DE LOS CONSTITUYENTES DEL SUSTRATO Y DE LA CINETICA DE FERMENTACION.

Nutrientes del sustrato.

En la tabla No. 3, se relacionan las cantidades de sacarosa, tiamina y proteína en relación al porcentaje de inóculo adicionado en cada una de las 16 fermentaciones.

TABLA 3. COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS Y FERMENTACIONES A REALIZAR

NUMERO DE FERMENTACION	CONCENTRACION DE SACAROSA	PORCENTAJE DE INOCULO	PORCENTAJE DE TIAMINA	PORCENTAJE DE PROTEINA
1	60	1.0	0.005	20
2	80	1.0	0.005	20
3	100	1.0	0.005	20
4	120	1.0	0.005	20
5	60	1.5	0.005	20
6	80	1.5	0.005	20
7	100	1.5	0.005	20
8	120	1.5	0.005	20
9	60	2.0	0.005	20
10	80	2.0	0.005	20
11	100	2.0	0.005	20
12	120	2.0	0.005	20
13	60	2.5	0.005	20
14	80	2.5	0.005	20
15	100	2.5	0.005	20
16	120	2.5	0.005	20

Se partió de sustancias de un porcentaje de pureza determinado, no de reactivos puros. En el caso de la sacarosa se utilizó un mismo lote para surtir todos los balones de fermentación, mientras que el suero de sangre de res, se tomo de varias veces, se reunió en un solo lote y se analizó la cantidad de proteína total. Los resultados de estas valoraciones se muestran en la tabla No.4.

TABLA 4. VALORACION DE LOS CONSTITUYENTES DEL SUSTRATO.

CONSTITUYENTE	% (P/P)	CONCENTRACION
Sacarosa cruda del Ingenio del Cauca S.A.	98.2%	*6.5/100ml
Suero de Sangre de res	99.9%	
Carbonato de Calcio R.A		5.000 U.I.
Tiamina.		

*6.5 gramos de proteína (Nitrógeno) por 100 ml de suero.

Evaluación de los parámetros cinéticos de las fermentaciones.

Estos parámetros se analizan en dos partes:

- curvas cinéticas de biomasa, producto y sustrato residual.
- productividad y eficiencia de cada una de ellas.

Análisis de las curvas cinéticas de fermentación.

Curva cinética del crecimiento bacteriano.

De acuerdo con los datos obtenidos en biomasa y de la curva correspondiente en cada una de las 16 fermentaciones, el crecimiento del *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*, tiene un comportamiento de crecimiento exponencial durante las primeras 75 horas de fermentación, en la mayoría de las ellas después sufre un descenso en el crecimiento, permaneciendo constante por un tiempo, para luego volver a subir. Esto nos muestra un típico comportamiento de crecimiento bacteriano.

Como todas las fermentaciones presentan este tipo de comportamiento, es necesario buscar nuevos parámetros de comparación entre ellas. Uno de estos es la velocidad máxima de crecimiento del microorganismo en el medio de fermentación y de acuerdo a los resultados obtenidos de biomasa, se determina la velocidad máxima de crecimiento del *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* (μ_{max}) para cada una de las fermentaciones, en la fase exponencial, por medio de la expresión matemática que representa la velocidad de crecimiento bacteriano.(14).

La velocidad de crecimiento en las fermentaciones oscila entre 0.024 a 0.064 h⁻¹ en las diferentes concentraciones de inóculo y de sacarosa, esta velocidad es baja, lo que confirma que la fermentación es lenta, aproximadamente siete días dependiendo del porcentaje de inóculo, y la concentración de sacarosa. La velocidad máxima de crecimiento, no varía significativamente sobre todo en los inóculos 1.5% y 2.0% que son los de concentración intermedias. Esto se debe a que los parámetros externos a que están sometidos, como son: presión osmótica de los diferentes medios, cantidad de células son similares y afectan la velocidad máxima de crecimiento de igual forma.

Curva cinética de formación de ácido láctico.

Para evaluar la cinética de formación de ácido láctico, hacemos uso del modelo matemático de Luedeking y Piret (16), que relaciona en forma lineal, la concentración de biomasa y la producción de ácido láctico.

Para la determinación de las constantes del modelo cinético de Luedeking y Piret, se parte de la ecuación de la recta que presenta en la correlación lineal P(t) Vs X(t) y su expresión matemática es:

$$P(t) = A + B \cdot X(t).$$

En la tabla No. 5. se reportan las constantes del modelo cinético para cada una de las fermentaciones.

Al analizar por separado el efecto de la concentración del microorganismo sobre las constantes, se aprecia que b es mayor a concentraciones de inóculo del 1.5% y 2.0% y menor, a concentraciones de inóculo de 1.0% y 2.5%. a partir de la ecuación:

$$b = (P(t) - P_e) / (X_f \cdot (t - t_0)).$$

Para que b tenga valores altos, X_f debe ser bajo, esto ocurre cuando se trabaja a concentraciones de microorganismo entre 1.0% y 2.0%, lo cual indica, que permanece constante la concentración celular, a un rendimiento bajo. Como se ve en la tabla No. 5.

A partir de la ecuación $B = (a_m + b)/m$ se observa que para obtener valores altos de las constantes b (Constante asociada al mantenimiento celular) y m (Velocidad máxima de crecimiento) deben ser pequeñas lo cual se logra a concentraciones de inóculo del orden de 2.5%, por lo que el inóculo recomendado es el de 2.5%, aunque b indique lo contrario, ya que el efecto de a es mucho mayor que el de b para la concentración de inóculo estudiado. Existe una relación directa entre a y b, lo

que corrobora la función de a en el modelo cinético de producción.

Cinética de consumo de sustrato.

Para realizar el estudio de la cinética del sustrato es necesario tener en cuenta el balance de materia de sustrato.

Al observar las curvas de consumo de sustrato, se aprecia que los puntos experimentales se ajustan al modelo propuesto, lo que indica que el *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*, consume sacarosa para el mantenimiento celular, crecimiento y producción de ácido láctico, de una manera creciente y lineal.

EVALUACION DE LA PRODUCTIVIDAD Y PRODUCCION.

La productividad y la producción son analizadas al cabo de 120 horas de fermentación.

Se nota que a medida que aumenta el porcentaje de inóculo de *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* y se disminuye la concentración de sacarosa, aumenta la producción de la fermentación y viceversa, si disminuye la concentración del

inóculo y aumenta la concentración de sacarosa, disminuye la producción. Esto se debe a que si aumenta la presión osmótica del sustrato, se produce un efecto inhibitorio en el crecimiento del microorganismo; pero si aumenta el inóculo y disminuye la concentración de sacarosa en el sustrato, por ende la presión osmótica del medio, la producción aumenta hasta un 81.2%.(17).

En cuanto a la productividad (Q_p) se observa en forma general, que esta aumenta a medida que se eleva la concentración de inóculo y de sacarosa en el medio de fermentación, Figura No.1. En el porcentaje de inóculo del 1.0% y 60 g/l de sacarosa, la productividad es del orden de $0.21 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$, mientras que para la misma concentración de inóculo, pero 120 g/l de sacarosa la productividad es de $0.27 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$. La productividad va aumentando a medida que aumenta el porcentaje de inóculo y la concentración de sacarosa. La productividad también aumenta a medida que aumenta la masa celular, aumentando así la cantidad de enzimas metabólicas que procesan la sacarosa del medio. Lo que se demuestra con la productividad observada en la fermentación No. 15, donde a un porcentaje de inóculo de 2.5% y una concentración de sacarosa de 100 g/l, se obtiene una productividad del $0.57 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para un cultivo por lotes.

TABLA 5. RESULTADOS DE LA CORRELACION LINEAL P(T) Vs. X(F), COEFICIENTES DEL MODELO CINETICO DE LUEDEKING Y PIRET, BIOMASA FINAL, VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO Y CONCENTRACION DE ACIDO LACTICO

POCENTAJE DE INOCULO	S_0 g/l	A	B	R	TERMINO α	TERMINO β	X_f (mg/m)	(μ)	(P)
1.0	60	0.002	3.780	0.933	-29.419	2.058	0.103	0.062	25.28
	80	-0.100	18.294	0.877	-35.848	2.399	0.190	0.046	33.20
	100	-0.927	40.118	0.943	0.220	1.995	0.230	0.050	40.05
	120	-1.477	34.682	0.982	4.294	2.066	0.230	0.068	46.32
1.5	60	-0.378	7.563	0.964	-49.235	1.931	0.210	0.034	31.37
	80	-0.738	15.302	0.900	-62.729	3.745	0.150	0.048	40.84
	100	-0.370	9.834	0.903	-104.489	5.601	0.150	0.049	48.30
	120	-0.895	15.416	0.937	-44.780	3.010	0.200	0.050	52.56
2.0	60	2.279	0.735	0.802	-85.040	2.144	0.235	0.025	38.16
	80	-1.095	11.033	0.999	-34.729	2.197	0.250	0.048	41.66
	100	-11.417	107.260	0.970	49.868	2.181	0.264	0.038	50.27
	120	-13.068	104.948	0.904	55.064	2.345	0.249	0.047	53.04
2.5	60	-0.018	11.358	0.908	-37.050	1.936	0.382	0.040	48.73
	80	-1.243	21.915	0.967	-32.125	1.297	0.269	0.024	60.87
	100	-0.302	16.797	0.865	-35.405	1.931	0.495	0.037	68.31
	120	-3.162	45.110	0.914	-52.467	2.928	0.190	0.030	59.81

S_0 = CONCENTRACION INICIAL DE SUSTRATO.

A = TERMINO INDEPENDIENTE DE LA ECUACION LINEAL.

B = PENDIENTE DE LA ECUACION LINEAL.

R = CORRELACION.

α = CONSTANTE DE PRODUCCION DE ACIDO LACTICO ASOCIADA AL CRECIMIENTO BACTERIANO.

β = CONSTANTE DE PRODUCCION DE ACIDO LACTICO ASOCIADA AL MANTENIMIENTO BACTERIANO.

μ = VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO.

P = CONCENTRACION DE ACIDO LACTICO.

FERMENTACION 15

SACAROSA, BIOMASA, NITROGENO A. LACTICO

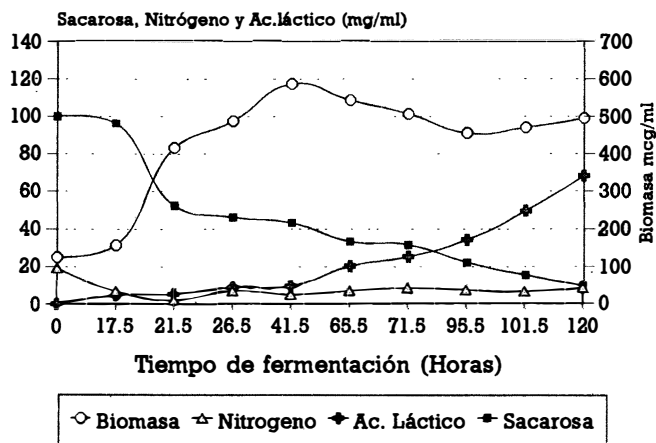


Figura 1.

EVALUACION DE LOS PARAMETROS CINETICOS A CONCENTRACIONES ALTAS.

Para comprobar, si el *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* se comporta de igual forma a concentraciones extremas de sacarosa, ya sean bajas o altas, a las recomendadas por Sharpe E. (1). y a porcentajes elevados de inóculo, se realizan tres fermentaciones adicionales, la combinación de estos dos factores aparecen en la tabla No. 6.

TABLA 6. EVALUACION DE LOS PARAMETROS CINETICOS A CONCENTRACIONES ALTAS DE SACAROSA

FERMENTACION	INOCULO	So g/l	Xo g/l	t-to (horas)	Yx/s %
17	1.0%	160	0.100	41.5	0.22
18	10.0%	160	1.00	41.5	0.27
19	10.0%	60	1.00	41.5	1.97

So Concentración de sacarosa.

Para estas tres últimas fermentaciones, se mantiene constante la concentración de proteína 20 g/l, el pH y la temperatura, como en las fermentaciones precedentes.

En la figura No. 2 se observa, que la velocidad de crecimiento y el rendimiento en masa celular, aumenta con respecto a las anteriores fermentaciones.

Al aumentar el porcentaje de inóculo mejora el rendimiento de sustrato en biomasa y al disminuir el efecto inhibitorio por concentración de sustrato el resultado es mayor. Tabla No. 6.

FERMENTACION 19

SACAROSA, BIOMASA, NITROGENO, A. LACTICO

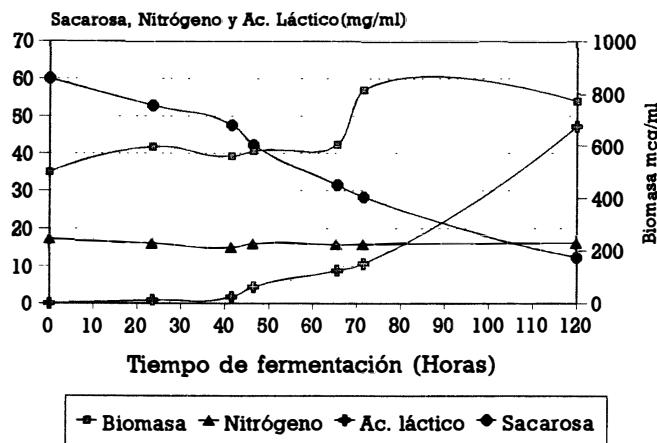


Figura 2.

Por otra parte, si se analiza la productividad y rendimiento de estas tres fermentaciones Figura No. 3, se ve un incremento en los valores, a medida que aumenta el porcentaje de inóculo de microorganismo, con respecto a las anteriores fermentaciones, indicando la relación directa de producción de biomasa y la producción de ácido láctico. Tabla No. 7.

TABLA 7. PRODUCTIVIDAD Y RENDIMIENTO A CONCENTRACIONES EXTREMAS DE INOCULO

INOCULO	PRODUCTIVIDAD $g \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$	RENDIMIENTO %
1.0%	0.678	39.01
10.0%	1.150	62.20
10.0%	0.514	78.82

Estas tres fermentaciones confirman el comportamiento que tiene el *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*, en diferentes concentraciones de sacarosa y porcentajes de inóculo; guardando una relación lineal entre estas dos variables, como las anteriores fermentaciones.

CONCLUSIONES

-El microorganismo *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* se adaptó al nuevo sustrato de una forma rápida y eficiente, obteniendo crecimiento abundante al cabo de 24 horas de crecimiento bajo las condiciones de temperatura y pH establecidas.

-El suero de sangre de res, es una buena fuente de proteínas para el crecimiento del *Lactobacillus delbrueckii*

PRODUCTIVIDAD

Productividad Qp (g/l h)

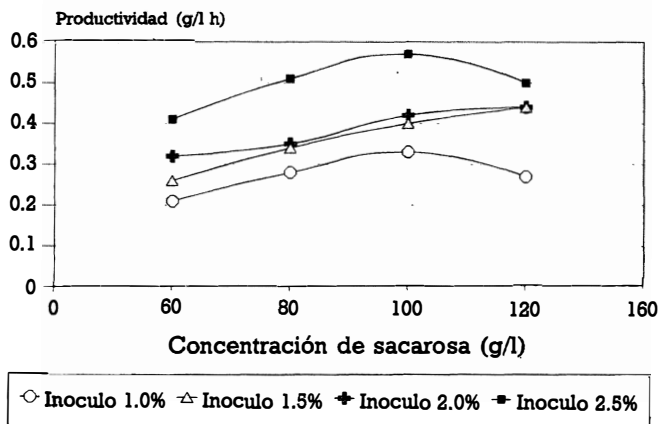


Figura 3.

bulgaricus, dando buenos rendimientos y productividad, a una temperatura de 48 ° C y un pH entre 5.0-5.5.

-Las fermentaciones son del tipo I, según Gaden, donde la formación del producto (ácido láctico), esta directamente relacionada con la utilización de la sacarosa del sustrato.

-A mayores concentraciones de sacarosa y porcentaje de inóculo, es menor la velocidad de crecimiento del microorganismo pero el rendimiento celular del *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*, es mayor.

-La cinética de fermentación de las diferentes lotes cumplen con el modelo cinético propuesto por Luedeking y Piret, para la fase exponencial.

-La mayor producción se logra a una concentración de sacarosa de 60 g/l y un inóculo del 2.5%, mientras que la mayor productividad se obtiene a una concentración de sacarosa de 100 g/l y un inóculo de 2.5%.

BIBLIOGRAFIA.

1. SHARPE E. "The genus *Lactobacillus*". Bergey's manual. ed. Cheif John. Williams & Wilkins. baltimore. 1980. p: 1653-1667.
2. PELZCAR M. "Microbiología". 4 ta. edición. Mc.Graw-Hill. México. 1982. p:235. 435-436.
3. INSTITUTO DE COMERCIO EXTERIOR (INCOMEX). "Exportaciones e importaciones". Años 1992-1993.
4. AMERICAN TYPE CULTURE COLECTION. "Biological and bacterial cell". ed. ATCC. 1976. p:365-367.
5. VIENEGRA G. "Lactic acid Fermentations". Basic principles and application. México. 11 (1984). p:1-24.
6. BREED R, MURRAY E. "Bergey's manual of determinative Bacteriology". 7a. Ed. Williams & Wilkins. Baltimore. 1957. p: 505-545.
7. PEREZ T. SALAS A. "Determinación in vitro de la actividad de la sulfadiazina de zinc frente a cépas aisladas de zonas de tratamientos de quemados". Universidad Nacional de Colombia. Tesis 1986. p:28-33.
8. HANSON F. P. *Biotechnol and Bioeng* **14**, 233, (1972).
9. PLUMMER D. "Introducción a la bioquímica práctica". 3ra. edición. Editorial. McGraw-Hill. Latinoamerican. Bogotá. 1981. p:245-248.
10. FRIEDMAN T. GRAESER R. *J. Biol. Chem.* **100**, 291, (1993).
11. AKSU Z, KUTSAL T. *Biotechnol Lett.* **8**, 157, (1986).
12. VICK R. et al. *Biotechnol Lett.* **5**, 665, (1982).
13. LUEDEKING R. *Biochem and Microbiol. Technol and Eng.* **1**, 393, (1959).
14. MONTOYA D. C. "Las fermentaciones como soporte de los procesos biotecnológicos" Universidad Nacional de Colombia. Instituto de Biotecnología. Bogotá D.E. 1989. p:30-120.
15. FRIEDMAN N. GADEN E. *Biotechnol and Bioeng.* **12**, 961, (1970).
16. SUMMER J. et al. *J. Biol. Chem.* **158**, 44, (1944).
17. MAJOR B. A. *Biotechnol Lett.* **7**, 401, (1985).