

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

63072
5
2y

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS
PROFESIONAL Y DE POSGRADO DEL
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES.

ESTUDIOS PARA LA PRODUCCION DE ACIDO GLUTAMICO
POR FERMENTACION DE UN MEDIO NO CONVENCIONAL.

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA
PRESENTA
OSCAR RUBEN GARCIA CORREA

TESIS CON
FALLA LE ORIGEN

1991



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

RESUMEN	1
I. INTRODUCCION Y ANTECEDENTES	2
1.1. Problemática de la eliminación de desechos de la industrialización del limón mexicano.	2
1.2. Aspectos comerciales de la fermentación del ácido glutámico.	7
II. LA FERMENTACION DEL ACIDO GLUTAMICO.	11
2.1. Cepas microbianas productoras de ácido glutámico.	12
2.2. Condiciones de cultivo.	14
2.2.1. Fuentes de carbono.	14
2.2.2. Fuentes de nitrógeno y control de pH.	14
2.2.3. Factores de crecimiento.	15
2.2.4. Suplemento de oxígeno.	15
2.3. Acumulación de otros productos en relación al cambio de las condiciones de cultivo.	17
2.3.1. Acidos láctico y succínico.	17
2.3.2. Acido α -cetoglutárico.	17
2.3.3. L-glutamina.	17
2.4. Fisiología microbiana de la fermentación de ácido glutámico.	18
2.4.1. Permeabilidad de la membrana celular al ácido L-glutámico en relación a la concentración de biotina.	18
2.4.2. Mecanismos de regulación en la biosíntesis del ácido L-glutámico.	21
2.4.3. Mejoramiento genético de microorganismos productores de ácido L-glutámico.	22
2.5. Fermentaciones a gran escala de ácido glutámico.	25
III. OBJETIVOS.	27
IV. MATERIALES Y METODOS.	28
4.1. Determinaciones analíticas.	28
4.1.1. Acido L-glutámico.	28
4.1.2. Reductores libres.	31
4.1.3. Crecimiento celular.	31
4.1.4. Acidos cítrico y láctico.	31
4.1.5. Amonio libre.	32
4.2. Propagación y conservación del microorganismo.	33
4.3. Preparación del inóculo para la fase de adaptación.	33
4.4. Desarrollo de la fase de adaptación.	33

4.5.	Inoculación del medio de fermentación en etapa de producción.	34
4.6.	Muestréos y control de pH.	34
4.6.1.	En matraz.	34
4.6.2.	En fermentador.	34
4.7.	Preparación de medios de fermentación.	36
4.8.	Hidrólisis de melazas.	36
4.9.	Métodos de la parte experimental I.	38
4.9.1.	Experimentos con jugo cocido de limón + glucosa.	38
4.9.2.	Evaluación de melazas.	38
4.10.	Métodos de la parte experimental II.	41
4.10.1	Composición de medios.	41
4.11.	Métodos de la parte experimental III.	43
4.11.1.	Objetivos y composición de medios de cada fermentación.	43
4.12.	Velocidad específica de crecimiento como herramienta.	47
V.	RESULTADOS Y DISCUSION.	49
5.1.	Parte experimental I.	49
5.1.1	Experimentos con melácidas + glucosa.	49
5.1.2	Experimentos con melazas de caña.	55
5.1.3	Conclusiones de la parte experimental I.	66
5.2.	Parte experimental II.	66
5.2.1.	Antecedentes y objetivos particulares.	66
5.2.2.	Análisis de resultados de la parte experimental II.	83
5.2.3.	Discusión.	85
5.2.4.	Conclusiones de la parte experimental II.	86
5.3.	Parte experimental III.	88
5.3.1.	Antecedentes y objetivos particulares	88
5.3.2.	Análisis de resultados de la parte experimental III.	102
5.3.3.	Conclusiones de la parte experimental III	103
5.5.	Corroboración de la evolución de la fermentación	105
VI.	CONCLUSIONES.	108
	REFERENCIAS.	114

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Diagrama de bloques de la industrialización del limón mexicano.	5
Figura 2.	Ruta biosintética del glutamato.	8
Figura 3.	Fisiología microbiana de la producción del ácido L-glutámico.	20
Figura 4.	Rutas biosintéticas del glutámico y alternativa de mejoramiento genético.	23
Figura 5.	Ejemplo de un proceso de fermentación controlado automáticamente.	26
Figura 6.	Gráfica de validación del método enzimático para la determinación del ácido L-glutámico.	30
Figura 7.	Equipo de fermentación utilizado en la etapa experimental III.	35
Figura 8.	Diagrama general de la metodología experimental.	37
Figura 9.	Gráfica de ajuste por análisis de regresión logarítmica para el crecimiento celular en el medio de fermentación estudiado.	48
Figura 10.	Gráfica de promedios de las fermentaciones con melácidas + glucosa.	50
Figura 11.	Velocidades específicas de crecimiento en las fermentaciones con melácidas + glucosa.	53
Figura 12.	Fermentación F-4: JCL + Melazas de caña, sin sales.	56
Figura 13.	Fermentación F-5: Melazas como única fuente de carbono.	57
Figura 14.	Fermentación F-6: JCL + Melazas de caña, con sales.	58
Figura 15.	Fermentación F-7: Melazas como única fuente de carbono, con sales.	59
Figura 16.	Velocidades específicas de crecimiento en las fermentaciones F-4 y F-6.	60
Figura 17.	Velocidades específicas de crecimiento en las fermentaciones F-5 y F-7.	61
Figura 18.	Gráfica comparativa de la producción relativa en diferentes métodos.	65
Figura 19.	Fermentación F-9: Caldo nutritivo, sin penicilina.	67
Figura 20.	Fermentación F-10: Caldo nutritivo, con penicilina.	68
Figura 21.	Fermentación F-12: Caldo nutritivo con mayor concentración de glucosa, con penicilina.	69

Figura 22.	Fermentación F-13: Caldo nutritivo con mayor concentración de glucosa, sin penicilina.	70
Figura 23.	Velocidades específicas de crecimiento en los medios a base de caldo nutritivo.	71
Figura 24.	Fermentación F-14: JCL + Melazas + $\text{NH}_4\text{OH}/\text{D.E.}$, con penicilina.	72
Figura 25.	Fermentación F-15: JCL + Melazas + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/\text{D.E.}$, con penicilina.	73
Figura 26.	Fermentación F-16: JCL + Melazas + $\text{NH}_4\text{OH}/\text{D.E.}$, con penicilina.	74
Figura 27.	Fermentación F-17: JCL + Melazas + $\text{NH}_4\text{OH}/\text{D.E.}$, con tween-60.	75
Figura 28.	Fermentación F-18: JCL + Melazas + $\text{NH}_4\text{OH}/\text{A.E.}$, con penicilina.	76
Figura 29.	Fermentación F-19: JCL + Melazas + $\text{NH}_4\text{OH}/\text{A.E.}$, con penicilina.	77
Figura 30.	Velocidades específicas de crecimiento en las fermentaciones F-16 y F-17, comparando el efecto del tween-60.	78
Figura 31.	Velocidades específicas de crecimiento en las fermentaciones F-18 y F-19, con tween c/s adiciones de amonio.	78
Figura 32.	Efecto sobre el crecimiento celular entre matraz (F-20) y fermentador (FJ-1) durante las primeras horas de fermentación.	89
Figura 33.	Fermentación FJ-6: JCL + M, sin adición de penicilina.	90
Figura 34.	Fermentación FJ-2: JCL + M, adición de tween al 1%.	91
Figura 35.	Fermentación FJ-3: JCL + M, penicilina a las 12 h.	92
Figura 36.	Fermentación FJ-5: JCL + M, penicilina a las 9 h.	93
Figura 37.	Fermentación FJ-7: JCL + M, penicilina a las 24 h.	94
Figura 38.	Fermentación FJ-8: JCL + M, penicilina a las 11 h, con adiciones de medio conteniendo NH_4^+ y tween.	95
Figura 39.	Fermentación FJ-9: JCL + M, penicilina a las 18 h.	96
Figura 40.	Cinéticas de crecimiento de las fermentaciones en las que se agregó penicilina a diferentes tiempos.	97
Figura 41.	Velocidades específicas de crecimiento en las fermentaciones en las que se agregó penicilina a diferentes tiempos.	98
Figura 42.	Fermentación FJ-11: Corroboración del procedimiento propuesto.	107

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Localización de las plantas industrializadoras del limón mexicano.	4
Cuadro 2.	Composición química del jugo cocido de limón.	6
Cuadro 3.	Importaciones realizadas por concepto de glutamato monosódico, de 1976 a 1988.	10
Cuadro 4.	Cepas microbianas productoras de ácido L-glutámico.	13
Cuadro 5.	Evaluación de melazas.	39
Cuadro 6.	Composición molar de carbono del medio a base de jugo cocido de limón + glucosa.	39
Cuadro 7.	Composición en g/l de los medios que incluyen melazas en su composición.	40
Cuadro 8.	Composición de medios y condiciones de las fermentaciones F-20 y FJ-1.	43
Cuadro 9.	Composición de medio y condiciones de la fermentación FJ-2.	44
Cuadro 10.	Composición de medio y condiciones de la fermentación FJ-6.	44
Cuadro 11.	Composición de medio y condiciones de las fermentaciones FJ-3, FJ-5, FJ-7, FJ-8 y FJ-9.	45
Cuadro 12.	Composición de las adiciones a FJ-3, FJ-8 y FJ-9.	46
Cuadro 13.	Rendimientos molares y productividades obtenidas en las fermentaciones melácidas y glucosa.	54
Cuadro 14.	Cuadro de comparación entre las fermentaciones de las etapas experimentales I y II.	80-83
Cuadro 15.	Relaciones entre el momento de la adición de NH_4OH y la producción de la fermentación.	87
Cuadro 16.	Tabla comparativa entre las fermentaciones de la etapa experimental III.	102

RESUMEN

La industrialización del limón mexicano (Citrus aurantifolia-Swingle) representa la producción de un residuo con serios problemas para su eliminación, este residuo es el jugo cocido de limón (JCL), con una producción anual de alrededor de 80 millones de litros. Sin embargo, su composición química rica en ácido cítrico (45 g/l) y algunos oligoelementos, sugirió la posibilidad de utilizarlo como medio de fermentación para la producción de aminoácidos, antibióticos y/o proteína unicelular.

Se presentan los resultados obtenidos al utilizar JCL como principal componente en el medio de fermentación, empleando un Corynebacterium glutamicum como microorganismo productor de ácido glutámico, siendo este aminoácido uno de los principales potenciadores de sabor más utilizados en la industria de alimentos.

Los resultados muestran la capacidad del microorganismo para utilizar el cítrico del medio (32 g/l.h) así como un aumento en la producción de glutámico de 2 a 12 g/l al utilizar JCL combinado con melazas de caña, en comparación con los medios compuestos principalmente a base de melazas. Por otra parte, también se describen otras relaciones observadas entre la adición de adyuvantes de la producción de glutámico como lo es la penicilina en concentraciones mínimas, con el efecto que ésta tiene sobre el crecimiento y demanda de oxígeno del microorganismo y su producción de ácido glutámico, como una función de la relación dosis:biomasa:fase de crecimiento. El conocimiento de dichas relaciones en un sistema de fermentación dado, permiten la predicción y control del comportamiento microbiano en relación a la evolución al proceso de fermentación.

Estos resultados pueden representar una posibilidad de mejora en los métodos de producción industrial de este aminoácido, planteando otra alternativa para la utilización y aprovechamiento de este residuo agroindustrial.

I. INTRODUCCION Y ANTECEDENTES

1.1. Problemática de la eliminación de desechos de la industrialización del limón mexicano.

En la actualidad las agroindustrias desempeñan un papel fundamental en la economía de un país, y su desarrollo ha comenzado a ocasionar la presencia de problemas de contaminación debido a la producción de una gran cantidad y diversidad de desechos o desperdicios, los cuales muchas veces no lo son, sino más bien, son recursos mal empleados. Sin embargo, un análisis más minucioso de su naturaleza revela que muchos, mediante alguna transformación pueden pasar directamente a la categoría de materias primas con un valor agregado potencialmente mayor.

No es fácil mencionar el gran número de empresas o industrias que procesan productos agrícolas y que ya enfrentan serios problemas para eliminar sus desechos. Un ejemplo de esto son las industrias enlatadoras de conservas azucaradas, en las que el producto en sí mismo es en realidad sólo un porcentaje menor de fruta o producto agrícola completo, habiendo entonces un gran desperdicio de jugos, cáscaras y semillas.

La problemática que presentan algunos subproductos o desechos agroindustriales, ha originado el desarrollo de diversos proyectos de investigación que han tenido como común objetivo, aprovechar estos desechos en un sentido técnico-económico encausándolos a un mejor fin, además de combatir la contaminación ambiental, entre otras cosas.

Un análisis de la naturaleza de muchos desechos en general, ha revelado la posibilidad de utilizarlos de diversas maneras para la obtención de complementos alimenticios, materiales de construcción, combustibles o recursos energéticos; y no sólo como susstratos de la acción microbiana ambiental sin control.

En el caso particular de este trabajo, se tomó como problema de interés la situación que enfrenta actualmente la agroindustria mexicana del limón, en el sentido de su producción de desechos y específicamente de su producción de jugo cocido de limón.

En la República Mexicana existen 52 plantas industrializadoras del limón mexicano (Citrus aurantifolia-Swingle), localizadas alrededor de las principales zonas agrícolas productoras de este fruto (cuadro 1), el cual ha llegado a ser materia prima para la obtención de una gran variedad de derivados de importancia comercial, entre los que se encuentran: el aceite esencial, terpenos, el jugo simple o natural, el jugo concentrado, jugo en polvo, cáscara, y ácido cítrico y/o citrato de sodio, entre los principales (figura 1). Es precisamente en el proceso de obtención del aceite esencial donde surge el residuo más importante de la industrialización del limón. En este proceso, el limón después de haber sido seleccionado como "limón para industrialización", es molido y exprimido para separar el jugo del aceite y de la cáscara y de otros sólidos. La mezcla de jugo y aceite es destilada separando el aceite esencial quedando como residuo el llamado "jugo cocido de limón" (JCL).

Al producir 3,500 tambos de aceite esencial (180 kg/tambo) que se produjeron en 1980, se originaron aproximadamente 78'750,000 de litros de JCL. Este volumen da idea de su importancia y de la magnitud del problema de su desecho. El proceso industrial para la obtención de aceite esencial, ha cobrado aún mayor importancia en los últimos años, debido al incremento del volumen de exportaciones realizadas (Andrade, 1974).

Dicha cantidad de residuos origina serios problemas para su eliminación, ya que si se desaloja al drenaje causa un incremento en la demanda bioquímica de oxígeno, debido a la gran cantidad de materia orgánica que contiene. Por otro lado, si se desaloja a la tierra provoca la destrucción de la flora y la inutilización del suelo debido a su acidez (García-Hernández, 1983). Sin embargo, el análisis de los constituyentes del jugo cocido de limón (cuadro 2) ha sugerido la posibilidad de utilizarlo como medio de cultivo, mediante ciertos complementos para que puedan ser aprovechados por microorganismos. Entre estos compuestos se deben mencionar el ácido cítrico y los azúcares reductores, los que se encuentran en concentraciones adecuadas para estimular y/o sostener el crecimiento microbiano, el cual si es controlado adecuadamente, puede dirigirse hacia la producción de metabolitos o productos de interés tales como aminoácidos, vitaminas, antibióticos, polímeros, alcoholes, otros productos químicos y/o proteína unicelular. (Santana-Castillo, 1985).

Cuadro 1. Localización de plantas industrializadoras de limón mexicano.

Estado	Municipio	No. de Plantas
Colima		16
	Tecomán	7
	Colima	4
	Armería	2
	Manzanillo	1
	Coquimatlán	1
	Comala	1
Michoacán		16
	Apatzingán	10
	Buenavista	2
	Gabriel Zamora	2
	Fco. J. Mújica	1
La Huacana	1	
Oaxaca		8
	Tututepec	5
	Huazolotitlán	1
	Teotitlán del camino	1
	Chahuites	1
Guerrero		5
	Acapulco	5
Veracruz		2
	Veracruz	1
	Paso de Ovejas	1
Tamaulipas		1
	Llera	1
Jalisco		1
	La huerta	1
Nayarit		1
	Santiago Ixcuintla	1
Sinaloa		1
	Escuinapa	1

Fuente: Unión Nacional de Productores de Aceite de Limón, S.A. de R.L.I.P. y C.V. e Islas, L. 1984.

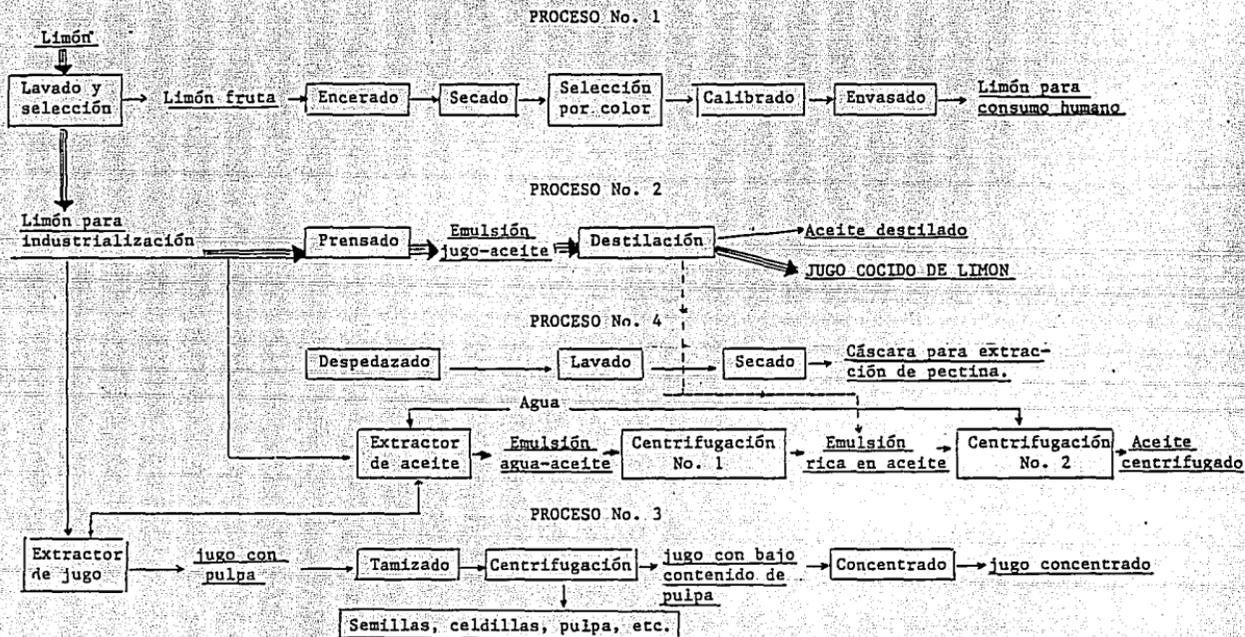


Fig. 1 Diagrama de bloques para la industrialización del limón mexicano.

Cuadro 2. Composición química del jugo cocido de limón.

Concepto	Contenido	
Manganeso	1.5	ppm
Cobre	0.85	ppm
Magnesio	8.0	ppm
Hierro	16.85	ppm
Zinc	4.2	ppm
Cromo	3.0	ppm
Fósforo	15.95	mg/100 ml
Azúcares reductores totales (método de Ting)	1.5	%
Nitrógeno total (método de Kjeldhal)	0.0661	g/100 ml
Acidez (ácido cítrico)	5.426	%
Aceite esencial	0.02	%
°Brix (refracción)	8.06	%
pH	2.5	

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

A partir de los hechos mencionados anteriormente, se llegó al planteamiento de la siguiente hipótesis: Si el jugo cocido de limón contiene componentes capaces de estimular y/o sostener el crecimiento microbiano; entonces deberá ser posible usarlo como medio de fermentación.

Se propuso como posible objetivo de la fermentación, la producción de ácido L-glutámico. No obstante que es un aminoácido no esencial, este es usado ampliamente en la industria de alimentos como glutamato monosódico, el cual, es un ingrediente básico de los potenciadores del sabor para carnes y vegetales (Meyer, 1960 e Islas, 1984).

Las bacterias productoras de este aminoácido tienen como particularidad, la habilidad de acumular ácido L- glutámico a partir de glucosa (Fig.2). A través de reacciones sucesivas llegan a producir ácido pirúvico, que posteriormente es convertido a ácido cítrico; y luego a ácido α -cetoglutárico, que en el ciclo de Krebs pasaría a ser convertido a ácido succínico. Pero la α -cetoglutatarato-deshidrogenasa de estas bacterias se encuentra en bajos niveles, lo que promovería la conversión del ácido α -cetoglutárico en ácido succínico; sin embargo, por un elevado nivel de la enzima glutamato-deshidrogenasa, se favorece la conversión de ácido α -cetoglutárico en ácido L-glutámico (Eveleigh, 1981).

Estudios preliminares (Islas, 1984) demostraron que el ácido cítrico contenido en el jugo cocido de limón, podría ser utilizado como fuente de carbono para el desarrollo de bacterias productoras de ácido glutámico.

Por lo anterior, se realizó una breve revisión del panorama económico en México y en el mundo de ácido glutámico (glutamato monosódico o MSG, como también es conocido).

1.2. Aspectos comerciales de la fermentación del ácido glutámico.

La producción anual de ácido L-glutámico producido exclusivamente por

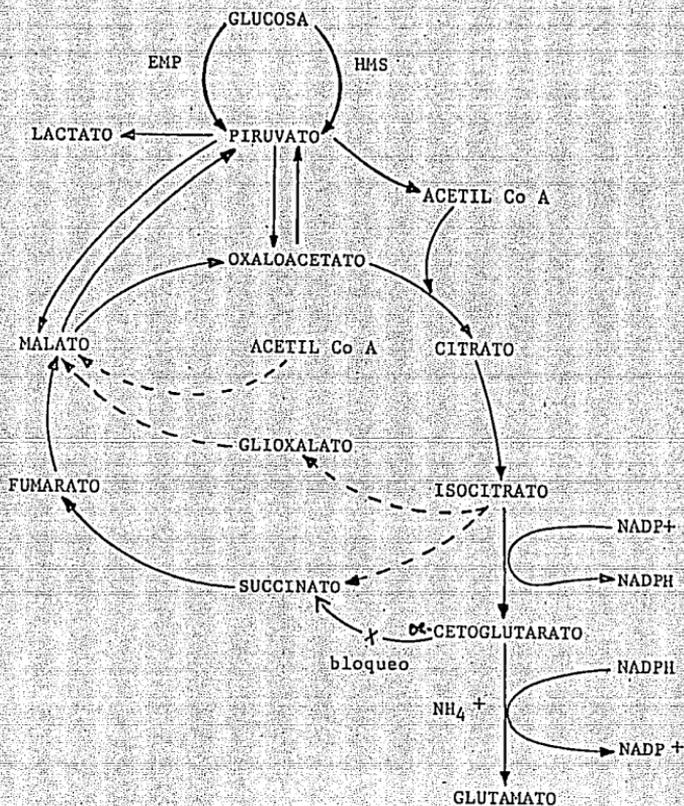


Fig. 2 Camino biosintético para la obtención de ácido glutámico a partir de glucosa. (---) Reacciones que ocurren en la ruta anaplerótica del ciclo del glioxalato para completar el ciclo de Krebs. Shio, I. (1960).

fermentación excede las 370,000 toneladas en todo el mundo. Es producido en Japón, Korea, Taiwán, Tailandia, Malasia, Indonesia, Filipinas, Francia, Italia, España, Brazil, Perú, Estados Unidos y muy recientemente también en México. Entre estos países, Japón es el mayor productor con las compañías Ajinomoto Co., Asahi-Kasei Co., Kyowa-Hakko Co. y Takeda-Yakuhin Co. manufacturando alrededor de 107,000 toneladas anuales entre ellas (Eveleigh, 1981).

Las melazas de caña o el almidón de tapioca se han empleado exclusivamente como materia prima del ácido glutámico. El costo promedio es de alrededor de \$95,00 USD. por tonelada para el almidón de tapioca. El precio del ácido glutámico comúnmente es de aproximadamente \$2.00 USD./Kg.

El ácido glutámico es utilizado ampliamente como sazonador en todo el mundo. También es usado como materia prima para la síntesis de varios productos químicos. El n-acetil-glutamato se encuentra en el mercado como un tensoactivo biodegradable de baja acción irritante sobre la piel, lo que lo hace apreciable como un aditivo en cosméticos, jabones y shampoos. El ácido oxopirrolidin-carboxílico, es otro derivado del ácido glutámico y es utilizado como factor humectante en cosméticos. Las amidas del acil-glutamato son utilizadas como agentes gelatinizantes de donde se obtienen una gran variedad de hidrocarburos y aceites vegetales de tipo gelatinoso y tiene aplicaciones como dispersante de aceite con propósitos de combatir la contaminación del mar.

En México, el ácido glutámico también es un producto de importancia económica dados los volúmenes de las importaciones registrados (cuadro 3); no obstante que estas han sido afectadas en los últimos años por diversas razones.

De 1976 a 1981 el volumen de las importaciones venía en aumento, llegando a alcanzar los 9 millones de dólares al año, pero a partir de 1982 se observa un colapso causado básicamente por la crisis económica que ha sufrido México desde ese año.

Por otra parte, alrededor de 1985 se arranca la producción de glutamato monosódico en México por la empresa Fermex S.A.deC.V. con tecnología japonesa, lo que contribuyó a la reducción de las importaciones.

**Cuadro 3. Importaciones realizadas por concepto de
glutamato monosódico de 1976 a junio de 1988.**

Año	US.\$/Kg	Volumen (Kg)	Valor (US.\$)
1976	1.10	2'749,075	3'027,281
1977	1.23	1'955,049	2'415,658
1978	1.36	2'318,347	3'166,826
1979	1.56	2'655,307	4'151,838
1980	1.95	3'368,848	6'575,990
1981	2.20	4'130,335	9'105,941
1982	2.13	2'657,842	5'673,922
1983	1.68	1'623,826	2'729,290
1984	1.25	407,670	508,270
1985	1.57	632,596	992,500
1986	1.34	458,232	613,518
1987	1.14	486,853	556,745
1988 *	1.25	320,547	399,213

Fuente: Anuarios del instituto Mexicano de comercio exterior e
INFOTEC

* Hasta junio.

Ante dicha situación, y dado el grado de avance de este proyecto en ese momento, se planteó como una nueva posibilidad el aprovechamiento de los conocimientos alcanzados sobre la utilización del jugo cocido de limón, para ser propuestos como una alternativa de mejora en el proceso de fermentación que ya tiene en operación Fermex S.A.deC.V., ya que es evidente que la capacidad de producción tiene que ser aumentada, pues la demanda real que se deduce de los datos del cuadro 3, aún no ha sido satisfecha.

II. LA FERMENTACION DEL ACIDO GLUTAMICO

La propiedad de exaltar el sabor del Konbu, un alga marina usada tradicionalmente como un sasonador en Japón, se identificó en principio debido a la presencia del ácido L-glutámico (Ikeda 1908). Este descubrimiento condujo al desarrollo de su producción industrial como glutamato monosódico. En aquellos días el ácido L-glutámico era producido a partir de la hidrólisis ácida del gluten de trigo o de proteína de soya. Por otro lado y durante alrededor de 50 años, se aislaron microorganismos productores de ácido L-glutámico (Kinoshita 1957) y de la investigación subsecuente se ha llegado al desarrollo de procesos fermentativos económicos para su producción comercial.

El desarrollo e investigación de la fermentación del ácido L-glutámico, cambió métodos de producción comercial de glutamato monosódico desde el proceso de hidrólisis de proteína hasta el proceso de producción microbiana. El proceso de hidrólisis de proteína era más costoso usando materias primas como el gluten de trigo o la proteína de soya, resultando una gran cantidad de subproductos tales como almidón o mezclas de aminoácidos. Por otro lado la fermentación de ácido glutámico, no rinde ningún subproducto en particular, habiendo ahora reemplazado completamente el método de hidrólisis de proteína.

Hoy día, nuevas tecnologías comienzan a ser utilizadas para un mayor mejoramiento de la fermentación de ácido glutámico. La recombinación de DNA y las técnicas de fusión celular pueden ser útiles para la construcción genética de microorganismos con mayores rendimientos de producción o con la capacidad de aprovechar o asimilar materias primas más baratas, tales como compuestos monocarbonados y materiales celulósicos. También se están investigando biorreactores con microorganismos productores de ácido glutámico inmovilizados en un intento de mejorar la productividad. (Eveleigh, 1981).

2.1 Cepas microbianas productoras de ácido L-glutámico.

En el cuadro (4) se muestran algunas de las cepas silvestres que se han aislado y reconocido como bacterias productoras de ácido glutámico (Yamada et, al 1972). La mayoría de estas bacterias productoras de ácido L-glutámico son Gram positivas, no formadoras de esporas, no móviles y requieren biotina para crecer.

Los microorganismos capaces de producir ácido glutámico en grandes cantidades están divididos en dos grupos: el primero de ellos, son las bacterias formadoras de esporas del género Bacillus. (Kwei-Chao, 1959). El segundo lo forman bacterias de cuatro géneros que no esporulan: Corynebacterium, Brevibacterium, Microbacterium y Arthrobacter.

De los grupos mencionados, el más importante desde el punto de vista industrial, es el segundo. Estos microorganismos son capaces de producir entre 30 y 50 g. de ácido L-glutámico a partir de 100g. de glucosa por litro de medio. (Kinoshita, S. 1972).

Cuadro (4) CEPAS MICROBIANAS PRODUCTORAS
DE ACIDO L-GLUTAMICO.

Género	Especie
<u>Corynebacterium</u>	<u>C. glutamicum</u> , <u>culilium</u> , <u>c. Callunae</u> , <u>C. herculis</u> .
<u>Brevibacterium</u>	<u>B. divaricatum</u> , <u>B. amino-</u> <u>genes</u> , <u>B. flavum</u> , <u>B. lacto-</u> <u>fermentum</u> , <u>B. saccarolyti-</u> <u>cum</u> , <u>B. roseum</u> , <u>B. immario-</u> <u>philum</u> , <u>B. alanicum</u> , <u>B. am-</u> <u>moniaenes</u> , <u>B. thiogenita-</u> <u>lis</u> .
<u>Microbacterium</u>	<u>M. salicinovolum</u> , <u>M. ammo-</u> <u>niaphilum</u> , <u>M. flavum var.</u> <u>glutamicum</u> .
<u>Arthrobacter</u>	<u>A. globiformis</u> , <u>A. amino-</u> <u>faciens</u> .

Fuente: Kinoshita, S. 1972.

2.2 Condiciones de Cultivo.

2.2.1 Fuente de Carbono.

Las bacterias productoras de ácido L-glutámico pueden utilizar como sustrato para el crecimiento celular y la biosíntesis del ácido L-glutámico varias fuentes tales como la glucosa, fructuosa, sacarosa, maltosa, ribosa y xilosa. En la producción industrial se emplea generalmente como fuente de carbono, melazas e hidrolizados de almidón.

Con el fin de obtener altos rendimientos de ácido L-glutámico, la concentración de biotina debe ser controlada estrictamente a niveles por debajo del óptimo para el máximo crecimiento. De esto es que algunas materias primas ricas en biotina, no habían podido ser utilizadas para este proceso hasta el descubrimiento del efecto antagónico a la biotina que tenían las penicilinas y los ácidos grasos saturados en C₁₆-C₁₈. Las mutantes auxótrofas de ácido oléico, acumulan ácido L-glutámico en medios ricos en biotina solo cuando la concentración de ácido oléico es controlada a un nivel por abajo del óptimo para el máximo crecimiento. (Kansaki, 1969).

2.2.2 Fuente de nitrógeno y control de pH.

Debido a que la molécula de ácido L-glutámico contiene 9.5% de nitrógeno, la fermentación requiere de un gran suplemento de nitrógeno. Las sales asimilables de amonio son el cloruro y el sulfato de amonio. Las bacterias productoras de ácido glutámico también tienen una gran actividad de ureasas, por lo que también la urea es utilizable como fuente de nitrógeno. El ion amonio es nocivo tanto para el crecimiento celular como para la formación del producto y su concentración en el medio debe ser mantenida a un bajo nivel. El pH del medio de cultivo tiende a acidificarse al tiempo que los iones amonio van siendo asimilados y el ácido L-glutámico excretado. El amoniaco gaseoso tiene grandes ventajas sobre los álcalis

acuosos para mantener el pH entre 7.0 - 8.0 el cual es el óptimo para la acumulación de ácido L-glutámico. Sirve tanto como agente controlador de pH, así como de fuente de nitrógeno resolviendo muchos problemas de orden técnico. La adición automática de amoníaco gaseoso, hace posible un control preciso del pH evitando efectos tóxicos del amonio y la dilución indeseable del líquido de fermentación. (Kinoshita, 1972).

2.2.3 Factores de Crecimiento.

Las bacterias productoras de ácido L-glutámico requieren biotina para su crecimiento y su concentración debe ser controlada estrictamente, para obtener un rendimiento máximo del producto. El efecto de la biotina sobre la fermentación del ácido L-glutámico ha sido investigado intensivamente en relación a la permeabilidad del ácido L-glutámico sobre la membrana celular, el cual será descrito más adelante.

2.2.4 Suplemento de Oxígeno.

La biosíntesis del ácido L-glutámico es un proceso aeróbico que requiere oxígeno durante la fermentación. Para una máxima producción, es esencial el control del oxígeno disuelto a su nivel óptimo. Las células respirando activamente, consumirán todo el oxígeno en un caldo saturado (7ppm) en pocos segundos, por lo que se debe suplementar oxígeno continuamente para mantener su concentración óptima. Para conseguir una aereación efectiva se deben considerar factores fisiológicos y de ingeniería. La ecuación (1) es una expresión sencilla que describe la transferencia de oxígeno durante la fermentación:

$$Q_{O_2} = K_1 a (C_1^* - C_1) = Q_{O_2 \text{ crit}} = K_1 a (C_1^* - C_{1 \text{ crit}}) \dots (1)$$

Donde:

Q_{O_2} es la velocidad de respiración celular ($\text{mol O}_2 \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{seg}^{-1}$).

$K_1 a$ es el coeficiente de transferencia volumétrica de oxígeno (seg^{-1}).

C_1^* es la concentración de oxígeno en la fase líquida que esta en equilibrio con la fase gaseosa ($\text{mol O}_2 \cdot \text{ml}^{-1}$).

C_1 es la concentración de oxígeno disuelto en la fase líquida
($\text{mol O}_2 \cdot \text{ml}^{-1}$)

$QO_2 \text{ crit}$ es la velocidad de respiración crítica ($\text{mol O}_2 \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{seg}^{-1}$)

$C_1 \text{ crit}$ es el nivel crítico de oxígeno disuelto para la respiración celular. La velocidad de respiración celular QO_2 es igual a $QO_2 \text{ crit}$ a niveles de C_1 mayores de $C_1 \text{ crit}$.

Los valores de $C_1 \text{ crit}$ son generalmente menores de 0.01 atm., demasiado bajos para ser determinados con un electrodo de oxígeno convencional.

Debido a lo anterior se ha desarrollado un nuevo método, donde se puede medir simultáneamente el C_1 y el potencial redox del medio de cultivo. El valor de C_1 medido de esta manera es de 0.0002 atm. para la bacteria productora de ácido L-glutámico Brevibacterium flavum (Akashi et. al. 1978).

Para una producción máxima de ácido L-glutámico, es necesario satisfacer los requerimientos respiratorios de las células ($QO_2/QO_2 \text{ crit} = 1.0$); el suplemento de oxígeno debe ser estrictamente controlado para mantener C_1 mayor que $C_1 \text{ crit}$. Prácticamente el grado de agitación y aereación en la fermentación de ácido L-glutámico es controlado para mantener el nivel de C_1 ligeramente mayor de 0.001 atm., utilizando electrodos convencionales de oxígeno (Hiroshe et. al. 1966).

La falta de análisis cuantitativo sobre la transferencia de oxígeno, ha llevado muchas veces a conclusiones erróneas sobre el metabolismo celular. Por ejemplo, se ha supuesto que las bacterias productoras de ácido L-glutámico, excretan ácido láctico en medios ricos en biotina, pero se ha encontrado que esta excreción es más bien debida a una deficiencia de oxígeno y no al exceso de biotina. En un medio rico en biotina la densidad celular viene a ser mayor, resultando en un incremento de la demanda de oxígeno presente. Las células no presentan acumulación de ácido láctico en un medio rico en biotina, cuando éste tiene un suplemento adecuado de oxígeno; es decir, en un valor $QO_2/QO_2 \text{ crit}$ de 1.0 (Hiroshe et. al. 1968).

2.3 Acumulación de otros productos en relación al cambio de las condiciones de cultivo.

2.3.1 Acidos lácticos y succínico.

El Brevibacterium flavum productor de ácido L-glutámico, acumula ácidos lácticos y succínico cuando es cultivado bajo un suplemento limitado de oxígeno. A medida que el suplemento de oxígeno es disminuído desde la condición de completa saturación hasta varios grados de satisfacción del requerimiento de oxígeno, el producto principal cambia de ácido L-glutámico a ácido succínico y luego a ácido láctico. Más de 30 g/l de ácido succínico o 45 g/l de ácido láctico, pueden acumularse en 72 h. en condiciones óptimas (Okada et. al. 1961).

2.3.2 Acido α -cetoglutárico.

Se ha demostrado que en la ausencia de iones amonio, pero con suficiente suplemento de oxígeno resulta en la acumulación de ácido α -cetoglutárico en lugar de ácido L-glutámico. Cuando el agente controlador de pH es cambiado de NH_4OH a NaOH , al final de la fase de crecimiento, se pueden acumular hasta 18 g/l de ácido α -cetoglutárico a un rendimiento de 0.20 g/g de sustrato a las 72 h. de cultivo (Tamako et.al. 1960).

2.3.3 L-glutamina.

El ácido L-glutámico es convertido a L-glutamina cuando el cultivo se desarrolla en presencia de un exceso de cloruro de amonio a un pH ligeramente ácido en presencia de iones zinc. En un medio que contiene 40 g/l de cloruro de amonio y 10 mg/l. de sulfato de zinc, las células acumulan más de 40 g/l de L-glutamina a un rendimiento de 0.3 g/g. de fuente de carbono. Una alta concentración de iones de amonio en condiciones ligeramente ácidas, resulta en la producción de N-acetil-L-glutamina. Los iones de zinc son efectivos en disminuir la excreción de N-acetil-L-glutamina en favor de la acumulación de L-glutamina (Nakanishi et.al. 1975).

2.4 Fisiología microbiana de la fermentación de ácido glutámico.

2.4.1 Permeabilidad de la membrana celular al ácido L-glutámico en relación a la concentración de biotina.

Un compuesto clave para controlar la fermentación del ácido L-glutámico es la biotina. La acumulación de ácido L-glutámico es máxima cuando la concentración de biotina en las células es de 0.5 mcg/g de células secas; sin embargo, en presencia de un exceso de biotina, la adición de penicilina, la cual se sabe inhibe la formación del peptidoglicano de la bacteria en fase de crecimiento, permite a las células acumular una gran cantidad de ácido L-glutámico. Otros antibióticos tales como la cefalosporina-C, la cual también inhibe la síntesis de pared celular, puede sustituir a la penicilina. La adición de ácidos grasos saturados en C_{16} - C_{18} o sus ésteres con polialcoholes hidrofílicos durante la fase de crecimiento, también permiten a las células acumular ácido glutámico en un medio rico en biotina. El uso de estos antibióticos y ácidos grasos saturados en C_{16} - C_{18} , han permitido la utilización industrial de materias primas ricas en biotina tales como las melazas de caña.

La acumulación de ácido L-glutámico está gobernada no tanto por su biosíntesis, sino como por su excreción. La excreción del ácido L-glutámico está estrechamente relacionada a la permeabilidad de la membrana celular. Las células productoras de ácido L-glutámico crecidas en un medio con biotina limitada o crecidas con un exceso de biotina y tratadas ya sea con penicilina o tween-60, excretan el ácido L-glutámico intracelular cuando son lavadas con regulador de fosfato. Sin embargo, las células crecidas con exceso de biotina sin el tratamiento de penicilina o tween-60 no lo hacen. Este fenómeno se ha observado también para el ácido L-aspártico. Se han extraído otros aminoácidos de las células, aún cuando crecieron en condiciones ricas en biotina. Las células excretoras de ácido L-glutámico ante la limitación de biotina y por lo tanto de los requerimientos de ácido oléico, o con el tratamiento de los ácidos grasos saturados en C_{16} - C_{18} , tienen un bajo contenido de fosfolípidos en la membrana celular.

Por otro lado las células con poca habilidad para acumular ácido L-glutámico en un medio rico en biotina, tienen una concentración de fosfolípidos en membrana mucho más alta.

Como se muestra en la figura 3, la biotina es un cofactor de la acetil CoA carboxilasa, la primer enzima en la biosíntesis del ácido oléico; y los ácidos grasos saturados en $C_{16}-C_{18}$, inhiben la biosíntesis del ácido oléico reprimiendo a la acetil CoA carboxilasa (Izumi et. al. 1973, Kamiryo et. al. 1976). Concentraciones limitadas de biotina o ácidos grasos saturados en $C_{16}-C_{18}$ causan una biosíntesis incompleta de ácido oléico, resultando en un decremento en la concentración de fosfolípidos. Consecuentemente se ha pensado, que fosfolípidos tales como la cardiolipina y el fosfatidilinositol dimanósido, están involucrados en la regulación de la permeabilidad de las células al ácido L-glutámico. El efecto de la penicilina sobre la permeabilidad del ácido L-glutámico, no se explica por el contenido de fosfolípidos en la membrana celular. La membrana de las células tratadas con penicilina es sensible a los cambios de presión osmótica. Bajo una presión osmótica reducida, la penicilina promueve la excreción del ácido L-glutámico en un medio rico en biotina y un estudio microscópico revela que la penicilina induce al desarrollo de células elongadas e hinchadas. Por otro lado, los ácidos grasos saturados en $C_{16}-C_{18}$, incrementan la excreción de ácido L-glutámico en un medio rico en biotina independientemente de la presión osmótica. A partir de estos hallazgos, es posible considerar que la penicilina tiene un efecto secundario sobre la función de la membrana. Primero inhibe la síntesis de la pared celular dejando la membrana celular desprotegida y entonces la membrana celular queda expuesta, alterándose su permeabilidad y favoreciendo la excreción del ácido L-glutámico.

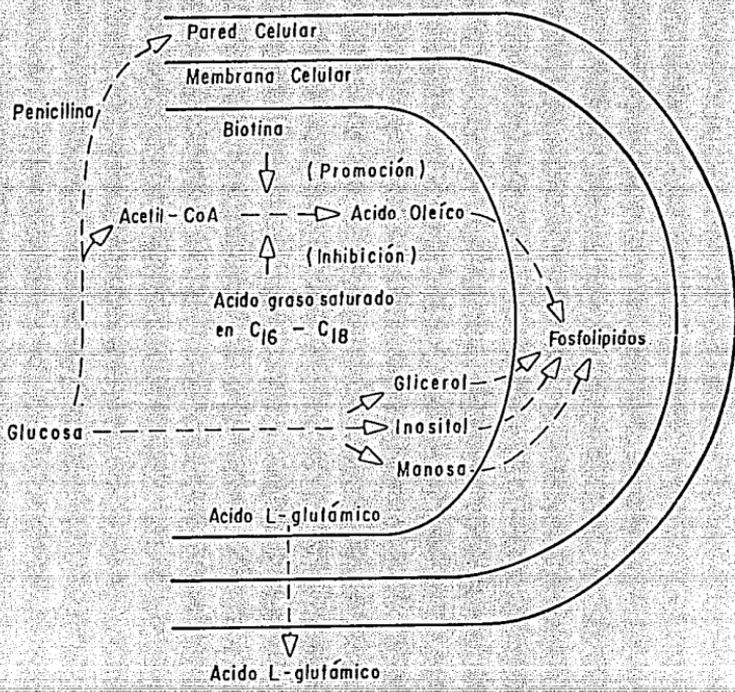


Figura 3. Fisiología microbiana en la producción de ácido L-glutámico.

2.4.2 Mecanismos de regulación en la biosíntesis del ácido L-glutámico.

No obstante que la barrera de permeabilidad es más importante, se han estudiado mecanismos reguladores de la biosíntesis del ácido L-glutámico con el fin de obtener mutantes superproductoras.

(Ver figura 2).

En la producción de ácido L-glutámico hay dos enzimas que juegan papeles muy importantes; la fosfoenol piruvato carboxilasa (PC) la cual cataliza la carboxilación de fosfoenol piruvato para formar el oxaloacetato y la α -cetoglutarato deshidrogenasa (KD), la cual convierte al α -cetoglutarato a succinil-CoA (Shiio y Ujigawa, 1980). La eficiencia en la fijación de dióxido de carbono para dar ácido oxaloacético, depende de la actividad de PC. El ácido aspártico ha demostrado tanto inhibición como represión de la enzima y la inhibición es incrementada por el ácido α -cetoglutámico. Por lo tanto, el contenido endógeno de ácidos aspártico y α -cetoglutámico debe minimizarse si se quiere maximizar la producción de ácido L-glutámico. La KD es esencial para completar la oxidación de la glucosa a dióxido de carbono. Esta enzima es fuertemente inhibida por el cis-acnitato, la succinil-CoA, el NADH, el NADPH, el piruvato y el oxaloacetato; mientras que es estimulada por la acetil-CoA. Las propiedades de la KD de las bacterias productoras de ácido L-glutámico, son favorables para la síntesis preferencial al ácido L-glutámico a partir de ácido α -cetoglutámico, evitando o previniendo la oxidación posterior del ácido α -cetoglutámico a dióxido de carbono y agua vía succinil-CoA. Se ha demostrado que el valor de K_m de la KD para el ácido α -cetoglutámico es de cerca de 1/70 en relación al L-glutámico deshidrogenasa, la cual cataliza la formación de ácido L-glutámico a partir de α -cetoglutarato. Por otro lado la V_{max} de la L-glutámico deshidrogenasa, es cerca de 150 veces mayor que la de KD. Por consiguiente la concentración endógena para dar ácido L-glutámico o una oxidación posterior, ha demostrado ser lo suficientemente alta para sobreproducir preferencialmente ácido L-glutámico (Shiio y Ujigawa, 1980).

2.4.3 Mejoramiento genético de microorganismos productores de ácido L-Glutámico.

Inicialmente la sobreproducción de ácido L-glutámico se llevó a cabo con cepas silvestres en las que la barrera de permeabilidad fué modificada, pero se incrementó aún más por la selección microbiana. Un ejemplo, la modificación de la barrera de permeabilidad celular por mutación: un mutante sensible a la temperatura que mostraba un crecimiento normal a 30°C, pero poco o nada a 37°C, producía una gran cantidad de ácido L-glutámico aún en un medio con exceso de biotina, cuando el cultivo era sometido a un incremento en la temperatura de 30 hasta 40°C. La síntesis de membrana de este mutante fué considerada insuficiente a 37-40°C, permitiendo entonces la excreción del ácido L-glutámico en un medio rico en biotina. No se necesitó control químico con penicilina o con ácidos grasos saturados en C₁₆-C₁₈ para la sobreproducción del ácido L-glutámico en un medio rico en biotina, (Memose y Takagi, 1978).

Otro intento de mejorar el rendimiento en la producción involucrada, fué controlando la fijación de dióxido de carbono. El ácido glutámico es biosintetizado a través del ciclo de glioxalato como un sistema generador de oxaloacetato sin fijación de dióxido de carbono, (fig. 4a). El incremento en la fijación de dióxido de carbono puede mejorar la producción. (fig. 4b).

Varias de las mutantes resistentes al monofluoroacetato derivadas del Brevibacterium lactofermentum mostraron un incremento en la productividad de ácido L-glutámico paralelamente de un incremento en la actividad de PC (Yamada et.al. 1978). Una de estas mutantes con baja actividad de la isocitrato liasa también acumuló mayores cantidades de ácido L-glutámico (Tosaka et.al. 1981). En esta mutante se incrementó el grado de fijación del dióxido de carbono.

Una mutante derivada del Brevibacterium lactofermentum con baja actividad de su piruvato deshidrogenasa, utilizó ácido acético y glucosa simul-

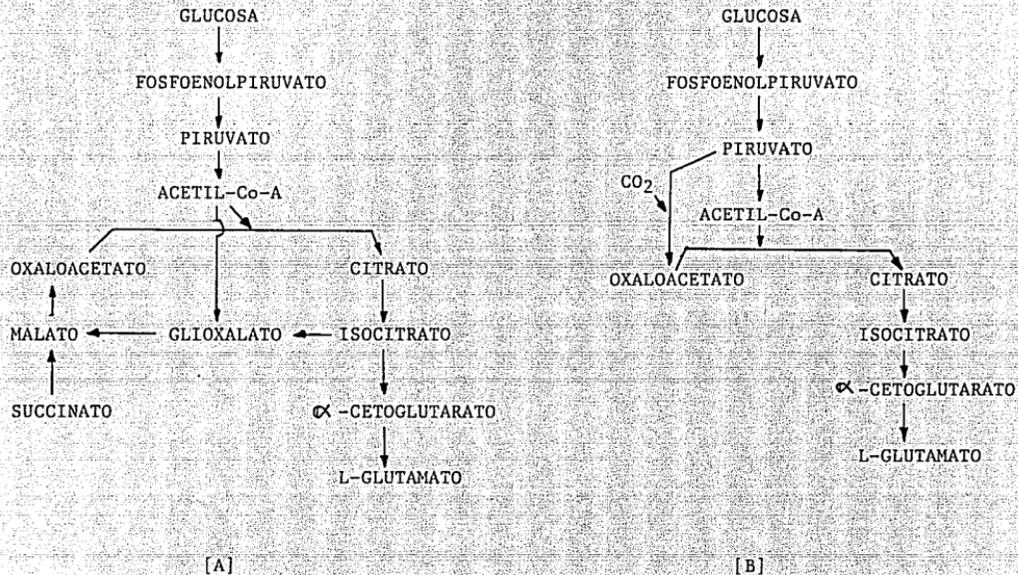


Figura 4. Rutas biosintéticas: A] común, B] alternativa incrementando la fijación de CO₂ como estrategia de mejoramiento genético de microorganismos productores de glutámico.

táneamente para dar un alto rendimiento, en la cual se consideró que el ácido acético era asimilado como sustrato para acetil-CoA y la glucosa como sustrato para oxaloacetato (Ono et.al. 1980).

La aplicación de las nuevas técnicas de DNA recombinante para mejorar a las bacterias productoras de ácido L-glutámico, es un camino prometedor. Diversos tipos de plásmidos Brevibacterium (Kaneko et.al. 1979- Momose et.al. 1976- Shapiro, 1976 - Tsuchida et.al. 1981) y un plásmido de Corynebacterium relacionado con la resistencia a espectinomicina, se ha encontrado como un posible sistema vector.

2.5 Fermentaciones a gran escala de ácido L-glutámico.

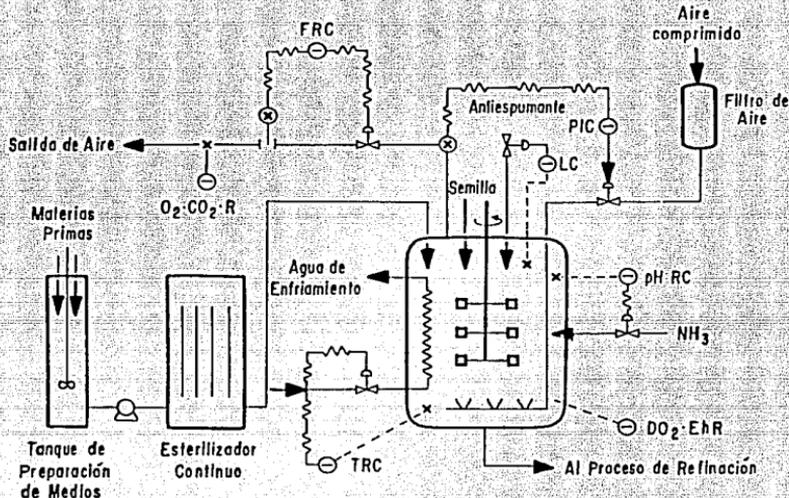
La figura 5 muestra un sistema típico de la fermentación de ácido L-glutámico a gran escala equipado con control automático.

La esterilización continua, en lugar de la esterilización por lote es más efectiva para eliminar microorganismos extraños indeseables en grandes volúmenes de medio. Las ventajas son: (1) Ahorro de energía, (2) mejor control de calidad y (3) mayor productividad. Para la esterilización del aire se emplean generalmente filtros de aire empacados con fibra de vidrio o filtros absolutos.

En una fermentación de ácido L-glutámico, se requiere menor gasto de energía para la agitación que en una fermentación de antibiótico, debido a que los fluidos de cultivos bacterianos tienen menor viscosidad que los fluidos de cultivos miceliales. Sin embargo, se debe notar que el requerimiento de oxígeno y la generación de calor por unidad de tiempo y de volumen del cultivo, es mayor debido a las altas velocidades de asimilación de azúcar y respiración celular.

Para una exitosa operación de fermentación se deben optimizar la tensión del oxígeno disuelto, la temperatura mediante un sistema enfriador y mantener el pH de cultivo a un valor constante con amoníaco gaseoso. Estos controles pueden ser llevados con sistemas auxiliares por computadora (Hikuma et.al. 1981). Más aún, puede programarse fácilmente el control secuencial de muchas operaciones de modo que todas ellas ocurran sincronizadamente; por ejemplo, la esterilización del sistema, la alimentación de la solución concentrada de azúcar al fermentador y después el lavado del fermentador.

Figura 5.



Ejemplo de un proceso de fermentación controlado automáticamente:

LC = Control de nivel.

PLC = Control de presión.

pHRC = Registro y control de pH.

FRC = Registro y control de la velocidad de flujo.

TRC = Registro y control de temperatura.

DO₂ . EhR = Registro de oxígeno disuelto y potencial redox.

III. OBJETIVOS

* Realizar estudios sobre la fermentación para la producción de ácido glutámico, utilizando el jugo cocido de limón como principal componente en el medio, con la cepa Corynebacterium glutamicum ATCC 13032.

* Determinar las concentraciones y tiempos de adición de algunos nutrientes y adyuvantes que favorezcan el incremento en la producción de ácido glutámico.

* Establecer el perfil de evolución de la fermentación utilizando diversas composiciones de medio, a nivel matraz.

* Determinar el efecto sobre la producción de ácido glutámico, de la adición de algunos adyuvantes, en diferentes condiciones.

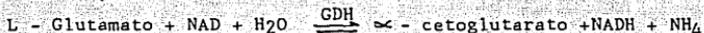
* Definir los patrones de aeración, agitación, pH, adición de nutrientes y adyuvantes, y condiciones de inóculo, que aseguren la producción de ácido glutámico en el medio de fermentación puesto a nivel de fermentador de 5 l.

IV. MATERIALES Y METODOS:

4.1 Determinaciones analíticas.

4.1.1 Acido L-glutámico

El método se basa en la reacción catalizada por la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) (Beutler, 1974)



Dicha reacción en el sistema microbiano, tiende hacia la producción de glutámico (izquierda). Sin embargo, atrapando el α -cetoglutarato con hidrazina e introduciendo un exceso de NAD en medio alcalino, el glutamato puede oxidarse cuantitativamente a α -cetoglutarato. Se determina el incremento en la densidad óptica a 340 ó 360 nm, debido a la formación de NADH que es medida de la reacción, utilizando un espectrofotómetro Beckman.

Validación del método.

Definiendo la exactitud como la concordancia sobre el valor determinado experimentalmente y un valor de referencia estándar, se puede realizar una prueba simple que determina si la diferencia entre un valor obtenido y el valor esperado, es significativa o no.

Se prepararon una serie de diluciones a pH=7 con NaOH 10%, tal que contuvieran 40, 80, 100, 140 y 200 mcg/ml. de ácido glutámico. Se realizaron las determinaciones por duplicado y promediando las lecturas se obtuvieron los siguientes datos:

Esperado (mcg/ml)	Obtenido (mcg/ml)	Diferencia d	Diferencia ² d ²
40	42.05	2.05	4.2
80	74.90	-5.1	26.0
100	98.55	-1.5	2.1
140	130.52	-9.5	89.9
200	200.75	0.75	0.57
		<u>Ed=-13.3</u>	<u>Ed²=122.76</u>
		<u>d=-2.66</u>	<u>sd= 4.7</u>

Según la fórmula: $t = \frac{[\bar{d}] \sqrt{n}}{sd} - - - (2)$

Se plantea:

Si $t < t_c \Rightarrow$ no es significativa la diferencia con un 95% de confianza y $n-1$ grados de libertad.

Calculando $t = \frac{2.66 \sqrt{5}}{4.7} = 1.3$

Con un 95% de confianza $\alpha = 0.05$ y $n-1=4$ grados de libertad $t_c=2.13$ (distribución t de student). Concluyendo que: $t=1.3 < t_c=2.13$

Por lo que se puede decir que no hay diferencia significativa entre los valores encontrados y los esperados, por lo tanto el método es exacto.

Definiendo linealidad como el grado en el que una gráfica de calibración se aproxima a una línea recta, es posible encontrar la linealidad del mismo conjunto de datos anteriores graficando el valor encontrado en función del esperado. Utilizando un programa de regresión lineal, se obtienen los siguientes resultados:

Coeficiente de regresión	R=0.997
Pendiente de la recta	m=0.989
Intercepción en Y	Y(x ₀)= -1.4

Lo que concluye que el método tiene una respuesta lineal dentro del rango de concentraciones ensayado. Ver figura (6).

Definiendo la precisión como el grado de concordancia de mediciones repetidas de una misma propiedad, derivado de la desviación estándar. Se preparó una solución estándar con una concentración de 17 g/l de ácido L-glutámico, de la que se hicieron diferentes disoluciones sometiendo cada una de ellas al ensayo y de los resultados obtenidos se calculó la concentración de la solución original considerando los respectivos factores de dilución.

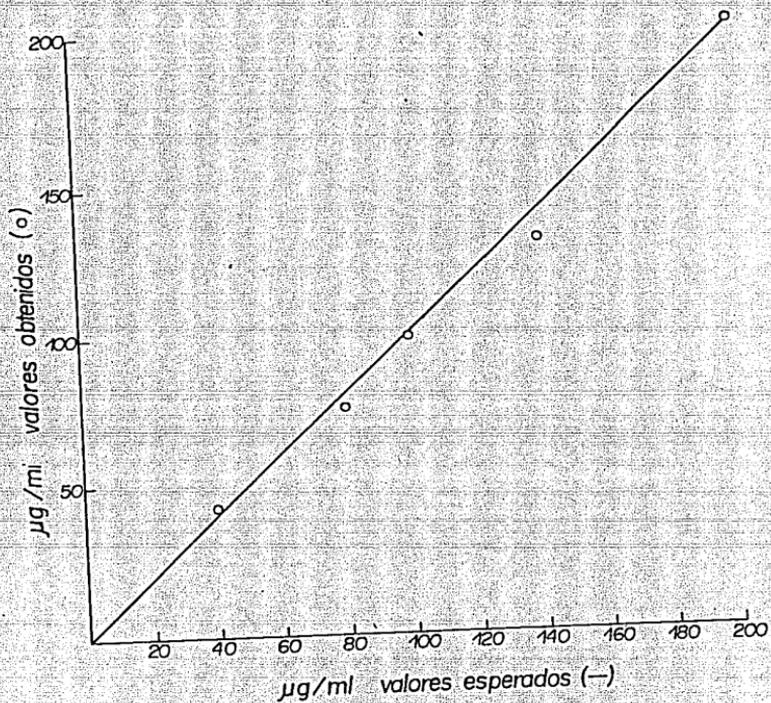


Figura 6. Gráfica de validación del método enzimático para la determinación de ácido L-glutámico

<u>Concentración teórica en el ensayo (mcg/ml)</u>	<u>Concentración que reporta en el ensayo (mcg/ml).</u>	<u>Concentración de la muestra que reporta el método (g/l).</u>	<u>Concentración esperada de la muestra (g/l).</u>
17	16.8	16.8	17
34	31.3	15.7	17
51	47.3	15.8	17
68	66.4	16.6	17
85	86.3	17.3	17
		$\bar{X}=16.4$	
		$\sigma^2=0.004$	

Por lo anterior se concluyó que el método utilizado para la determinación de ácido L-glutámico es adecuado y confiable dentro del rango de concentraciones ensayadas que son similares a las muestras de fermentación.

4.1.2 Reductores libres.

Con el fin de determinar el perfil de consumo de azúcares con extremos reductores, se realizaron ensayos de los medios de fermentación antes y durante el desarrollo de éstas utilizando el método de Ting (Ting, 1956).

4.1.3 Crecimiento celular.

El crecimiento celular se determinó midiendo la transmitancia de suspensión de biomasa a 540 nm. en un fotocolorímetro Spectronic 20, Bausch & Lomb, teniendo como base de cálculo la ecuación de la curva de calibración reportada por Islas L. (Islas, 1984) para el mismo microorganismo empleado.

4.1.4. Acidos cítrico y láctico.

Se determinaron por cromatografía de gases mediante una modificación del método de Steemkamp y Villiers (1980): En un reactival de 5 ml Pierce Chemical Co. Inc., se colocan 0.3 ml del caldo de fermentación libre de células; entonces es acidificado mediante la adición de una

gota de HCl al 30%. Se agita y se pone a secar al vacío a una temperatura de 60°C en un horno Thelco, mod. 19. Una vez seca la muestra y a temperatura ambiente, se le adiciona 0.5 ml., de reactivo BF₃-Metanol al 14% (Pierce Chemical Co.), se cierra herméticamente y se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante aproximadamente 12 horas para obtener los derivados volátiles de estos ácidos carboxílicos. Al término de esta reacción se agregan 0.85 ml. de sulfato de amonio al 33% y 1 ml. de cloroformo, se agita para realizar la extracción a la fase orgánica y entonces se centrifuga para acelerar la separación de fases y tomar solo la clorofórmica. Se inyecta esta fracción al cromatógrafo de gases "Varian" mod. 3700. La columna utilizada es espiral metálica de seis pies de largo por un diámetro de interno de 1/8", empacada con una fase líquida OV-17 al 3% absorbida en Cromosorb WHP de 80/100 mallas de tamaño de partícula.

Las condiciones de la cromatografía son las siguientes:

- a) Temperatura del detector de ionización a la flama: 220°C.
- b) Temperatura del inyector 85-185°C, con una relación de incremento de 20°C/min., dejando a 185° un minuto.
- c) Flujo de nitrógeno e hidrógeno 30 ml/min., flujo de aire 350 ml/min.
- d) Atenuación 8.
- e) Sensibilidad del electrómetro 10⁻⁹ volt/ampere.

Los ácidos cítrico y láctico se identifican y cuantifican por los tiempos de retención y altura de los picos de estándares a concentraciones conocidas, utilizando la ecuación de regresión reportada por Islas, (1984.), para ese método.

4.1.5 Amonio libre.

La determinación de los iones amonio (⁺NH₄) en el caldo de fermentación, se llevó a cabo según el método de Weatherburn (Weatherburn, 1967) el cual utiliza los reactivos de fenol-nitroprusiato y álcali-hipoclorito para dar la reacción colorida de Berthelot.

4.2 Propagación y conservación del microorganismo.

La cepa utilizada fué el Corynebacterium glutamicum ATCC 13032, la cual se resembró periódicamente en cajas Petri y tubos con agar nutritivo de la siguiente composición:

Extracto de levadura	1.0 g.
Bacto peptona	2.0 g.
Bacto dextrosa	1.0 g.
NaCl	0.9 g.
Agar-Agar	2.0 g.
Agua destilada	100.0 ml.

Los medios una vez inoculados se incubaron en un cuarto a temperatura constante a 29°C durante cuatro a cinco días.

4.3 Preparación del inóculo para la fase de adaptación.

Para obtener el inóculo de los medios en la fase de adaptación, se depositaron alrededor de 10ml. del medio sobre la superficie del agar con el microorganismo ya desarrollado; se desprende de la superficie del agar friccionado con un asa previamente esterilizada, obteniendo de esta manera una suspensión del microorganismo. La suspensión anterior se succiona suavemente con una jeringa estéril sin aguja, depositando su contenido finalmente en el medio, el cual será repartido en un siguiente paso a los diferentes matraces donde se llevará a cabo la etapa de adaptación.

4.4 Desarrollo de la fase de adaptación.

Las adaptaciones del microorganismo al medio de fermentación, se lleva a cabo en matraces Erlen Meyer de 250ml. de medio, inoculados según se indica en el párrafo anterior. Colocados sobre una plataforma de agitación rotatoria New Brunswick mod. NB100, con una agitación de 200 RPM dentro de un cuarto de temperatura controlada a 29-30°C durante 48 a 60 horas. La

composición de los medios en las etapas de adaptación y producción es la misma.

4.5 Inoculación del medio de fermentación de producción.

Para inocular los medios de producción de modo que todos ellos tuvieran aproximadamente la misma concentración celular al inicio de la fermentación (t_0), se emplea la siguiente fórmula:

$$\frac{V_i \cdot DO_{t_0} \times V_m}{DO_i \times F_d}$$

donde: V_i =Volumen de inóculo.

DO_{t_0} =Densidad óptica deseada al inicio (t_0).

V_m =Volumen del medio a inocular.

DO_i =Densidad óptica del inóculo.

F_d =Factor de dilución que afecta a DO_i .

4.6 Muestras y controles de pH.

4.6.1 En Matraz

Una fermentación en matraces EM de 250ml. con duración de alrededor de 108 horas, requería el empleo de 18 matraces todos con las mismas condiciones, sacrificando dos de ellos cada 12h. para determinar la cantidad de ácido alcali necesario para mantener el pH deseado y que había que adicionar a los matraces restantes. Los medios de los matraces sacrificados eran utilizados para realizar las determinaciones analíticas necesarias.

4.6.2 En fermentador

Se tomaron muestras de 50ml. cada 12h. o menos, sin reponer el volumen que representaban las muestras.

El ajuste de pH se efectuó de modo automático por medio del controlador del fermentador "Fermentation Design" mod. F.D. 105, utilizando H_2SO_4 y NaOH al 40% v/v.

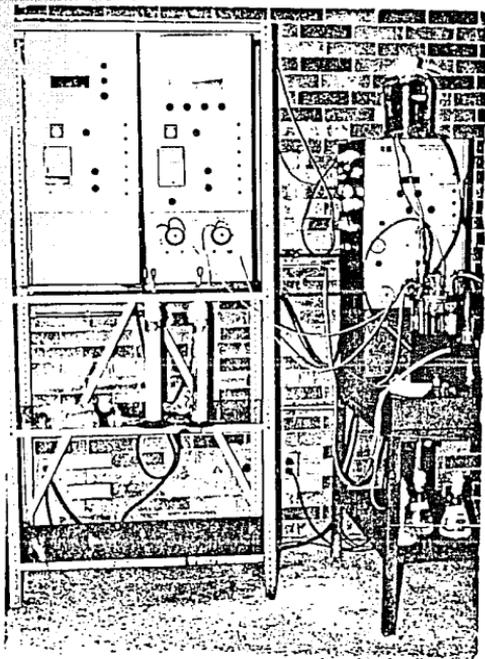


Fig. 7 Equipo de fermentación utilizado en la etapa experimental III.

4.7 Preparación de medios de fermentación.

Experimentos con jugo de limón más glucosa.

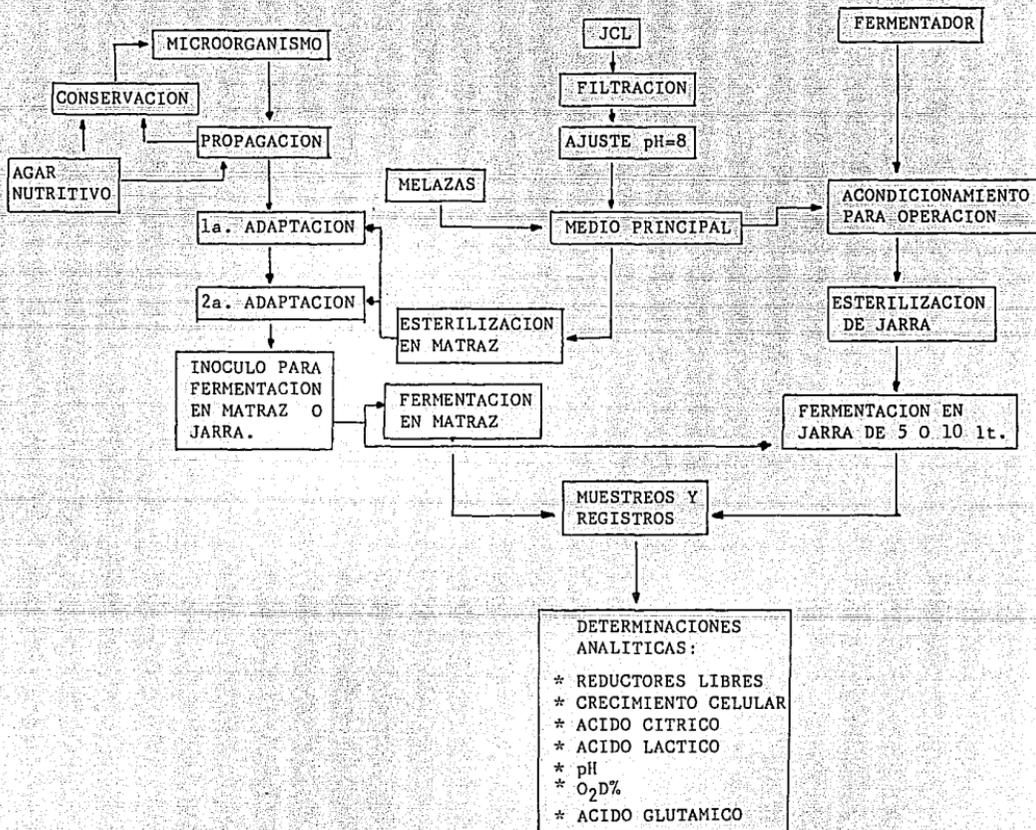
En estas fermentaciones se utilizaron "melácidas", que son concentradas por evaporación del jugo cocido de limón. Para definir la cantidad a utilizar en la composición del medio, se determina primero la concentración de ácido cítrico, que suele estar aproximadamente diez veces más concentrado que en el jugo cocido de limón. Una vez determinado el volumen se agrega agua destilada para esta dilución y se ajusta el pH a 8.5 con NaOH en lentejas. Por otro lado se prepara una solución de glucosa (dextrosa anhidra), para esterilizarse por separado al mismo tiempo que las melácidas ya diluidas y a pH:8.5; así mismo se esteriliza una solución que contiene las sales en una concentración tal, que al ser reunidos todos los componentes alcancen la concentración indicada en la formulación, adicionando agua destilada estéril para llevar al volumen final el medio. El pH final del medio después de esterilizar es de 7.5

En los experimentos en los que se utilizaron las melazas de caña, el jugo cocido de limón se usó tal como se obtiene de los ingenios limoneros. Al igual que a las melácidas, al jugo cocido de limón se le ajusta el pH a 8.5 con NaOH en lentejas, ya que se ha ajustado se utiliza el mismo para disolver las melazas de caña; lo anterior se lleva a volumen con agua destilada y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos. El pH después de esterilizar es de 7.5

4.8. Hidrólisis de melazas.

Se toma una muestra de melazas y se pesan con exactitud alrededor de 2 g, para luego aforar a 100 ml. De esta solución se toman 50 ml y se les agregan 10 ml de HCl al 50% p/v, dejándose reaccionar a temperatura ambiente durante 18 h, al cabo de las cuales se ajusta el pH a 7 con NaOH al 5% p/v y se afora nuevamente a 100 ml, quedando lista esta dilución para la determinación de reductores libres.

Figura 8: Diagrama de Métodos.



4.9. Métodos .Parte I.

4.9.1. Experimentos con jugo cocido de limón + glucosa.

Se llevaron a cabo cinco fermentaciones con el objeto de reproducir los resultados reportados (Islas, 1984) utilizando la cepa Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 y un medio con la siguiente composición:

Melácidas*	80 ml
Glucosa (Bactodextrosa)	20 g
NH ₄ OH	5 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.03 g
Biotina	2.5 mcg
Agua	1000.0 ml
pH antes de inocular = 7.0	

* Las melácidas equivalen al jugo cocido de limón concentrado 10 veces.

4.9.2.

Evaluación de melazas.

Con el objeto de definir las cantidades de melazas que debían ser agregadas al medio de fermentación en sustitución de la glucosa, se llevaron a cabo las siguientes determinaciones: reductores libres antes de hidrolizar y reductores totales después de hidrolizar; calculándose en base a lo anterior el contenido en por ciento de sacarosa equivalente.

El método de hidrólisis fué estandarizado utilizando una solución de sacarosa al 2.0% (p/v).

Cuadro 5.

EVALUACION DE MELAZAS

	<u>g/100 ml. a tratar</u>	<u>Tratamiento</u>	<u>RT g/100 ml. después de tratamiento</u>	<u>% de RL</u>
Sacarosa	2.0033	Hidrólisis	2.17	108
Melazas	3.5004	Hidrólisis	2.19	62.6
Melazas	3.5004	Ninguno	1.18	34.4

De la tabla anterior se calcula el contenido de sacarosa en las melazas:

<u>62.6%</u>	<u>melazas hidrolizadas</u>
<u>34.3%</u>	<u>melazas no hidrolizadas</u>
<u>28.3%</u>	<u>Sacarosa</u>

Cuadro 6.

Composición molar del contenido de carbono del medio primario a base de Jugo Cocido de Limón y glucosa.

<u>Componente</u>	<u>concentración (g/l)</u>	<u>moles de carbono/ litro de medio</u>
Reductores del JCL *	14.1	0.470
Cítrico del JCL	40.5	1.157
Glucosa adicionada	20.0	0.666
Total [C] =		2.293 M

* Se toma el peso molecular de la glucosa como base de cálculo

De lo anterior se deduce que cada gramo de melazas aportará 0.626 g de hexosa, o lo que es lo mismo que 3.5×10^{-3} moles de hexosa, equivalentes a 0.021 moles de carbono.

Para encontrar el equivalente de melazas al contenido de carbono del medio primario, se utilizan los datos de la tabla anterior, donde se encuentra que el contenido total de moles de carbono por litro de medio es igual a 2.293 .

Con base a lo anterior se deduce que para sustituir el aporte de carbono del medio típico, son necesarios 109.2 g de melazas.

Cuadro 7.

Composición (en g/l) de los medios de fermentación que incluyen melazas en su formulación.

COMPONENTE	F-4	F-5	F-6	F-7
Melácidas	80	-	80	-
Melazas	70	106	70	106
NH ₄ OH	-	-	5	5
KH ₂ PO ₄	-	-	0.5	0.5
K ₂ HPO ₄	-	-	0.5	0.5
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	-	-	0.0348	0.0348
MnSO ₄ · H ₂ O	-	-	0.0011	0.0011
HEXOSA EQ.	0.548	0.371	0.548	0.371
CARBONO EQ.	1.157	2.226	1.157	2.226

4.10. Métodos de la parte II.

Se utilizaron principalmente dos tipos de medios:

El primero constituido por caldo nutritivo, el cual se utilizó con la finalidad de establecer el comportamiento del microorganismo, tanto en su crecimiento, como en su producción de glutámico para tomarse estas fermentaciones como referencia y así servir de contraste para las pruebas sobre los efectos de la penicilina y del tween-60.

El segundo medio fué constituido con jugo cocido de limón y melazas, que resultó ser el mejor medio de la fase experimental anterior.

4.10.1.

Composición de los medios.

A) Experimentos con caldo nutritivo:

<u>NORMAL</u>		<u>RICO EN GLUCOSA</u>	
Bacto dextrosa	10 (g/l)	Bacto dextrosa	35 (g/l)
Extracto de levadura	10	Extracto de levadura	10
Bacto peptona	20	Bacto peptona	20
NaCl	8	NaCl	8

b) Experimentos con jugo cocido de limón y melazas:

<u>JCL/M</u>	
Jugo cocido de limón	800 ml.
Melazas de caña	70 g.
NH ₄ OH	5 g.
Agua destilada c.b.p.	1000 ml.

El pH final de todos los medios es de 7 a 7.5

Se utilizó un lote diferente del jugo cocido de limón, este jugo cocido de limón de lote diferente tiene concentraciones de ácido cítrico y de reductores libres ligeramente mayores que el lote anterior, el cual fue analizado previamente para determinar los niveles de cítrico y ajustar la composición del medio como se había establecido en los trabajos previos.

La composición equivalente aproximada es:

<u>JCL/M</u>			
Cítrico (JCL)			33 (g/l)
Azúcares reductores (JCL)			10.5
"	"	(MN)	25
"	"	(MH)	45

Donde MN=melazas normales, MH=melazas hidrolizadas.

Si el medio es esterilizado a un pH neutro, la composición aproximada según datos previos sobre el análisis del componente en particular, es la siguiente:

Cítrico (JCL)	33 (g/l)
Azúcares reductores	35

Si el medio es esterilizado al pH ácido normal (2.5) la composición aproximada según datos previos sobre el análisis del componente en particular es la siguiente:

Cítrico (JCL)	33 (g/l)
Azúcares reductores	55

En las determinaciones analíticas del medio fermentado, el valor se llega a elevar hasta 62 g/l, lo que indica que probablemente se liberan estos compuestos reductores aparte de los contenidos en las melazas.

El NH₄OH en algunas fermentaciones fué adicionado antes de ser esterilizado el medio (fermentaciones F-18 y F19, al igual que en las fermentaciones de la primera parte experimental F-0, F-1, F-2, F-3 y F-8).

4.11. Métodos experimental parte III.

4.11.1. Objetivos y composición de medios de cada fermentación.

F-20 y FJ-1

Objetivo: Determinar las condiciones de edad más adecuada para obtener un inóculo para una fermentación en fermentador, verificando las diferencias en comportamiento del crecimiento del microorganismo durante las primeras horas de fermentación matraz vs. fermentador.

Se llevó a cabo una primer adaptación a nivel matraz con una relación de volúmenes de 20/250 ml., con duración de 12 h, tomando de esta el inóculo para la segunda adaptación, de la que se tomaron muestras cada 3 h, con lo que se obtuvieron los datos para la gráfica de crecimiento (Fig. 32).

Cuadro 8 .

F-20 (1a. y 2a. adaptaciones)		FJ-1	
JCL	80%	JCL	80%
M	75 g/l	M	75 g/l
NH ₄ OH	5 g/l (DE)	NH ₄ CL	7.64 g/l
pH ₍₁₎	7.5	pH	7.5 control continuo
T°C	29	T°C	29
RPM	130 (plataforma rotatoria)	RPM	700
Matraz EM 250 ml. con 20 ml. de medio.		Vol. medio	3000 ml.
		Vol. inóculo	500 ml.
		DO inóculo	6.1
		Edad inóculo	9 hrs.
		X to =	2.4g.

FJ-2. Objetivo: Evaluar los resultados de la fermentación al utilizar tween-60 a diferentes condiciones.

Cuadro 9. Composición del medio FJ-2.

JCL	80%
M	70 g/l
NH ₄ Cl	7.6 g/l
Tween-60	10 g/l al t.
Vol. de medio	2,500 ml
Vol. de inóculo	500 ml
D.O. del inóculo	15
Edad del inóculo	13 h
Agitación	600 RPM

FJ-6. Objetivo: Evaluar los resultados de una fermentación de evolución espontánea (sin adición de ningún tipo de adyuvantes y/o medio) para tenerla como control general.

Cuadro 10. Composición del medio FJ-6.

JCL	80%
M	75 g/l
NH ₄ Cl	7.6 g/l
Vol. de medio	2,700 ml
Vol. de inóculo	340 ml
D.O. del inóculo	14.7
Edad del inóculo	14 h
Agitación	600 RPM
pH	7.5 control continuo (NaOH/HCl)

FJ-3, FJ-5, FJ-7, FJ-8, FJ-9. Objetivo: Evaluar los resultados de la fermentación al adicionar penicilina a diferentes tiempos y en diferentes regímenes de adición de nutrientes.

Se llevaron a cabo diferentes fermentaciones en condiciones similares de medio y operación variando principalmente los tiempos de adición de la penicilina en la misma concentración para todos. Así mismo, tres de las fermentaciones FJ-3, FJ-8 y FJ-9 se efectuaron con diferentes adiciones.

Las condiciones fueron las siguientes:

Cuadro 11.

	FJ-3	FJ-5	FJ-7	FJ-8	FJ-9
JCL (%)	80	80	80	80	80
M (g/l)	75	75	75	75	75
NH ₄ Cl (g/l)	7.66	7.66	7.66	7.66	7.66
Tiempo de adición de penicilina (hr)	12	9	25	11	18
Vol. medio (ml)	3,000	2,700	2,700	2,100	2,000
Vol. inóculo (ml)	500	300	300	210	500
DO inóculo	3.8	15.8	10.2	4.8	4
Edad inóculo (h)	14	16	14	24	10
Agitación (RPM)	600	600	600	400	500
Adiciones	Glucosa a las 84 h.	-	-	M+T60+NH ₄ a las 23 y 48 h.	Medio completo rico en +NH ₄ a las 18 y 116 h.

Cuadro 12. Composición de las adiciones.

FJ-3	FJ-8	FJ-9
Vol. 250ml.	1a. adición	Vol. 500 ml.
glucosa 50g.	Vol. 550 ml.	JCL 80%
	Solución salina	M 75 g/l
	Isotónica 300 ml.	NH ₄ 21.1 g/l
	Solución de nutrientes 250 ml.	
	JCL 200 ml.	
	M 12 g.	
	NH ₄ Cl 13.5 g.	
	Tween-60 1.3 g.	
	2a. Adición	
	Vol. 150 ml.	
	JCL 200 ml.	
	M 15 g.	
	NH ₄ Cl 13.5 g.	
	Tween-60 0.13 g.	

4.12 Velocidad específica de crecimiento como herramienta.

La posibilidad de contar con un modelo que explique y/o prediga la evolución de cualquier proceso, siempre ha sido algo deseable pues con ello se tienen más alternativas para manejar como mejor convenga dicho proceso. En el caso de este trabajo, al haberse logrado establecer una relación entre la concentración celular al momento del inóculo; es decir, al t_0 , y la concentración al momento de adición de la penicilina que ejerciera un efecto contundente sobre la respiración y el crecimiento del microorganismo, que a su vez condujera a la excreción del ácido glutámico al medio de fermentación, iniciándose así su detección, se concedió la importancia que tenía el saber con anterioridad el momento justo cuando se va a adicionar la penicilina. Con dicho antecedente, se estudió la utilización de un programa de computadora, que es capaz de realizar un análisis de curvas por medio de un algoritmo de análisis de varianza. Dicho programa tiene la capacidad de deducir a partir de una serie de datos, la ecuación que mejor describa el perfil de la curva, ya sea ésta, logarítmica, exponencial, potencial o lineal.

Sabiendo de antemano que la curva descrita del crecimiento de un microorganismo es de tipo logarítmico o exponencial, se sometieron al análisis de curvas los datos de crecimiento celular de varias fermentaciones realizadas con el sistema de estudio; es decir, con el ATCC 13032 y el medio de fermentación compuesto a base de jugo cocido de limón y melazas de caña.

Se sometieron los datos de crecimiento celular (g/l) en función del tiempo al análisis de regresión logarítmica, estudiando posteriormente los estimadores de ajuste como son el coeficiente de regresión, la magnitud de residuales y el radio F, resultando la gráfica de la figura 9 cuya ecuación es la siguiente:

$$y = 0.59 e^{0.399 X}$$

Donde (X) es la concentración celular en g/l e (Y) es el tiempo en horas. La forma de la ecuación deja al tiempo de adición de la penicilina (Y) como una función de la concentración de la biomasa crítica (X) susceptible a la acción de ésta a la dosis dada, con una concentración celular inicial $X_0 = 0.59$ g/l, y una velocidad específica de crecimiento $\mu = 0.399$.

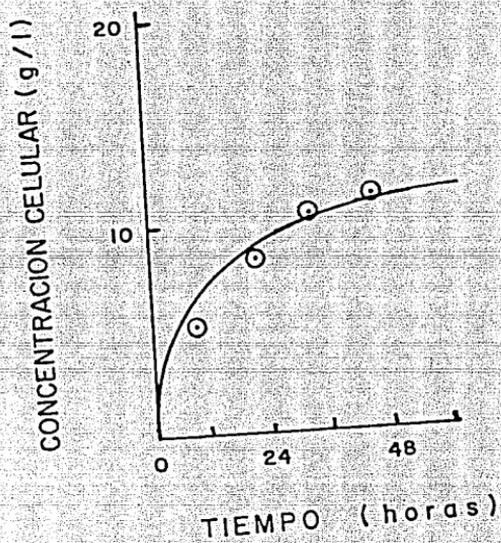


Figura 9 . Gráfica de ajuste por análisis de regresión logarítmica, para el crecimiento celular en el medio de fermentación estudiado.

A partir de este resultado, la ecuación obtenida se introdujo a otro programa que tiene la capacidad de proyectar a partir de una función dada, los valores estimados y la gráfica de la curva; de este modo, a partir por ejemplo, de la concentración celular al tiempo cero (t_0), es posible obtener todo un perfil estimado del crecimiento de una fermentación en particular.

La importancia de conocer la velocidad específica como herramienta matemática, quedó demostrada al ayudar a determinar con precisión el momento más oportuno para la adición de la penicilina, con lo que fué posible programar un esquema de control más racional durante el desarrollo de esta fermentación.

V. RESULTADOS

5.1. PARTE EXPERIMENTAL I

5.1.1 Experimentos con melácidas + glucosa.

Del conjunto de gráficas de estas fermentaciones (fig. 10) se puede ver que existe una gran variación en los perfiles de evolución de los diversos parámetros registrados de la fermentación; no obstante dicha variación, la producción de ácido glutámico siempre fué muy baja, no superando en el mejor de los casos los 4.4 g/l lo que queda bastante alejado de los resultados esperados según los antecedentes (Islas, 1984) consistentes en un título de 13.5 g/l por método de bioensayo.

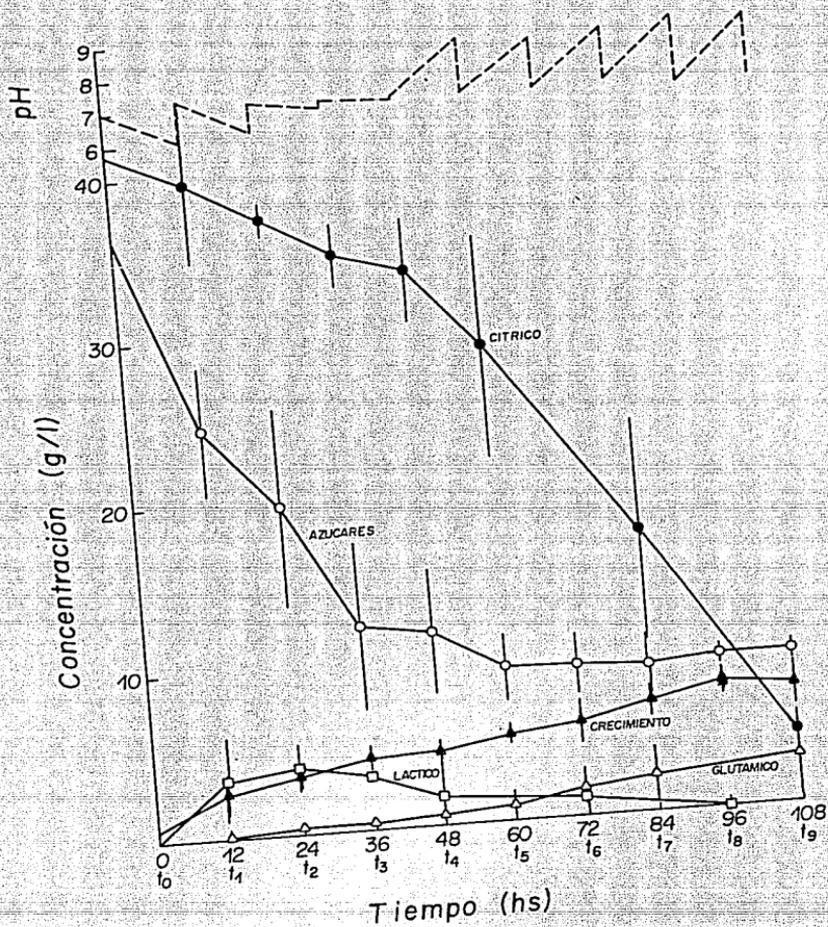


Figura 10. Promedios de las fermentaciones con glucosa y melácidas.

Estas fermentaciones presentan perfiles muy característicos y repetitivos en cada uno de los parámetros evaluados a lo largo del tiempo que ellos duran (Fig. 10). De este modo, el perfil general de la concentración de azúcares reductores que tienen una concentración inicial de 35-40 g/l decrecen rápidamente en las primeras 24 horas hasta casi un 50%; en esta etapa de la fermentación el pH tiende a acidificarse, durando esta tendencia hasta 48 horas, la cual se debe a la producción de diversos ácidos carboxílicos, principalmente el ácido láctico que es producido en buenas cantidades en esta etapa. Cuando los azúcares reductores libres han descendido a niveles cercanos a los 12 g/l entre las 36 y 48 horas, los consumos de ácidos cítrico y láctico se aceleran notablemente, cambiando la tendencia del pH hacia valores alcalinos, al tiempo que parece iniciarse la producción de ácido glutámico aunque esta última nunca alcanzó en estas fermentaciones más de 4 g/l.

En cuanto al crecimiento, puede verse que este se mantiene en aumento hasta las 96 horas que coincide con el momento en que se han agotado casi por completo las fuentes de carbono observándose que la concentración de ácido cítrico ha caído casi hasta los 8 g/l, el ácido láctico también ha desaparecido por completo; no obstante que de reductores aún queden alrededor de 10 g/l; sin embargo, sabiendo que el método analítico para la determinación de estos azúcares se basa en la presencia de extremos reductores de tipo aldehídico, se ha supuesto que tales niveles remanentes de azúcares no son otra cosa que moléculas reductoras no metabolizables por el microorganismo.

Se proponen como posibles causas de la baja producción de ácido glutámico dos principales:

Primero, que los niveles de biotina no hayan estado limitados, ya que se puede observar un crecimiento continuo a lo largo de la fermentación hasta las 96 horas, lo que puede indicar que la hubo en cantidad suficiente para sostener tal crecimiento.

Segundo, que las condiciones de aereación no hayan sido las adecuadas, pues se ha referido anteriormente, que la aparición de ácido láctico durante la fermentación es indicio de una oxigenación deficiente.

No obstante lo anterior, es notorio observar la habilidad del microorganismo para consumir el ácido cítrico del medio de fermentación proveniente de las melácidas del jugo cocido de limón.

Tercero, en base a indagaciones posteriores con los proveedores de las melácidas y del jugo cocido de limón, se encontró que existe la posibilidad de que el proceso de concentración del jugo cocido de limón para obtener las melácidas, puede afectar su calidad nutritiva. Esta indicación surgió con una observación posterior sobre el crecimiento celular, que se encontró que es mayor en los medios en que se utilizó el jugo cocido de limón como tal, sin concentrar, que en los medios en los que se utilizaron las melácidas.

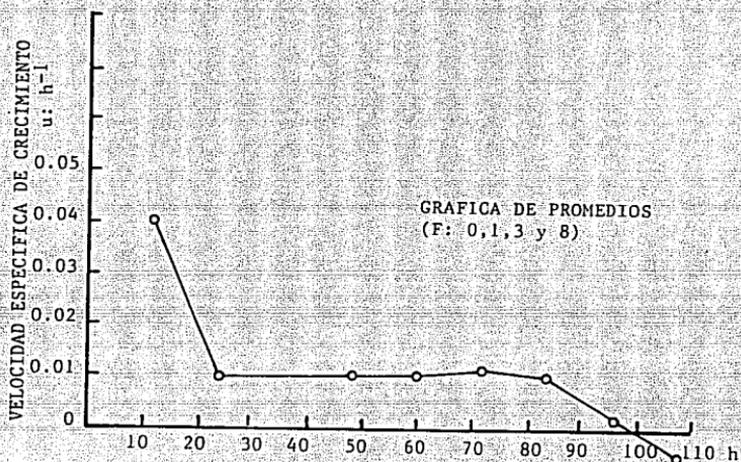


Figura 11. Velocidades específicas de crecimiento en las fermentaciones con glucosa y melácidas.

Cuadro 13. Rendimientos molares y productividades obtenidas en las fermentaciones con melácidas y glucosa.

	F-0	F-1	F-2	F-3	F-8	PROMEDIO	REPORTADA (Islas, 1984)
$Y_{x/s}$ (g Cel/mol s)	21.86	21.80	-	18.98	35.56	26.4	54.77
$Y_{p/s}$ (g Glu/mol s)	7.29	15.19	-	0.0	19.39	9.43	69.77
Productividad (g Glu/l·h)	0.02	0.04	0.028	0.0	0.04	0.026	0.141

5.1.2 Experimentos con melazas de caña.

El objetivo de estos experimentos fué el de verificar los rendimientos en la producción de ácido glutámico con una fuente de carbono de tipo industrial, de más bajo costo que la dextrosa anhidra.

Por otro lado, estos experimentos pretenden demostrar la utilidad del jugo cocido de limón al utilizarse éste combinado con las melazas.

Para utilizar las melazas se realizó una evaluación de su contenido de reductores libres y totales para poder determinar las cantidades equivalentes de hexosa y carbono, bajo la suposición de que los reductores presentes en las melazas tienen su origen en la glucosa y fructuosa de la sacarosa contenida.

En estos experimentos se tomó en consideración el efecto de la biotina presente en las melazas sobre las bacterias productoras de ácido L-glutámico, por lo que se planteó la utilización de dos diferentes tipos de adyuvantes de la secreción de glutámico: la penicilina y el tween-60, cuyos efectos serán estudiados posteriormente, utilizándose en esta segunda etapa de experimentos la penicilina en una concentración de 4 UI/ml de medio, adicionada a las 12h. de iniciada la fermentación según Nara, t. (1964).

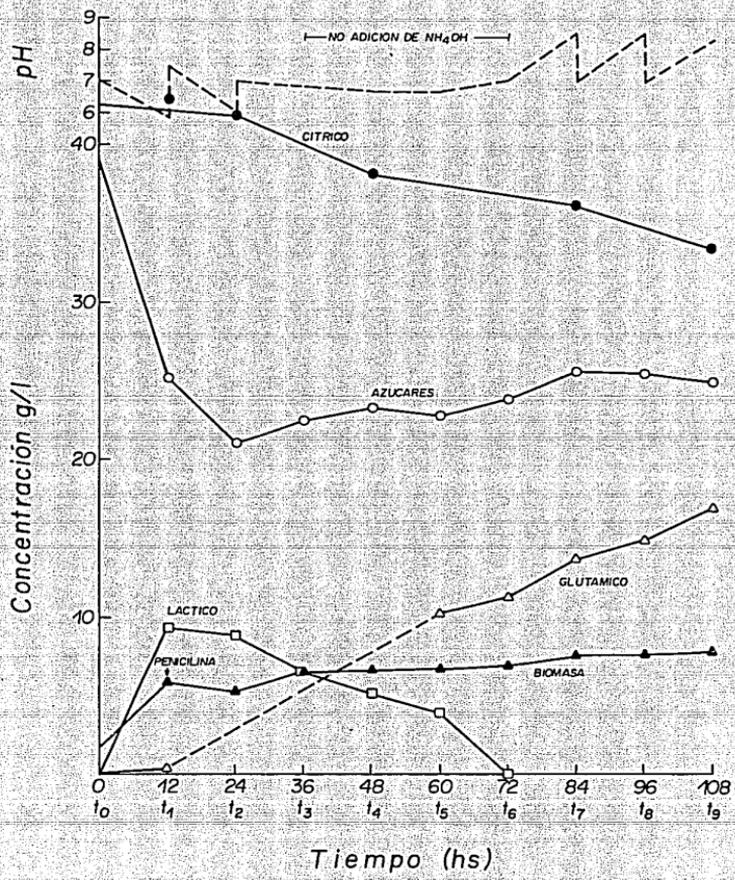


Figura 12 . Fermentación F-4: JCL y melazas de caña sin sales.

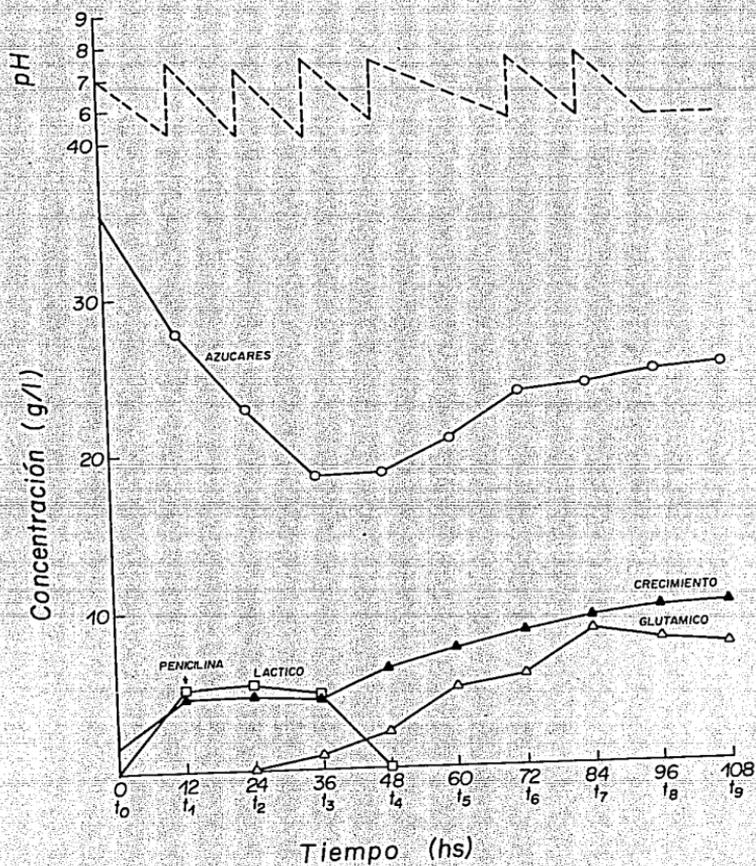


Figura 13 . Fermentación F-5: Melazas como única fuente de carbono.

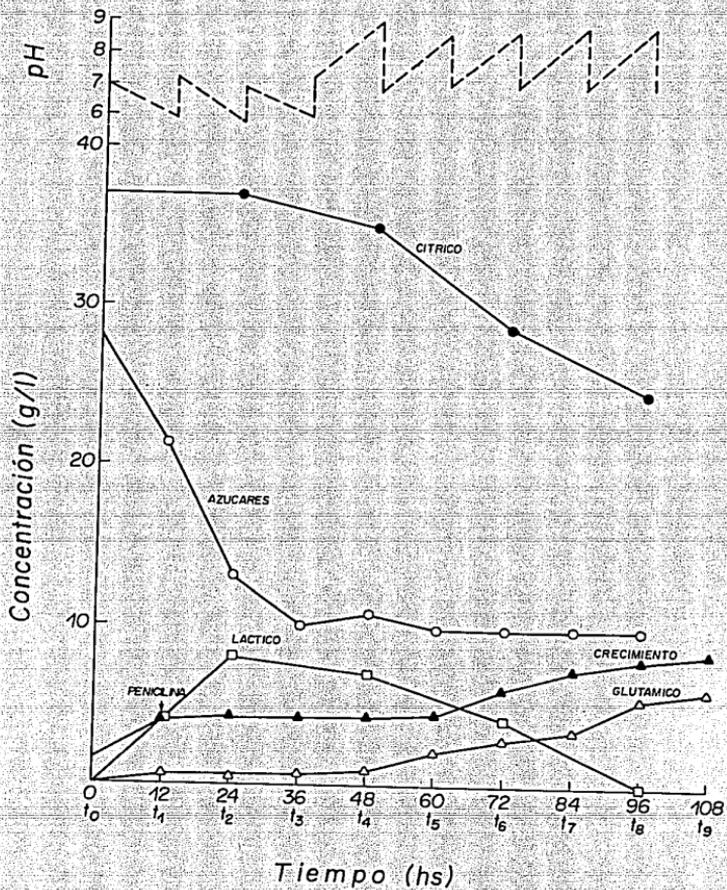


Figura 14. Fermentación F-6: JCL y melazas de caña con sales.

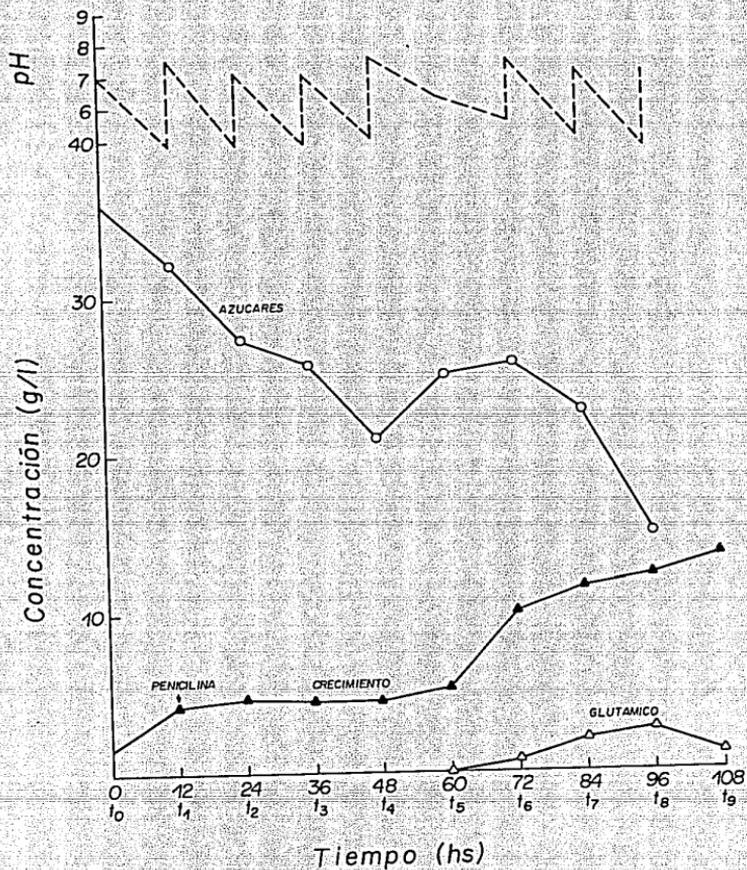


Figura 15. Fermentación F-7: Melazas como única fuente de carbono con sales.

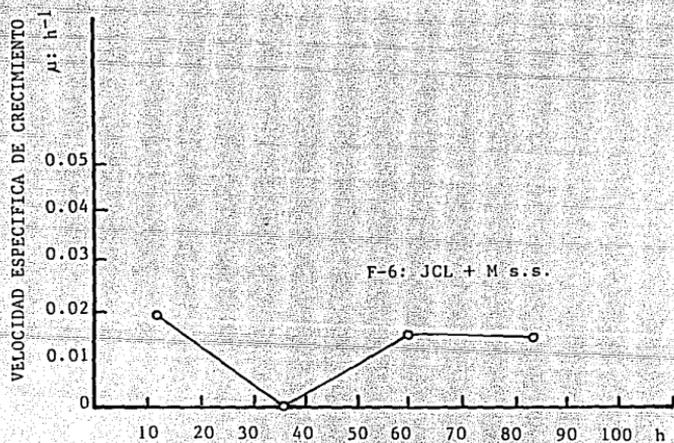
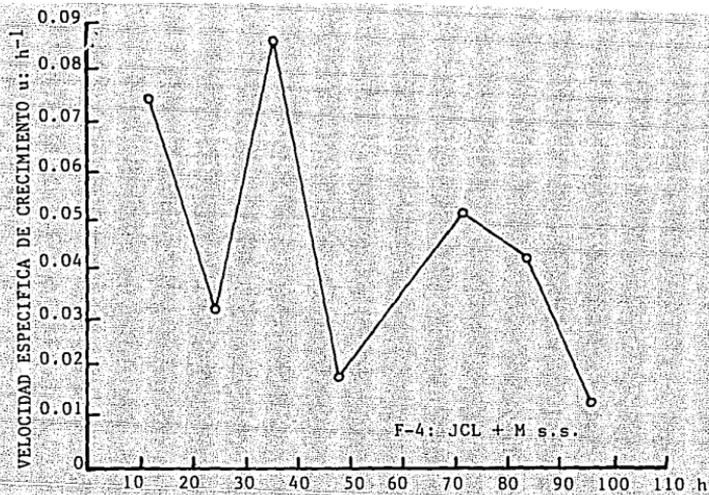


Figura 16. Velocidades específicas de crecimiento en las fermentaciones con JCL y melazas.

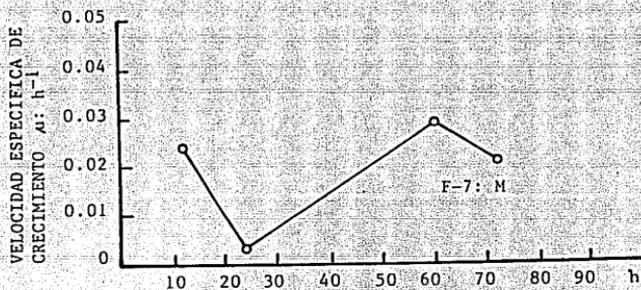
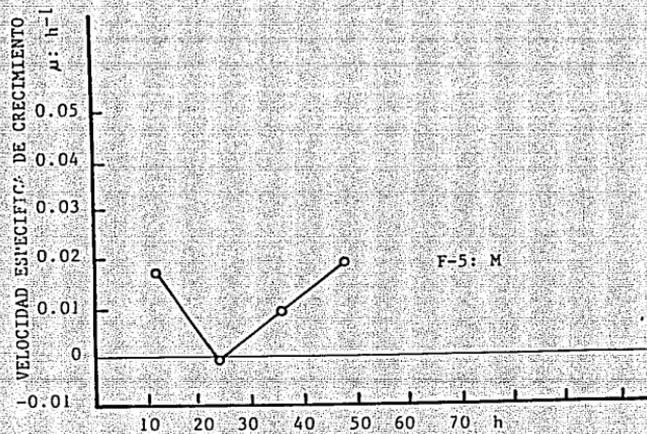


Figura 17. Velocidades específicas de crecimiento en las fermentaciones con melazas como única fuente de carbono.

Observaciones.

En estas fermentaciones con melazas, se observa por primera vez una producción de ácido glutámico por enzima de los niveles de la etapa experimental precedente.

Se observa en ellas una gran producción de ácido láctico, lo cual, como se ha mencionado anteriormente, es una indicación de una aeración deficiente (Okada et. al., 1961); sin embargo, esta no se mejoró pues no era posible modificar la agitación de la plataforma rotatoria sobre la cual eran llevadas a cabo las fermentaciones, y por otra parte, la relación de volumen del medio en el matraz ya era bastante baja (20/250 ml), pudiendo inclusive ser importante el efecto de la evaporación, por lo que el único modo de optimizar la aeración a nivel matraz era usar matraces bafleados; sin embargo, se optó por seguir con matraces lisos, esperando que la aeración fuese mejorada en una etapa posterior que se llevaría a cabo en fermentador, que es aereado y agitado de un modo mucho más eficiente.

Se puede mencionar que en las fermentaciones que se llevaron a cabo con la combinación de melazas y el jugo cocido de limón, la velocidad de consumo del ácido cítrico es mucho menor en comparación de las fermentaciones en que se utilizó dextrosa y el JCL, en las que los niveles finales de ácido cítrico (entre las 84 y las 108 h) llegaron hasta alrededor de los 5 g/l (vel. de consumo promedio = 0.398 g/l.h); mientras que en las llevadas a cabo con las melazas y el JCL, los niveles de cítrico nunca bajaron a menos de 22 g/l (vel. de consumo promedio = 0.222 g/l.h).

En la fermentación F-4 (Fig. 12), es la primera en la que se observa un comportamiento singular del perfil de consumo de azúcares reductores en la cual se verifica una disminución hasta cierto nivel, y luego, una ligera tendencia a aumentar (39--23--25 g/l) que en este caso no parece tan evidente, pero en otras como en F-19 (35--16--21 g/l) el efecto es más claro.

Este comportamiento en la curva de azúcares es observada en la mayoría de las fermentaciones en que se utilizaron melazas (F-5, F-6, F-7, F-18, F-19, FJ-3 y FJ-5).

No hay conocimiento de ninguna referencia que haga mención de tal

comportamiento; sin embargo, para explicar el incremento en la concentración de azúcares después de las 36 h TTF, se plantea con base a la habilidad del microorganismo de invertir la sacarosa contenida en las melazas, que la velocidad de inversión, fuera en un momento dado, mayor que la velocidad de consumo, lo que originaría la acumulación de los azúcares.

Para explicar la disminución de la velocidad en el consumo del ácido cítrico en los medios que utilizaron melazas, se propone que el aporte de la sacarosa invertida; es decir, la glucosa y fructosa, sustituya parcialmente la demanda de fuentes de carbono diversos, y se consuma preferencialmente la fructosa con relación al cítrico como resultado del estado metabólico del microorganismo en esa etapa de la fermentación. (Abe, 1972 y Dills, 1980).

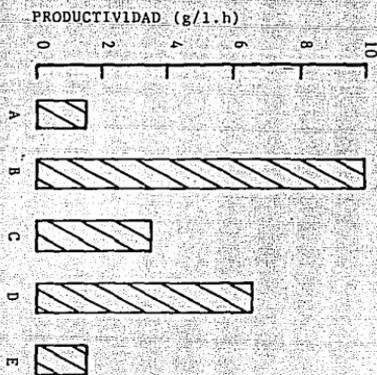
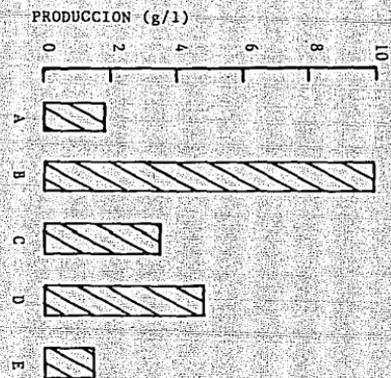
En todas las fermentaciones en que se utilizaron las melazas de caña, se adicionó penicilina-G sódica diluida de tal manera que al adicionarse al caldo de fermentación, tuviera en este una concentración de 4.0 U.I./ml. Esto se efectuó con base en los antecedentes mencionados anteriormente en los que se explica el efecto adyuvante a la excreción del ácido glutámico por la alteración de la estructura de la membrana celular (Nara, 1964 y Eveleigh, 1981). En estas primeras fermentaciones con melazas, la adición de la penicilina tuvo lugar siempre a las 12 h TTF.

Inmediatamente después de la adición de la penicilina al medio de fermentación, se observa una disminución brusca de la velocidad de crecimiento celular (Figs. 16 y 17). Dicho crecimiento se mantiene inhibido alrededor de 48 h., después de las cuales, se reanuda con velocidades diferentes entre sí en el mismo punto, comparado entre fermentaciones; y diferentes a su vez, con las velocidades que sostuvieron en los tiempos iniciales de la fermentación.

Un común denominador de estas fermentaciones fué un aumento en los rendimientos y producciones de ácido glutámico, en comparación a las realizadas con jugo cocido de limón y glucosa; más aún, entre las fermentaciones con melazas se pueden observar dos cosas importantes: primero, que las fermentaciones utilizando jugo cocido de limón más melazas (JCL+M), fueron más altas que en aquellas en donde se utilizaron solamente melazas (M) como fuente de carbono; segundo, que aún dentro de cada grupo, la producción de ácido glutámico fué mayor en aquellas fermentaciones a cuyos medios no se les adicionaron las sales del medio típico de jugo cocido de limón más glucosa (JCL+G).

La comparación entre fermentaciones con/sin melazas y con/sin sales, puede parecer un tanto arbitraria al ver que los equivalentes molares de carbono no fueron exactamente los mismos, o que en las fermentaciones con puro jugo cocido de limón no se usó la penicilina; sin embargo, se considera que, si bien, la comparación no es definitiva, sí es posible extraer algunas relaciones importantes, pues por un lado, la diferencia en equivalentes de carbono en la composición de los medios es mínima, y en todo caso, el parámetro $Y_{p/s}$ toma en cuenta este factor; y por otro lado, el hecho de no haber agregado la penicilina a los medios JCL+G, fué con base a que estos medios estaban limitados en su concentración de biotina, y por lo tanto no necesitaban la adición de ningún adyuvante debiendo excretar al medio el glutámico producido, según indican Shilo, et. al. (1962).

Una observación que puede confirmar que efectivamente los medios de JCL+G (F-0, 1, 3 y 8) estaban limitados en biotina es que sus concentraciones celulares fueron en promedio menores; mientras que en las fermentaciones con medios formulados con melazas, o sea, ricos en biotina, (F-4, 5, 6 y 7) el promedio de la concentración celular es más alto: 7.6 g/l vs. 9.9 g/l. así también, los rendimientos en biomasa son muy diferentes: $Y_{x/s}$ (JCL+G)=19.2 vs. $Y_{x/s}$ (JCL+M)=43.2 y $Y_{x/s}$ (M)=120.4 Lo anterior se esquematiza en la figura 18.



A) = JCL + G; B) = JCL + M s.s.; C) = JCL + M c.s.; D) = M s.s.; E) = M c.s.

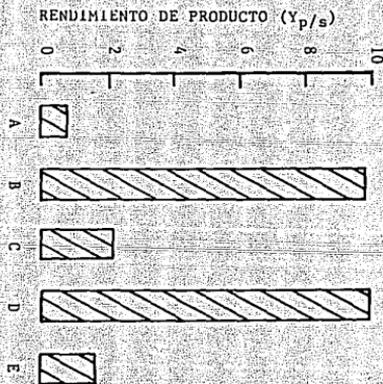
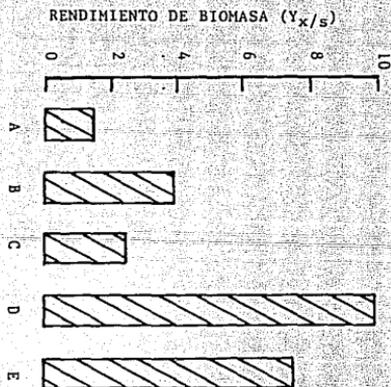


Figura 18. Gráficas comparativas de producción relativa con diferentes métodos.

5.1.3 Conclusiones de la parte experimental I.

La utilización de las melazas de caña originó mejores resultados en relación a la producción de ácido glutámico, comparada con los medios a base de jugo cocido de limón y glucosa.

Entre las diferentes composiciones probadas, se consideró que la combinación del jugo cocido de limón más melazas sin adición de sales, fué el mejor medio utilizado para obtener las producciones más altas de ácido glutámico en la primera etapa experimental.

Resultaría interesante estudiar de modo más profundo el perfil de consumo de azúcares reductores en las fermentaciones en cuyos medios se utilicen melazas, con el fin de explicar los aparentes aumentos de concentración de reductores a partir de las 48 h de iniciada la fermentación.

5.2 Experimental Parte II.

5.2.1 Antecedentes y objetivos.

Debido a la naturaleza misma de las pruebas a nivel matraz, en las que suele existir un difícil control de los parámetros de la fermentación, sobre todo en lo que se refiere al pH, agitación y aereación, se propuso establecer el efecto de alguno de los componentes del medio de fermentación y detalles del procedimiento que pudieran ser de mayor significancia sobre los rendimientos y el perfil de evolución a nivel matraz.

Por lo anterior, se tomaron como factores de interés el papel de la fuente de nitrógeno, que como se indicó anteriormente (sec. 2.2.2) existe en un óptimo en la concentración requerida, para la máxima producción de ácido glutámico. Por otra parte, se propuso estudiar el efecto de la utilización del tween-60, como sustituto de la penicilina como agente promotor de la expresión de glutámico, con base en algunos antecedentes (Ohsawa, 1968).

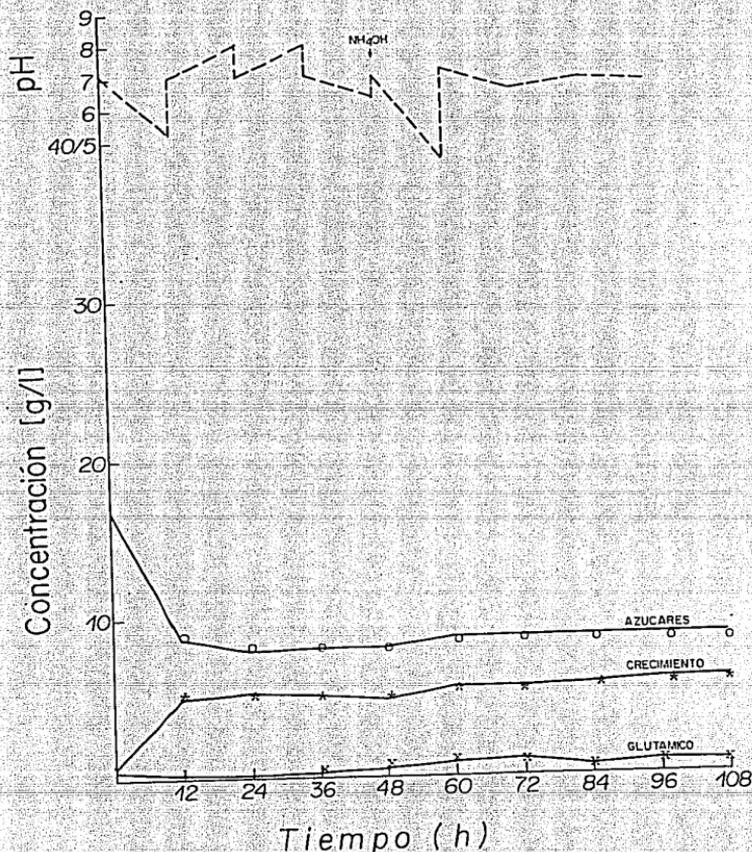


Figura 19. Fermentación F-9: Caldo nutritivo sin penicilina.

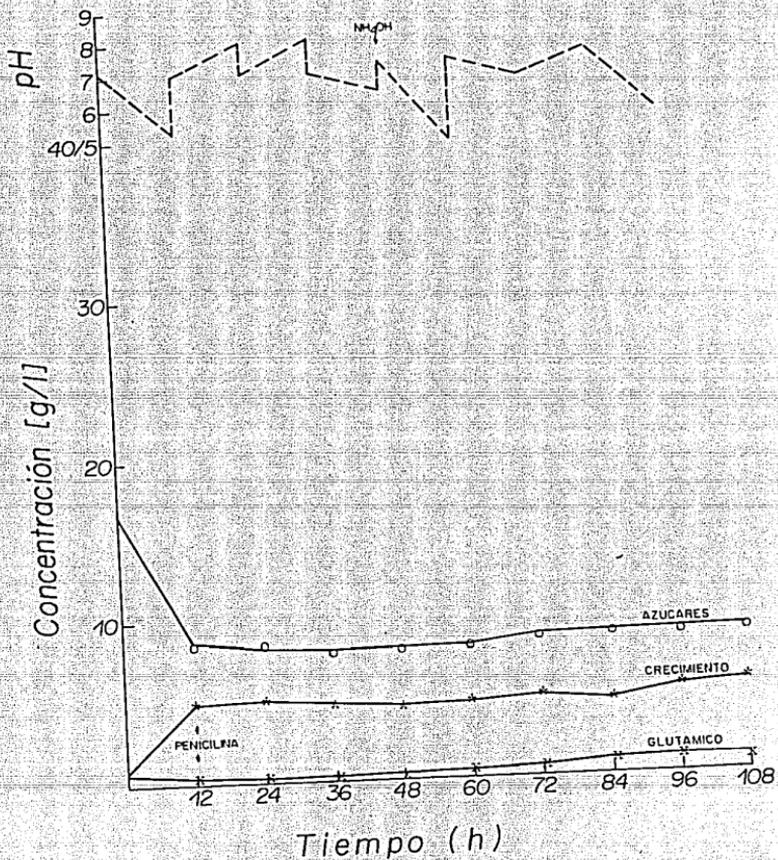


Figura 20. Fermentación F-10: Caldo nutritivo con penicilina.

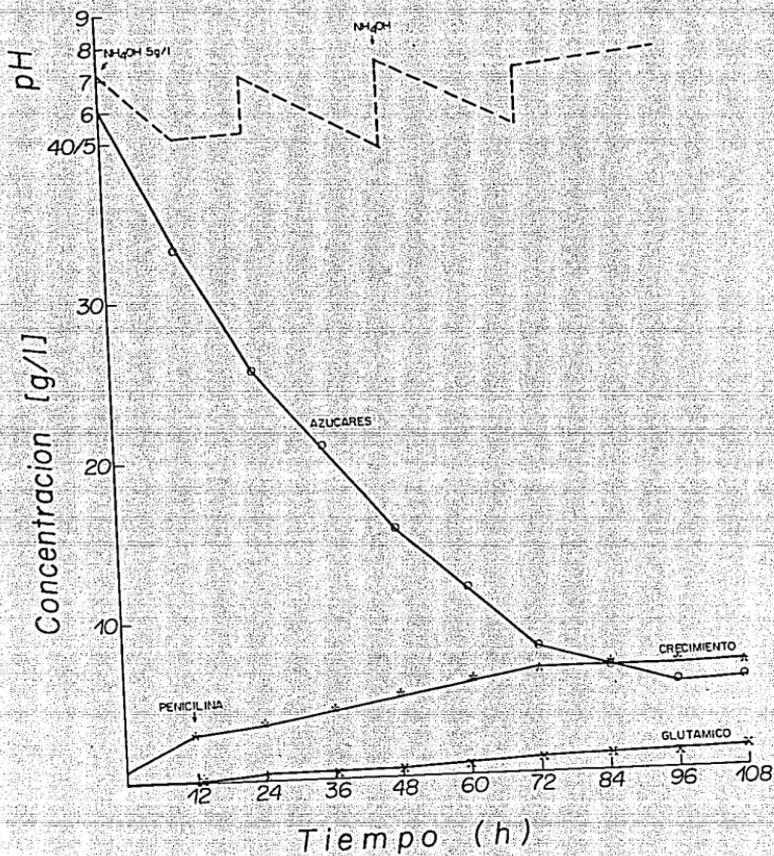


Figura 21. Fermentación F-12: Caldo nutritivo con mayor concentración de glucosa con penicilina.

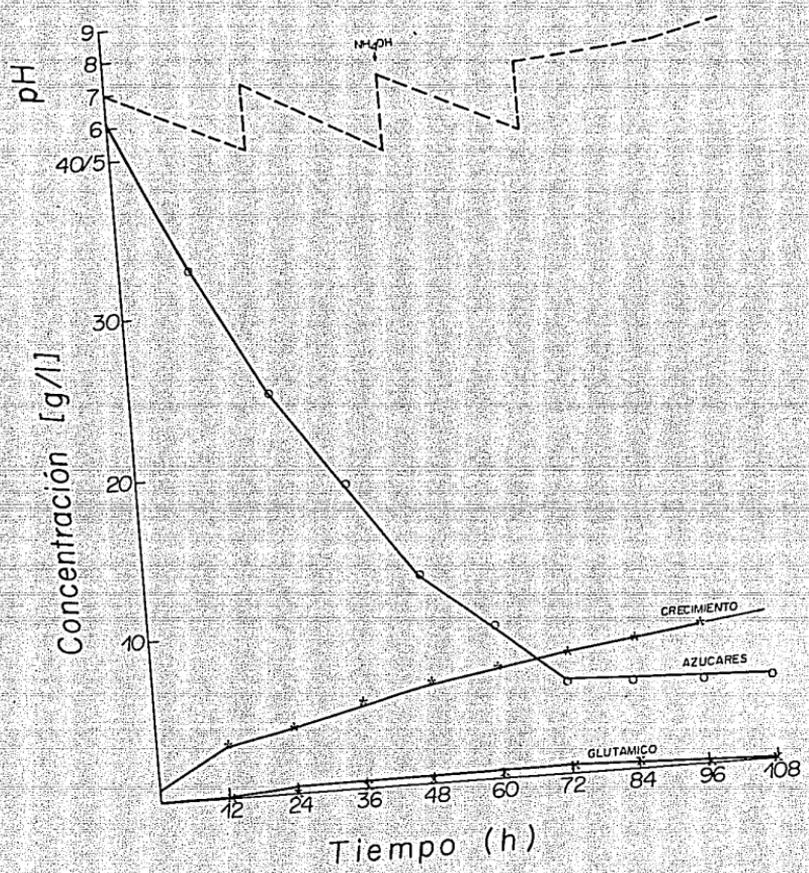


Figura 22 . Fermentación F-13: Caldo nutritivo con mayor concentración de glucosa sin penicilina.

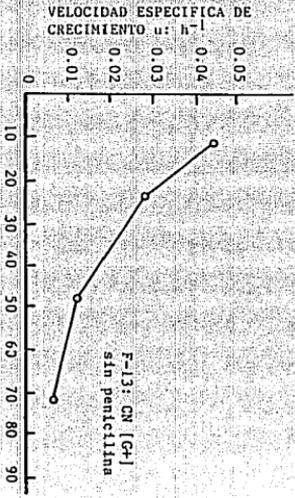
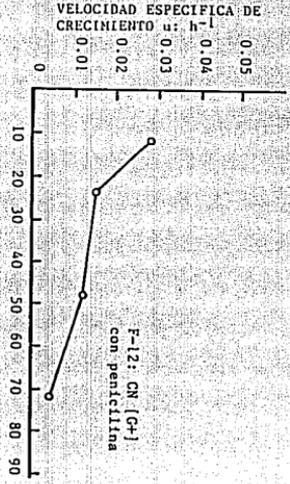
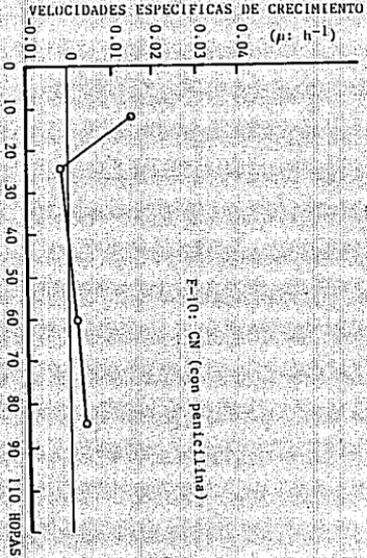
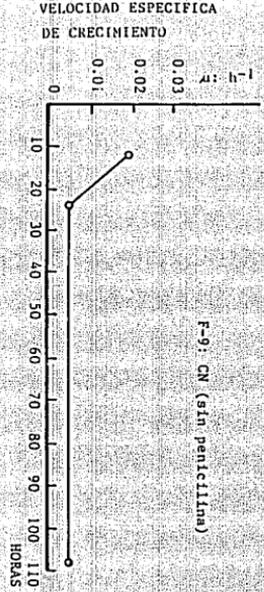


Figura 23. Velocidades específicas de crecimiento en los medios a base de caldo nutritivo.

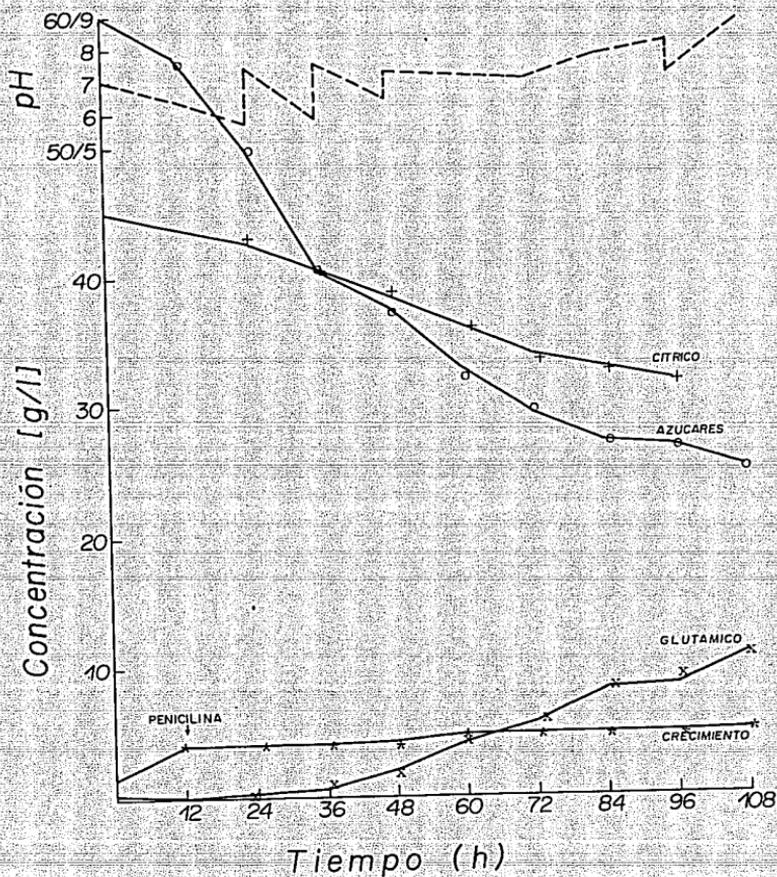


Figura 24. Fermentación F-14: JCL + melazas + NH_4OH /D.E. con penicilina.

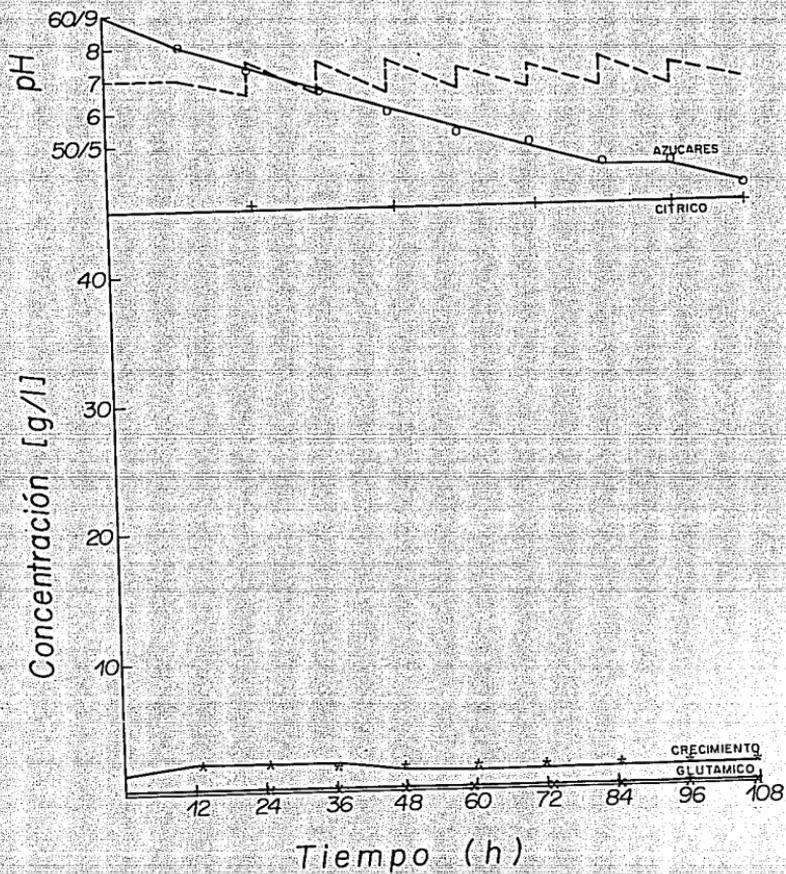


Figura 25. Fermentación F-15: JCL + melazas + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /D.E. con penicilina.

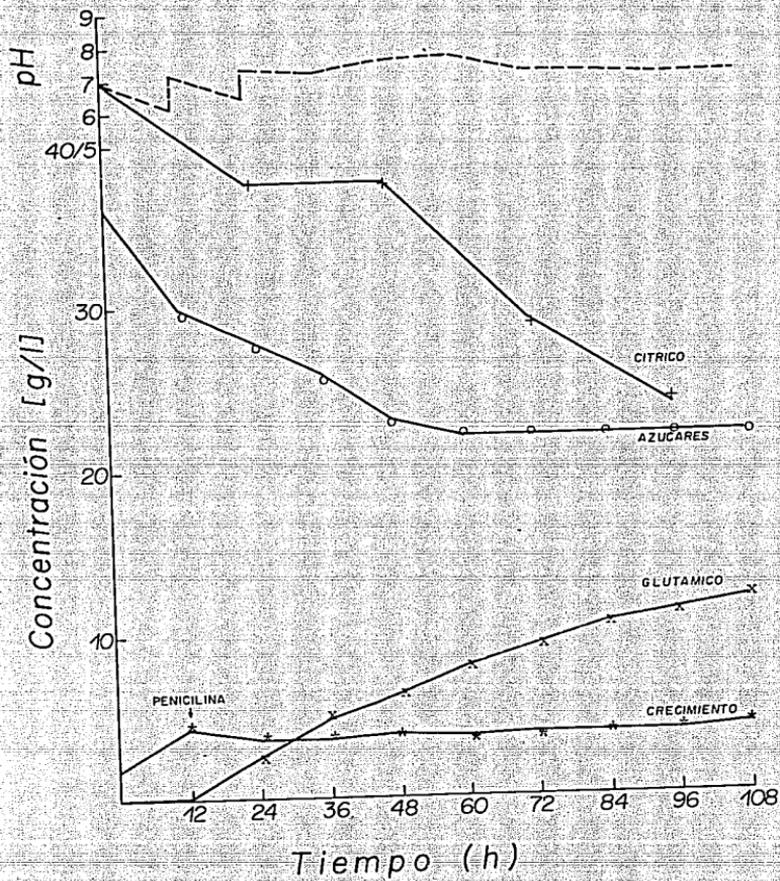


Figura 26. Fermentación F-16: JCL + melazas + $\text{NH}_4\text{OH/D.E.}$ con penicilina.

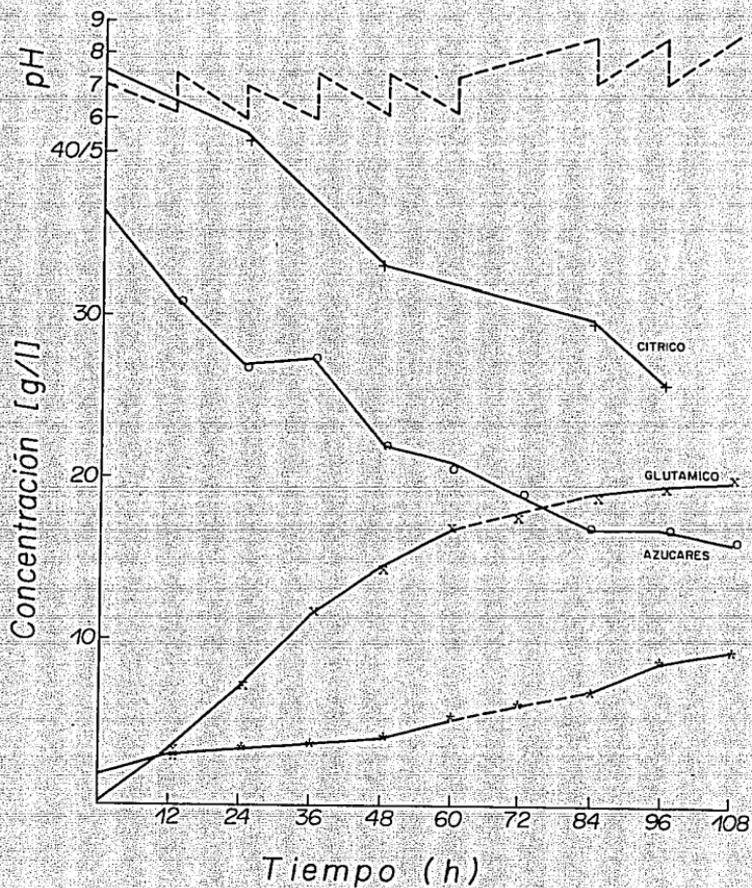


Figura 27. Fermentación F-17: JCL + melazas + $\text{NH}_4\text{OH/D.E.}$ con Tween-60.

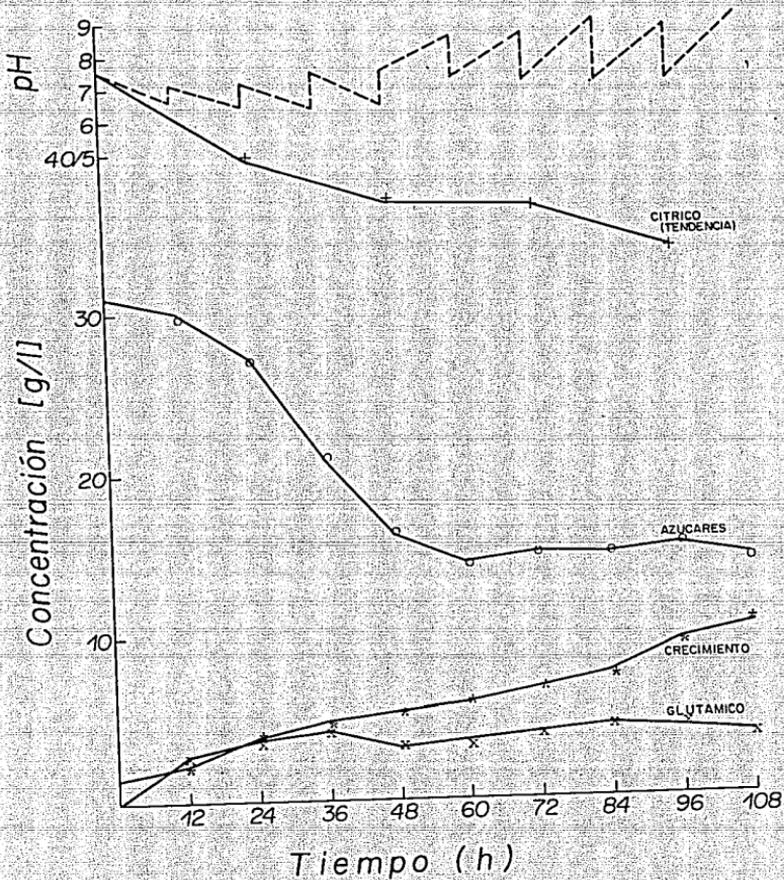


Figura 28 . Fermentación F-18: JCL + melazas + $\text{NH}_4\text{OH/A.E.}$

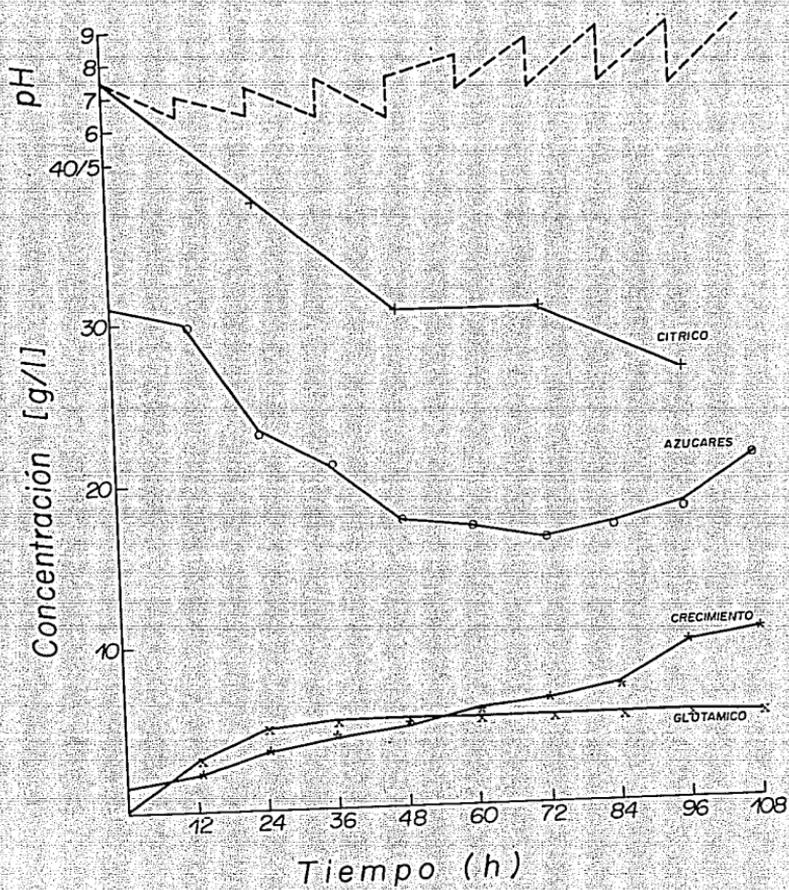


Figura 29. Fermentación F-19: JCL + melazas + $\text{NH}_4\text{OH/A.E.}$

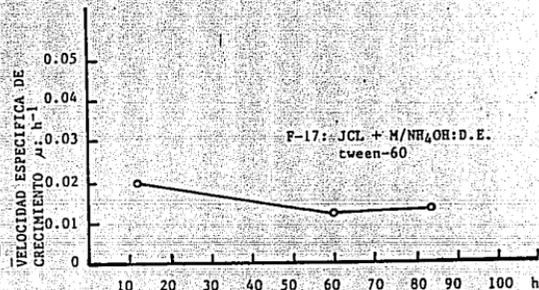
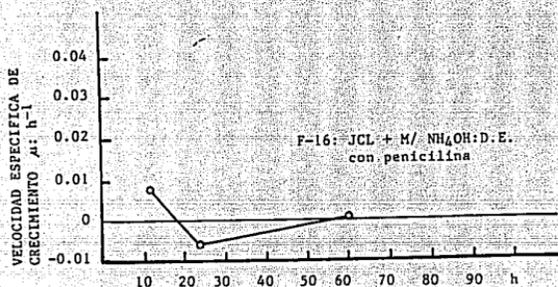


Figura 30. Velocidades específicas de crecimiento en las fermentaciones F-16 y F-17, comprobando el efecto del tween-60.

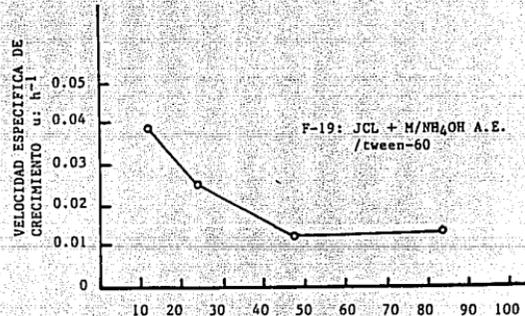
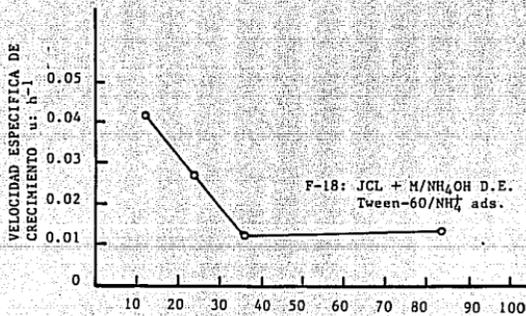


Figura 31. Velocidades específicas de crecimiento en las fermentaciones F-18 y F-19 con tween-60, con y sin adiciones de amonio.

Cuadro 14.a) Cuadro de comparación entre fermentaciones I.

FERMENTACION	CONDICIONES	AZUCARES REDUCTORES (PERFIL) g/l	CITRICO (PERFIL) g/l	CONC. CELULAR MAXIMA g/l	GLUTAMICO PRODUCCION MAXIMA g/l	OBSERVACION
F-0	-JCL/GLUC. 20g/l	36	41	7.6	3	1
F-1	-pH: AJUST. A.E.					
F-2	-NH ₄ OH : A.E.					
F-3	- NH ₄ : c/12 h.					
F-8	-CON SALES -CON BIOTINA	9	17			
F-4	-JCL/M-75g/l	39	42	7.8	17	2
	-pH : AJUST. A.E.					
	-SIN SALES					
	-SIN BIOTINA					
	-NH ₄ OH : D.E.					
	-+ NH ₄ : 48 h.	23	33			
	-PENICILINA	25				
F-6	-JCL/M-47g/l	38	37	13	6	3
	-pH : AJUST. D.E.					
	-CON SALES					
	-SIN BIOTINA					
	-NH ₄ OH : D.E.					
	-+ NH ₄ : c/12 h	13	25			
	-PENICILINA					

ESTA TESIS
NO PUEDE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Cuadro 14.b) Cuadro de comparación entre fermentaciones II.

FERMENTACION	CONDICIONES	AZUCARES REDUCTORES (PERFIL) g/l	CITRICO (PERFIL) g/l	CONC. CELULAR MAXIMA g/l	GLUTAMICO PRODUCCION MAXIMA g/l	OBSERVACION
F-5	- M. 100%-106g/l - pH : AJUST. D.E. - NH ₄ OH : NO - NH ₄ : c/12 h. - SIN SALES - SIN BIOTINA - PENICILINA	35 25 18	-	10	8.4	4
F-7	- M. 100%-108g/l - pH : AJUST. D.E. - NH ₄ OH : NO - NH ₄ : c/12 h. - CON SALES - SIN BIOTINA - PENICILINA	36 26 21 15	-	13	3.0	4
F-9	- CN-GLUC. 10g/l - NH ₄ OH : NO - NH ₄ : NO - SIN PENICILINA	17 9	-	5.9	0.5	5
F-10	- CN-GLUC. 10g/l - NH ₄ OH : NO - NH ₄ : NO - CON PENICILINA	17 9	-	5.6	1.0	5

Cuadro 14.c) Cuadro de comparación entre fermentaciones III.

FERMENTACION	CONDICIONES	AZUCARES REDUCTORES (PERFIL) g/l	CITRICO (PERFIL) g/l	CONC. CELULAR MAXIMA g/l	GLUTAMICO PRODUCCION MAXIMA g/l	OBSERVACION
F-12	- CH-GLUC. 35g/l - NH ₄ OH : D.E. - *NH ₄ : NO - CON PENICILINA	42 ↘ 5	- -	7.0	2.7	5
F-13	- CH-GLUC. 35g/l - NH ₄ OH : D.E. - *NH ₄ : NO - SIN PENICILINA	42 ↘ 5	- -	8.7	0.5	5
F-14	- JCL/M-70g/l - pH : AJUST. D.E. - NH ₄ OH : D.E. - *NH ₄ : NO - PENICILINA	60 ↘ 25	45 ↘ 32	5.2	11.0	6
F-15	- JCL/M-70g/l - pH : AJUST. D.E. - (NH ₄) ₂ SO ₄ : D.E. - *NH ₄ : NO - PENICILINA	60 ↘ 47	45 — 45	2.2	0	6

Cuadro 14.d) Cuadro de comparación entre fermentaciones IV.

FERMENTACION	CONDICIONES	AZUCARES REDUCTORES (PERFIL) g/l	CITRICO (PERFIL) g/l	CONC. CELULAR MAXIMA g/l	GLUTAMICO PRODUCCION MAXIMA g/l	OBSERVACION
F-16	- JCL/M-70g/l - pH : AJUST. A.E. - NH ₄ OH : D.E. - *NH ₄ : NO - PENICILINA	35 ↙ 22	45 ↙ 24	4:1	12	7
F-17	- JCL/M-70g/l - pH : AJUST. A.E. - NH ₄ OH : D.E. - *NH ₄ : NO - TWEEN-60	35 ↙ 16	45 ↙ 24	9.5	20	7
F-18	- JCL/M-70g/l - pH : AJUST. A.E. - NH ₄ OH : A.E. - *NH ₄ : c/24 h. - TWEEN-60	35 ↙ 14 → 15	45 ↙ 34	10.2	4.4	8
F-19	- JCL/M-70g/l - pH : AJUST. A.E. - NH ₄ OH : A.E. - *NH ₄ : NO - TWEEN-60	35 ↙ 16 → 21	45 ↙ 27	10.3	5.4	8

5.2.2. Análisis de resultados de la parte experimental II.

Observaciones referentes al cuadro de comparación entre fermentaciones (ver cuadro 14. I-IV.)

Obs. 1]. En las fermentaciones F-0, 1, 3 y 8, se obtuvo una producción de ácido glutámico mínima, con un crecimiento muy variable. Corresponden a la etapa experimental I discutida anteriormente.

Obs. 2]. En F-4, casi no hay consumo de ácido cítrico (9.0 g/l), presentando una producción de glutámico aceptable (17.0 g/l); comparando contra la fermentación F-6, parece haber un efecto positivo de la adición de amonio a las 48 h. TTF.

Obs. 3]. En F-6, a pesar de que el medio contenía menor cantidad de melazas (47.0 g/l) ocurre un hidrólisis ácida de la sacarosa, que aumenta la concentración inicial de reductores; al comparar contra F-4, parece haber un efecto negativo de las sales presentes. No queda claro el efecto de la adición de amonio.

Obs. 4]. Entre las fermentaciones F-5 y F-7, la única diferencia consistió en la adición de sales a F-7, y en su eliminación en F-5. Nuevamente se observa el efecto negativo de las sales sobre la producción de glutámico.

Obs. 5]. Comparando las fermentaciones cuyo medio de fermentación fué el caldo nutritivo (F-9, 10, 12 y 13), se puede observar que en general la producción de glutámico fué mínima; sin embargo, en las fermentaciones en las que se adicionó penicilina (F-10 y 12) hubo mayores producciones de glutámico. Se observa también un efecto muy claro sobre la interrupción del crecimiento en las fermentaciones en las que los reductores están en baja concentración.

Obs. 6]. En F-14 y en F-15, se observa primeramente una concentración de reductores muy elevada al tiempo cero (60.0 g/l), lo cual es debido a que se esterilizó el medio a un pH ácido, lo que provocó la hidrólisis de los disacáridos.

Al comparar las fermentaciones F-14 y F-15 cuya única diferencia fué la naturaleza de la fuente de amonio (NH_4OH vs. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) se observa un efecto rotundamente negativo del sulfato de amonio en todo el perfil de la fermentación F-15, no encontrándose explicación para este efecto.

Obs. 7]. En las fermentaciones F-16 y F-17, la única diferencia radicó en el uso del tween-60 en F-17, contra las fermentaciones en que se adicionó la penicilina (F-16, 14 ó 4), se pudo observar que hubo una mayor producción de glutámico en la que se utilizó el tween-60; sin embargo, hay un mayor crecimiento con menor rendimiento. El tween-60 se adicionó al tiempo cero, en una concentración de 0.1%.

Obs. 8]. En F-18 y F-19, se puede observar primeramente una caída en la producción de glutámico comparada con las que se habían obtenido anteriormente; lo cual pudo ser debido al hecho de que el NH_4OH fué adicionado antes de esterilizar el medio (E.A.E.), como sucedía en las fermentaciones de la primera parte experimental (F-0, 1, 3 y 8); lo que pudiera haber ocasionado que el amonio se evaporara o que se asociara químicamente, o ambas cosas tal que, se hiciera menos disponible para el microorganismo; aunque se puede observar también un buen crecimiento, el cual puede estar relacionado con la presencia del tween-60.

Por otra parte, aunque en la fermentación F-18 en comparación con la F-19, tuvo adiciones de NH_4^+ c/12 h, parece que no hubo una diferencia significativa en el efecto sobre la producción (4.4 vs. 5.4 g/l, respectivamente). Aún así, resulta menor la producción en la que se hicieron estas adiciones, lo que no se explica, pues se hubiera esperado un efecto positivo de estas adiciones sobre la producción.

Obs. 9]. Las curvas de consumo de reductores que "bajan y vuelven a su bir", suceden principalmente en las fermentaciones con melazas (F-4, 5, 7, 18 y 19). En F-6 sí pasa pero el efecto es mínimo y no muy claro; en F-15, no hubo crecimiento ni producción por efecto del sulfato de amonio y en F-16 y F-17 aunque también contenían melazas los medios, no se observa el efecto tal vez debido a las altas producciones de glutámico que sostuvieron no dando lugar a la acumulación momentánea de reductores que se observa en las demás.

5.2.3. Discusión.

Con base en las diferencias observadas entre las fermentaciones en las que el NH_4OH se adicionó antes o después de esterilizar el medio (cuadro 15) parece haber un efecto muy significativo del momento en el que es adicionado el NH_4OH al medio, en relación a la esterilización.

Se podría establecer lo siguiente: Si se adiciona el NH_4OH antes de esterilizar, entonces habrá una baja producción de glutámico, pero no necesariamente bajo crecimiento.

Lo anterior parece indicar que la esterilización provoca la evaporación de amonio y no otra fuente de nitrógeno, pues al haber crecimiento celular y no producción de glutámico es indicativo de una limitación de nitrógeno no orgánico, pues la presencia de este es fundamental para la biosíntesis del glutámico (Sec. 2.2.2.)

Con respecto a la utilización del tween-60, parece que el incremento en la producción observado, se debe principalmente a que se le permitió al microorganismo alcanzar niveles altos de crecimiento, sumando a esto, la acción tensoactiva del tween, que promovió la excreción del glutámico. Sin embargo, este aumento en la producción no representa necesariamente un incremento en el rendimiento del microorganismo, pues comparando las productividades específicas puede verse que aún es más eficiente la fermentación usando la penicilina ($Y_{p/x}(\text{F-17:tween}) = 2.1$ Vs. $Y_{p/x}(\text{F-16:penicilina}) = 2.9$).

Por otra parte, no puede decirse que quede claro el efecto de la adición de amonio c/12 h., lo cual puede ser debido a la cantidad adicionada. No habiéndose cuantificado el amonio residual, resulta difícil asegurar algo; aunque bien, pudo haber sido en exceso inhibiendo la producción de glutámico, según se explicó en la sec. 2.2.2.

Con respecto a la hidrólisis ácida de la sacarosa de las melazas que sucedió en las fermentaciones F-14 y F-15, no tomando en cuenta a esta última por el efecto causado aparentemente por el sulfato de amonio; se puede ver que hay una regular producción en la F-14 (10.8 g/l) con un crecimiento de 5.2 g/l, comparando contra la F-16 en la que hay menor crecimiento (4.1 g/l) pero una mejor producción (12.0 g/l). En estos casos, la diferencia reside en

la concentración inicial de azúcares reductores. Se podría decir que con un exceso de azúcares en el tiempo cero habrá un mayor crecimiento y una menor producción. En lo anterior podría verse un posible efecto negativo sobre la producción de glutámico de un exceso de azúcares al tiempo cero por una posible represión por exceso de sustrato.

Cuadro 15. Relaciones entre el momento de adición del NH_4OH y la producción de las fermentaciones.

NH_4OH A.E.		NH_4OH D.E.	
FERMENTACION (MEDIO)	GLUTAMICO g/l	FERMENTACION (MEDIO)	GLUTAMICO g/l
F-0 (m-G)	1.8	F-4 (J-M)	17.0
F-1 (m-G)	4.4	F-6 (J-M)	6.0
F-2 (m-G)	3.0	F-14 (J-M)	11.0
F-3 (m-G)	0.0	F-16 (J-M)	12.0
F-8 (m-G)	4.3	F-17 (J-M)	20.0
F-18 (J-M)	4.4		
F-19 (J-M)	5.4		

Donde: A.E.= Antes de esterilizar el medio; D.E.= Después de esterilizar el medio; J= Jugo cocido de limón; G= Glucosa; M= Melazas; m= melácidas

5.2.4. Conclusiones de la parte experimental II.

En general el análisis de resultados obtenidos en esta segunda parte, conduce a proponer que el mejor medio y procedimiento de fermentación con fines de trabajo a nivel de 10.0 lt. es:

JCL	800 ml
Melazas de caña	70 g
pH A.E.	7

NH ₄ OH	5 g D.E.
Agua cbp.	1000 ml
pH final	7.5
Penicilina	4.0 U.I./ml a las 12 h TTF
control de pH	Continuo NaOH/HCl

Quedando por estudiarse el patrón de adiciones de amonio con base en la técnica de determinación de amonio, remarcando la importancia de utilizar el amonio convenientemente, de modo que satisfaga los requerimientos del microorganismo, tanto en el tipo de la fuente, como en su concentración.

Se propuso con base a lo anterior, llevar a cabo determinaciones de los niveles de amonio para compararlo con respecto a alguna referencia e intentar adecuarla en base a este análisis. Así mismo, probar diferentes tiempos de adición de la penicilina, pues este es un factor determinante sobre la producción de glutámico.

La hidrólisis de los disacáridos y otras reacciones, probablemente involucradas, pueden ser motivo de estudios posteriores, pues estas suceden fácilmente si el jugo cocido de limón es esterilizado junto con las melazas de caña dejando el pH sin ajuste en valores ácidos.

La actividad de invertasa de las enzimas del microorganismo, no parece estar relacionada a algún factor específico; sin embargo, es posible que la acumulación de reductores esté asociada inversamente con la producción de glutámico, pues cuando se ha observado dicha acumulación, ha sido solo cuando hubo bajas producciones de glutámico; mientras que cuando hubo altas producciones de glutámico no se presentó el efecto de acumulación de reductores.

5.3. Experimental Parte III.

5.3.1. Antecedentes y Objetivos.

Habiendo desarrollado una perspectiva más clara del comportamiento de la fermentación se propuso realizar los siguientes experimentos a nivel de fermentador de 5 lt. para definir los perfiles de evolución de la fermentación en un sistema más controlado en todos los parámetros de operación como lo es un fermentador instrumentado.

Por lo anterior, en esta etapa se propuso evaluar de un modo particular los siguientes objetivos:

- 1- Evaluar las condiciones de edad más adecuadas para un inóculo al fermentador.
- 2- Desarrollar un control o referencia llevando a cabo fermentaciones sin adición de ningún tipo de adyuvantes o nutrientes.
- 3- Probar el efecto del tween-60 a diferentes tiempos de iniciada la fermentación en las circunstancias particulares de una jarra de fermentación.
- 4- Evaluar los resultados sobre la fermentación al adicionar la penicilina a diferentes tiempos después de iniciada la fermentación.
- 5- Verificar los efectos producidos al realizar adiciones del medio completo, melazas y/o jugo cocido de limón en modo de un cultivo alimentado.
- 6- Verificar la necesidad de la adición de amonio definiendo los perfiles de consumo de este compuesto.
- 7- Estudiar los patrones de aereación, agitación, pH, adiciones de adyuvantes y/o nutrientes y condiciones de inóculo en relación a la producción de ácido glutámico.

Todo lo anterior se propuso con la finalidad de establecer algunos lineamientos fundamentales dentro del proceso de fermentación que asegurara una producción adecuada dentro de las condiciones de estudio en un posible escalamiento.

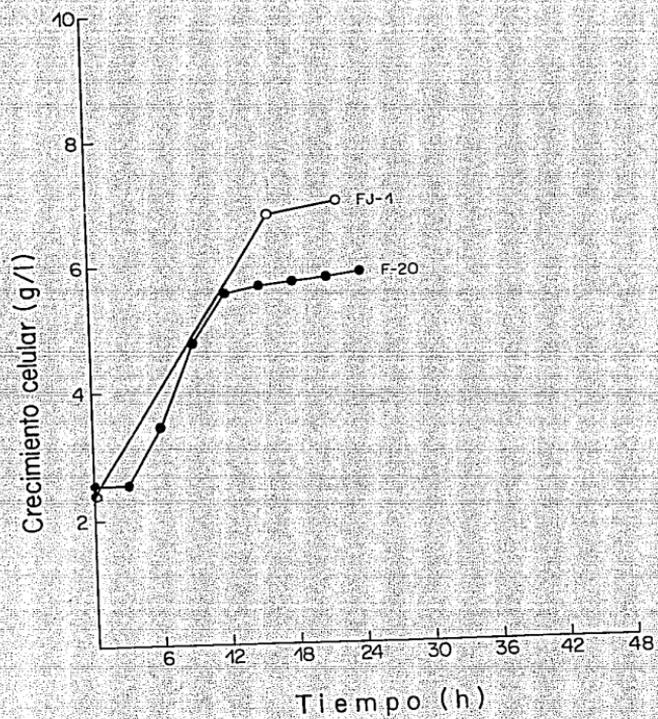


Figura 32. Efecto sobre el crecimiento celular al llevarse a cabo la fermentación en matraz (F-20) ó en fermentador (FJ-1), durante las primeras horas de fermentación.

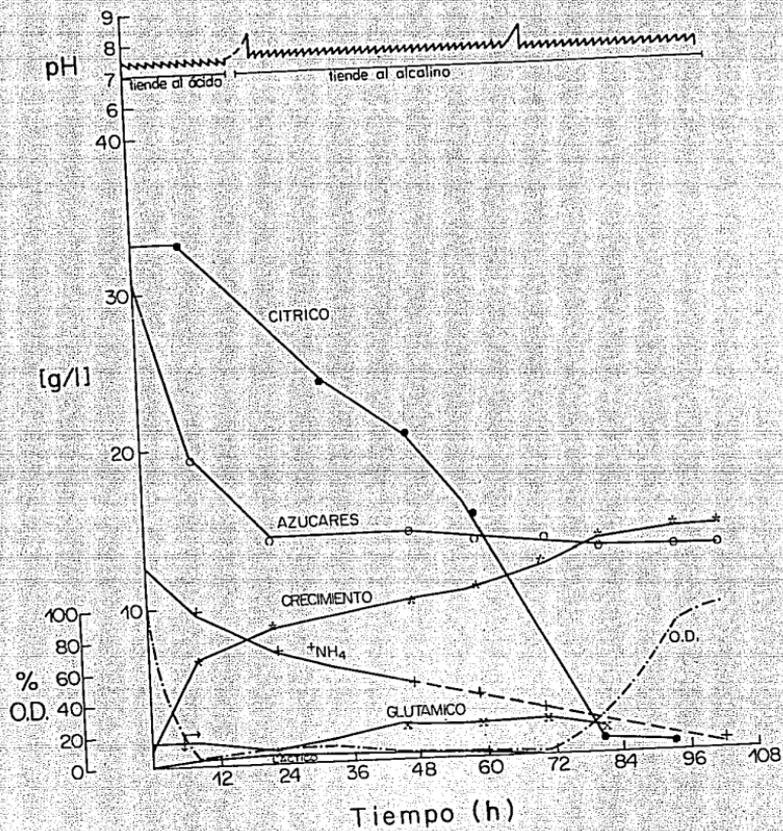


Figura 33. Fermentación FJ-6: Sin adición de penicilina.

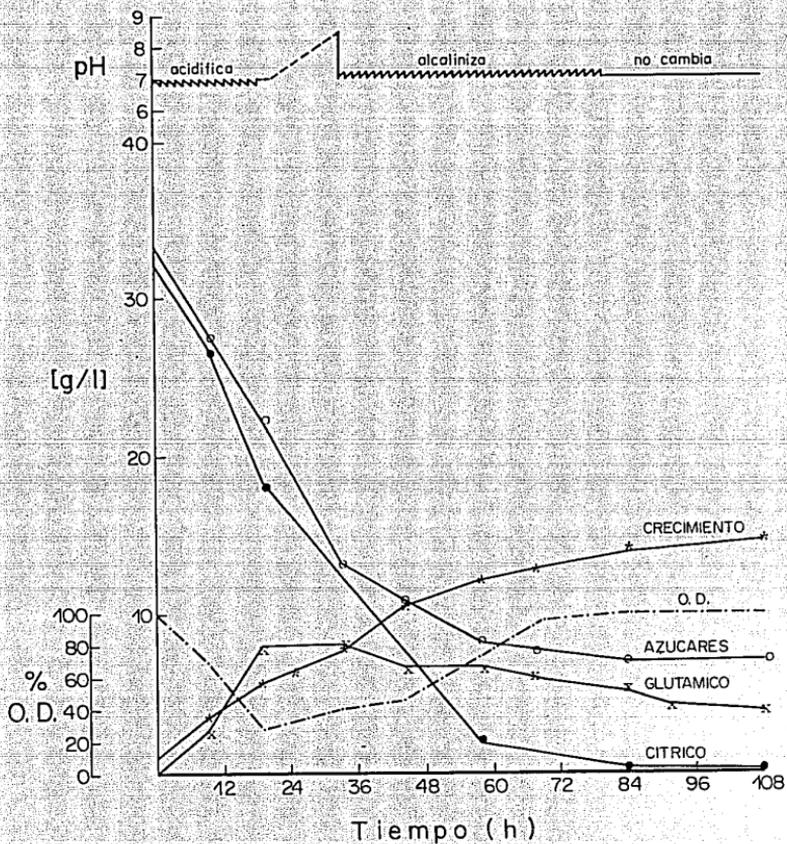


Figura 34. Fermentación FJ-2: Adición de tween-60-1% al to.

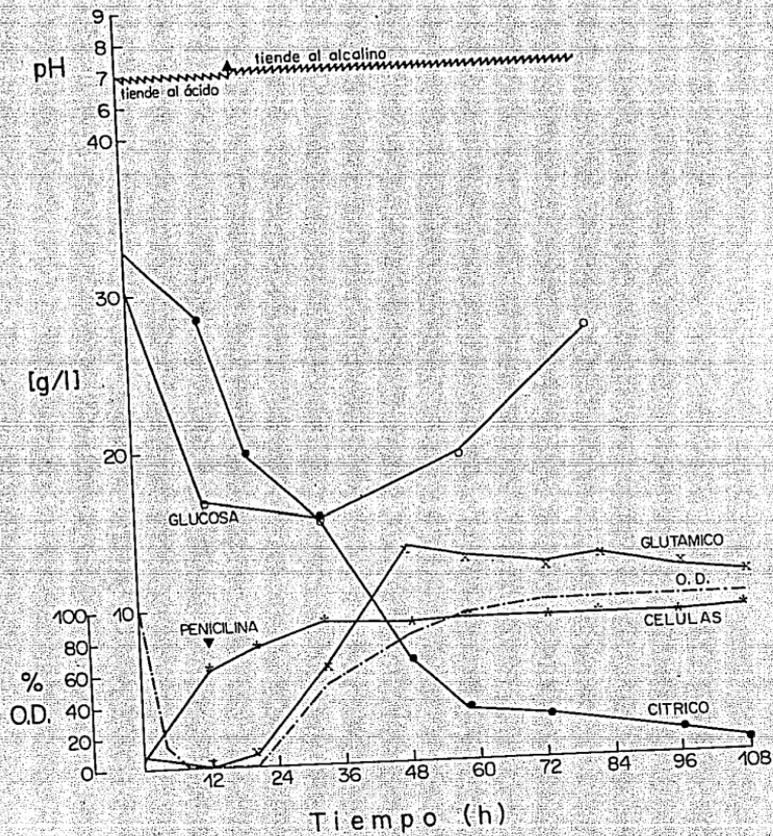


Figura 35. Fermentación FJ-3: Adición de penicilina a las 12h.

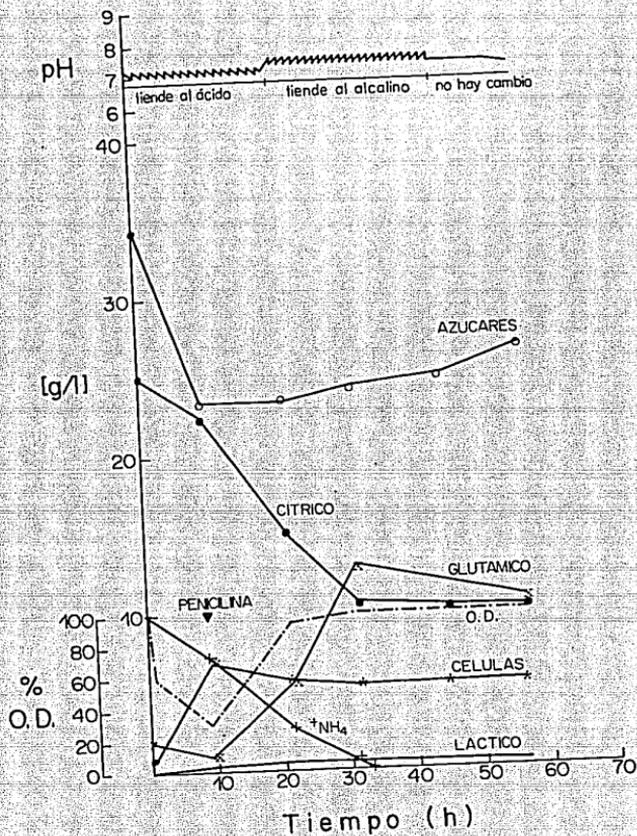


Figura 36 . Fermentación FJ-5: Adición de penicilina a las 9h.

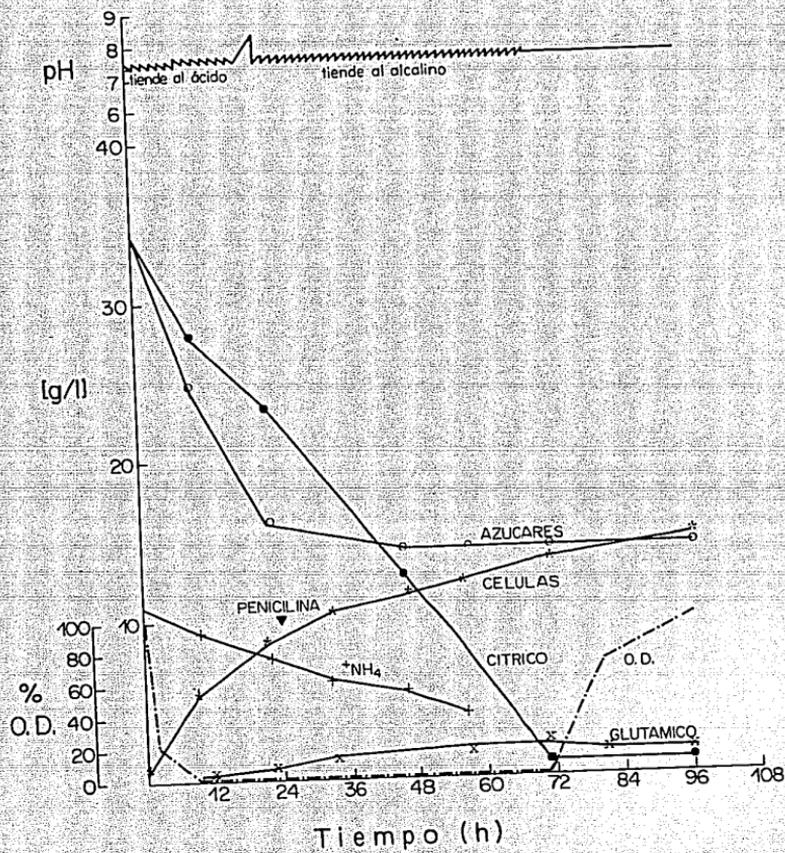


Figura 37 Fermentación FJ-7: Adición de penicilina a las 24h.

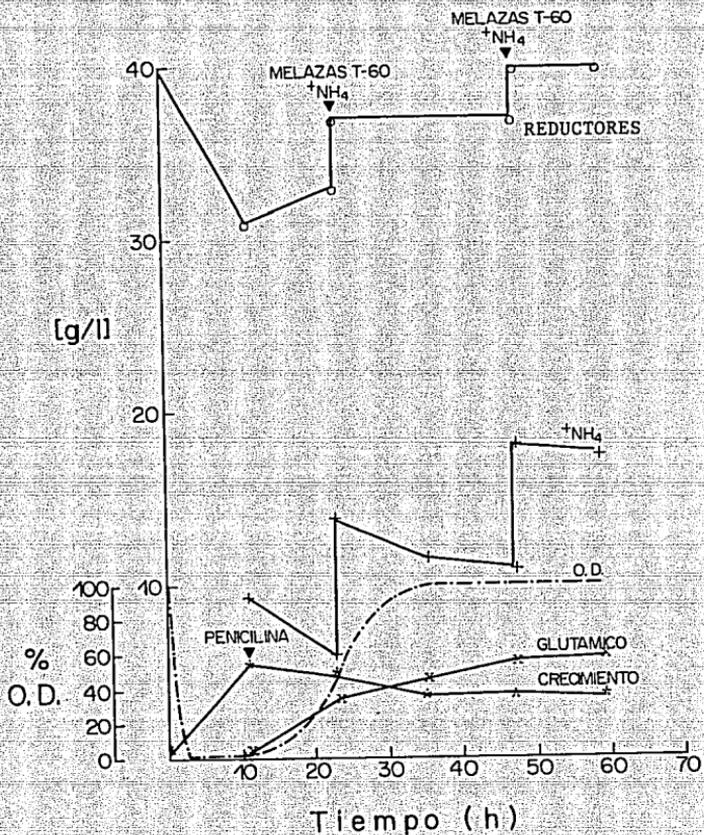


Figura 38. Fermentación FJ-8: Adición de penicilina a las 11h., con adiciones del medio conteniendo amonio y tween-60.

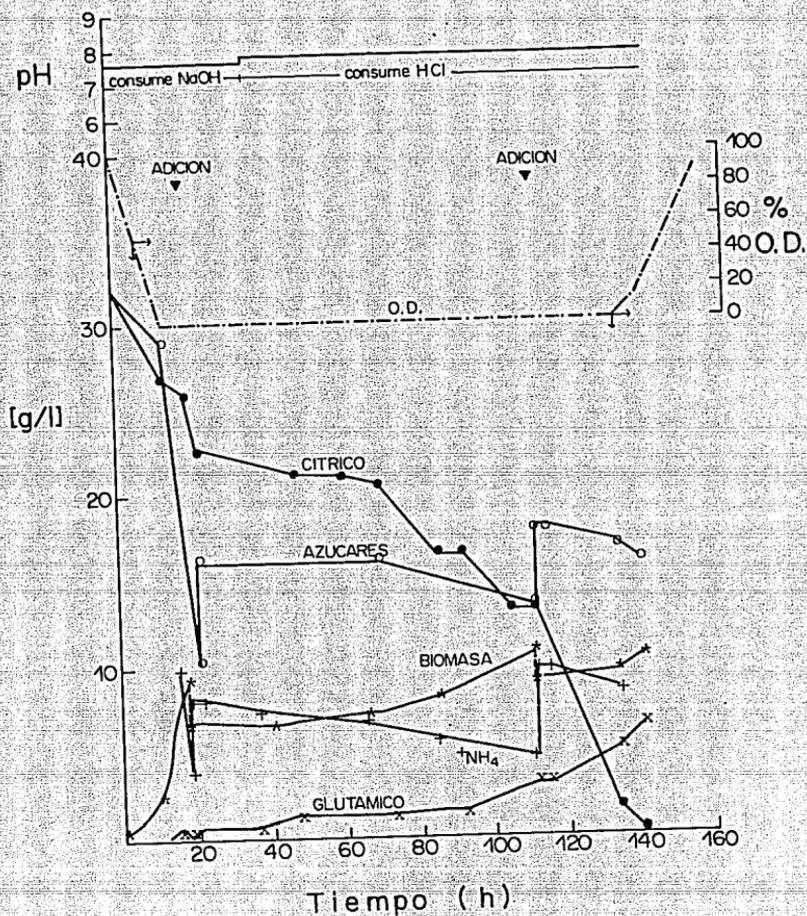


Figura 39. Fermentación FJ-9: Adición de penicilina a las 18h.

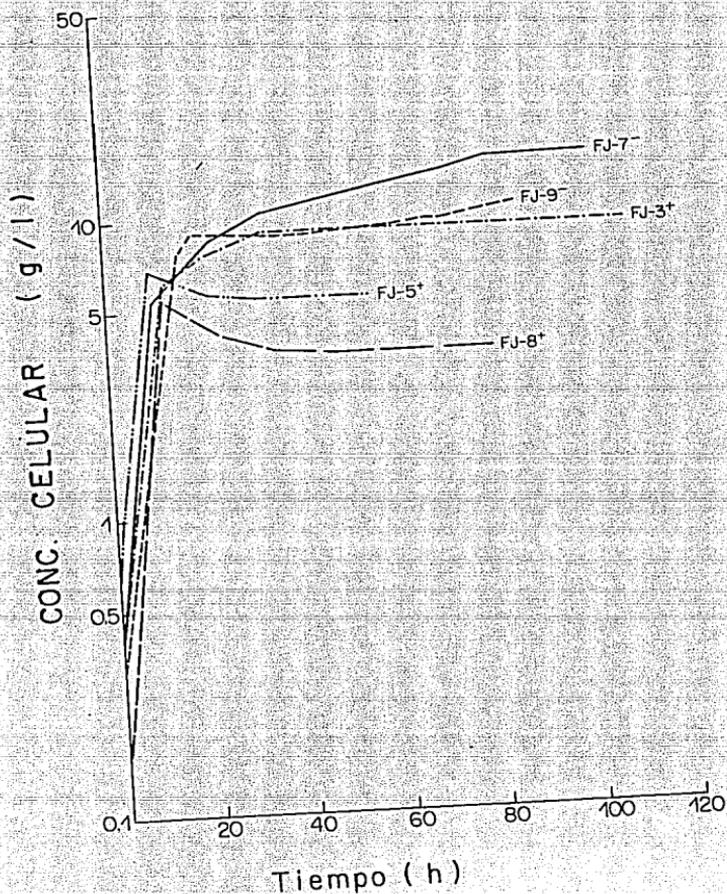


Figura 40 . Cinéticas de crecimiento de las fermentaciones en las que se agregó penicilina a diferentes tiempos. El signo (+)= producción significativa; el (-)= poca o ninguna producción de glutámico.

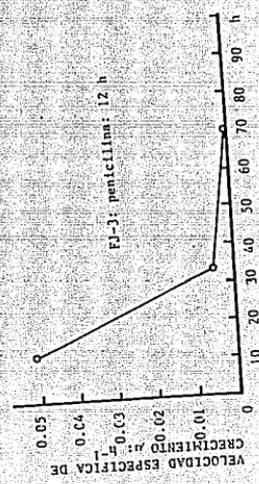
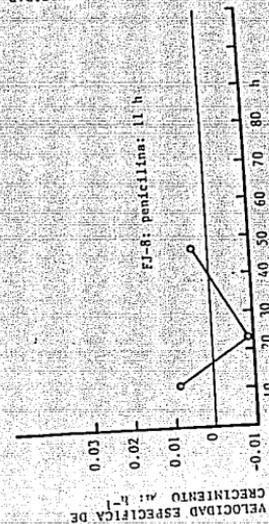
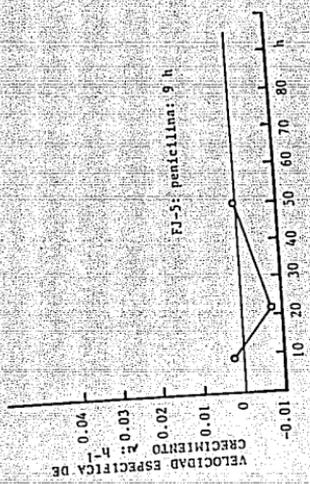
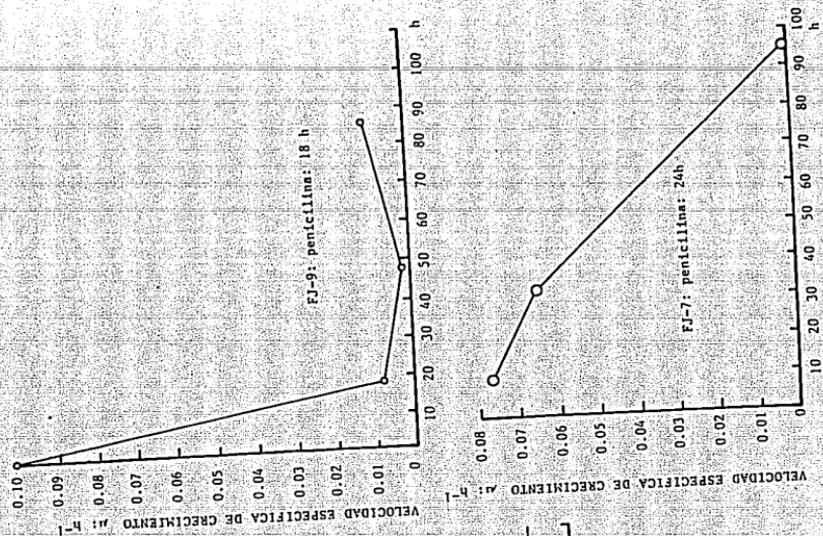


Figura 41. Velocidades específicas de crecimiento de las fermentaciones en las que se agregó penicilina a diferentes tiempos.

Observaciones.

Sobre la gráfica de fermentación F-20 y FJ-1 (fig. 32). Se puede ver que en F-20, aún siendo una segunda adaptación, se presenta una fase lag de alrededor de 3 h, con una fase exponencial de aproximadamente 9 h y una velocidad específica de crecimiento a las 3 h de 0.04 h^{-1} y a las 12 h de 0.02 h^{-1} ; mientras que a las 16h de fermentación en fermentador se presenta una velocidad específica de crecimiento de 0.016 h^{-1} , notándose una clara diferencia en la concentración celular alcanzada a las 24 h de fermentación, habiendo tenido concentraciones iniciales casi iguales o incluso ligeramente menor en el fermentador, en éste último el desarrollo celular es mayor que en el matraz (7.05 vs. 5.85 g/l, respectivamente).

A partir del resultado de esta fermentación se concluyó que el inóculo para una fermentación debe ser tomado de una segunda adaptación con una edad entre 6 y 12 h, pues es el tiempo que presenta las mayores velocidades de crecimiento, pretendiendo con esto incrementar la productividad del proceso.

En la fermentación FJ-6, se obtuvo una productividad muy baja ($0.05\text{-}g/l \cdot h$) con una producción de glutámico apenas notable; sin embargo, el incremento en biomasa se mantiene en aumento hasta el fin de la fuente de carbono y nitrógeno al rededor de las 18 h TTF, cuando es observado el inicio de una disminución en la demanda respiratoria por el incremento en el porcentaje de O_2 disuelto, habiendo alcanzado una concentración celular máxima de 14.0 g/l.

Un detalle interesante resulta de observar comparativamente los consumos de reductores y cítrico: La fuente primaria de carbono son los azúcares reductores, pero al descender la concentración de éstos hasta ciertos niveles, se desencadena el inicio de la utilización del cítrico presente.

En la fermentación FJ-2, se obtuvo una producción de glutámico aceptable (8.1 g/l a las 24 h TTF); sin embargo, se presentaron serios problemas por la aparición de espuma causada por el tween en una alta concentración (10.0 g/l). Aunque en esta fermentación no se determinaron los niveles residuales de amonio, parece probable, con base en los resultados de otras fermentaciones como la FJ-5, que el amonio haya sido el factor limitante.

El tween-60 resulta efectivo como promotor de la excreción de glutámico en concentraciones de 10 g/l; sin embargo, estas concentraciones representan un riesgo para la evolución de la fermentación por la producción de espuma que éste provoca. Muy probablemente en esta fermentación (FJ-2) el $^+NH_4$ haya sido el factor limitante, debido principalmente a que aún teniendo suficiente cantidad de fuente de carbono a las 24-36 h, la producción de ácido glutámico súbitamente se detiene, y no solo eso, sino que posteriormente desciende como señal de la necesidad del microorganismo de una fuente de nitrógeno que sostenga el crecimiento de modo continuo hasta el final de la fermentación.

Probablemente la principal causa de que el microorganismo haya dejado de respirar relativamente temprano (36-48 h), se deba al mismo agotamiento de la fuente de nitrógeno.

Observaciones particulares a cada fermentación. (Ver tabla comparativa Etapa III, Cuadro 16).

FJ-7 No produjo glutámico. Se propone que fué causado por haberse agregado la penicilina demasiado tarde (24-25 h), teniendo velocidades de consumo de azúcares, cítrico y amonio lentas.

FJ-3 Presenta buena producción de glutámico por un efecto positivo de la penicilina agregada a un buen tiempo (12 h); el efecto de la adición de la glucosa es irrelevante por haberse adicionado demasiado tarde, cuando seguramente el amonio ya se había agotado.

FJ-5 Presenta una buena producción de glutámico por el mismo efecto anterior, pero aquí sí es posible observar claramente el efecto sobre la producción de glutámico al momento en que se termina el amonio (30-34 h).

FJ-8 presenta una producción baja pero relativamente positiva coincidiendo con el detalle del efecto de la penicilina agregada a un tiempo oportuno; sin embargo, aquí no se ve un efecto claro sobre el comportamiento del microorganismo por el exceso de amonio, pero muy probablemente los bajos rendimientos se deban precisamente a estos excesos.

Cuadro 16. Tabla comparativa entre fermentaciones en la etapa experimental III.

Fermentación	Producción máx. Glutámico (g/l)	Productividad (g/l·h)	Adyuvante Tipo	Tiempo adición (h)	$x t_o$ (g/l)	$x t_a$ (g/l)	**	Efecto del Adyuvante
FJ-5	13.0	0.41	▷	9	0.67	7.0	15	+
FJ-3	13.7	0.29	▷	12	0.43	7.4	24	+
FJ-2	8.1	0.25	○	t_o (10g/l)	0.97	---	24	+
FJ-8	5.6	0.12	▷	11	0.17	7.4	24	+
FJ-10	0.6	0.02	○	25 y 54 (0.5g/l)	0.46	6.6	140	-
FJ-7	2.0	0.04	▷	25	0.4	9.0	72	-
FJ-6	2.3	0.05	⊙	---	0.65	---	78	-
FJ-9	6.4	0.05	▷	18	0.32	9.0	140	-

Donde: ▷ = Penicilina, ○ = Tween-60, ⊙ = Control; ** = Tiempo al cual disminuye la demanda de oxígeno después de la adición del adyuvante (h).

FJ-9 Es casi el mismo caso que FJ-7; sin embargo, con adiciones, las cuales ya no tienen el efecto deseado: estimular y/o soportar la producción continua de glutámico, por haber fallado la penicilina al no haberse adicionado a un tiempo más adecuado (antes de las 12 hrs. y/o con una concentración celular 7.5 g/l).

5.3.2. Análisis de resultados de la parte experimental III.

En estos casos (FJ-3, 5, 7, 8 y 9) la principal relación observada resulta ser la existente entre la producción de ácido glutámico y el tiempo que dura la respiración-crecimiento; y se define así: si por efecto de la penicilina el microorganismo deja de crecer y respirar antes de las 48 hrs. de fermentación, entonces existe una producción cuantitativa de glutámico (FJ-3, FJ-5, FJ-8). Por el contrario, si después de la adición de la penicilina, el microorganismo continúa creciendo y/o respirando, no habrá una buena productividad de glutámico (FJ-7 y FJ-9). El hecho de que el microorganismo siga o no creciendo y respirando, después de la adición de penicilina parece depender directamente del tiempo de la adición de ésta; estableciéndose otra relación: Si la penicilina es adicionada antes de las 12 hrs. de fermentación o con concentraciones celulares no mayores de 7.5 g/l (ver tabla comparativa), entonces se verificará un efecto positivo de la penicilina inhibiendo el crecimiento y favoreciendo la excreción de glutámico. Por otra parte, sucederá lo contrario (sin efecto) si la penicilina es adicionada después de las 12 hrs. de fermentación y/o concentraciones celulares mayores de 8 g/l, no habrá producción de glutámico.

Otro aspecto importante es el título de amonio presente y su consumo durante la fermentación: la velocidad de consumo de amonio parece estar directamente relacionada con la producción de glutámico (ver FJ-5 vs. FJ-7 ó FJ-9) sin embargo deben observarse los efectos de los excesos de amonio en FJ-8

No parece haber relación entre las concentraciones de los inóculos, la edad y la velocidad específica de crecimiento mantenida poco antes de las 12 hrs; sin embargo, hay una relación entre la concentración del inóculo al

inicio ([x] to) y la concentración alcanzada al tiempo de adición de la penicilina que es la productividad celular: a mayor concentración al inicio, se alcanza en un tiempo menor una concentración adecuada para la adición de la penicilina, pudiéndose incrementar teóricamente la productividad global del proceso, por incrementar la concentración inicial del inóculo.

5.3.3 Conclusiones de la parte experimental III.

Este bloque de experimentos aportó mayor conocimiento sobre el comportamiento de la fermentación permitiendo establecer lo siguiente:

1. El tween-60 puede resultar adecuado, surtiendo el mismo efecto que la penicilina (cuando es agregado en concentraciones de 10 g/l) pero con la desventaja de ser un agente espumante que puede causar serios problemas durante la fermentación, por lo que se propone restringir su uso.
2. La penicilina demuestra ser el mejor adyuvante promotor de la excreción de glutámico al medio, siempre y cuando ésta sea agregada al tiempo óptimo de acuerdo al estado de desarrollo de la fermentación; aunque si bien, puede tratarse de una relación dosis/concentración celular.
3. Se demuestra la necesidad de las adiciones de amonio bajo las condiciones que indique la elección de dicha adición; ésto es, cuando se haya detenido el crecimiento y/o respiración antes de las 48 hrs. de inicia da la fermentación.
4. Por todo lo anterior es posible proponer el siguiente esquema de procedimiento que pretende asegurar la producción de ácido glutámico:

<u>Medio</u>	
JCL	80%
M	75 g/l
NH ₄ Cl	7.6 g/l

Inóculo

Edad 9 a 12 hrs. de una 2a. adaptación

D.O. 5 a 12 unidades

Volumen de inóculo $10 \pm 1\%$ del volumen total

Proceso

Cuantificación cada 3 h del crecimiento microbiano desde el momento de la inoculación hasta las primeras 12 h para determinar el momento adecuado de la adición de la penicilina. Si es función de la concentración celular $X_{m\acute{a}x} = 7.5 \text{ g/l}$ o del tiempo transcurrido de fermentación entre las 9 y las 12 horas.

Adición del medio completo rico en amonio a las 8 ó 10 h de efectuada la adición de penicilina y ésta haya ejercido el efecto deseado.

Determinar la concentración de amonio cada 12 h para verificar su evolución y de acuerdo a ésto programar posteriores adiciones.

Operación

pH: Control continuo a $\text{ph} = 7.6$ (NaOH/HCl)

Agitación: 500 rpm

Aereación: 1 VVM

Temperatura: 29°C

Volumen inicial: 2700 ml

Volumen de inóculo: 300 ml

Duración de la fermentación: 60 a 96 h

5.5. Corroboración de la evolución de la fermentación.

Fermentación FJ-11

Antecedentes.

Habiendo determinado que la producción de ácido glutámico, en el sistema estudiado, dependía básicamente de la adición oportuna de la penicilina en relación a una concentración celular $x = 7 \text{ g/l}$; y del control de la concentración de amonio que había resultado limitante en algunas fermentaciones, se concluyó que si estas dos condiciones eran cumplidas adecuadamente, entonces debía esperarse un buen rendimiento de la fermentación en la producción de ácido glutámico.

Por lo anterior, se propuso como objetivo de esta fermentación evaluar los resultados al llevar a cabo el cumplimiento de las condiciones propuestas con relación a la adición del adyuvante y amonio y comprobar una vez más la validez de tales proposiciones:

Composición de medio:	Jugo cocido de limón	800 ml
	Melazas de caña	75 g
	NH_4Cl	7.6 g
	Agua destilada cbp.	1,000 ml

Adaptaciones del inóculo:

- 1a. Adaptación - Dos matraces de 250 ml con 20 ml de medio.
- 2a. Adaptación - 21 matraces de 250 ml con 20 ml de medio.

Adiciones de amonio: Adición programada para el momento que alcanzase el límite mínimo establecido (ver fig. 42)

Adición de penicilina: Adicionar en cantidad suficiente para lograr una concentración en el medio de fermentación de 4 U.I de penicilina por litro, antes de las 12 h. de transcurrida la fermentación o antes de que la biomasa alcanzase una concentración de 7 g/l.

Condiciones de operación: Capacidad del fermentador 3.0l.

Aereación 1.0 VVM

Agitación 500 RPM

Volumen del medio 2700 ml

Volumen de inóculo 400 ml

Edad del inóculo 14 h

Densidad óptica del inóculo 10.6 UDO.

Resultados:

La fermentación FJ-11 (fig. 42) presentó el perfil esperado de comportamiento en todos los parámetros estudiados, obedeciendo la producción de glutámico a las relaciones de crecimiento celular, demanda respiratoria, consumo de amonio, azúcares y cítrico, que se pudieron observar en fermentaciones precedentes, lo que satisface una vez más el perfil de la fermentación propuesto tanto en el control de las condiciones de operación, como en su evolución metabólica.

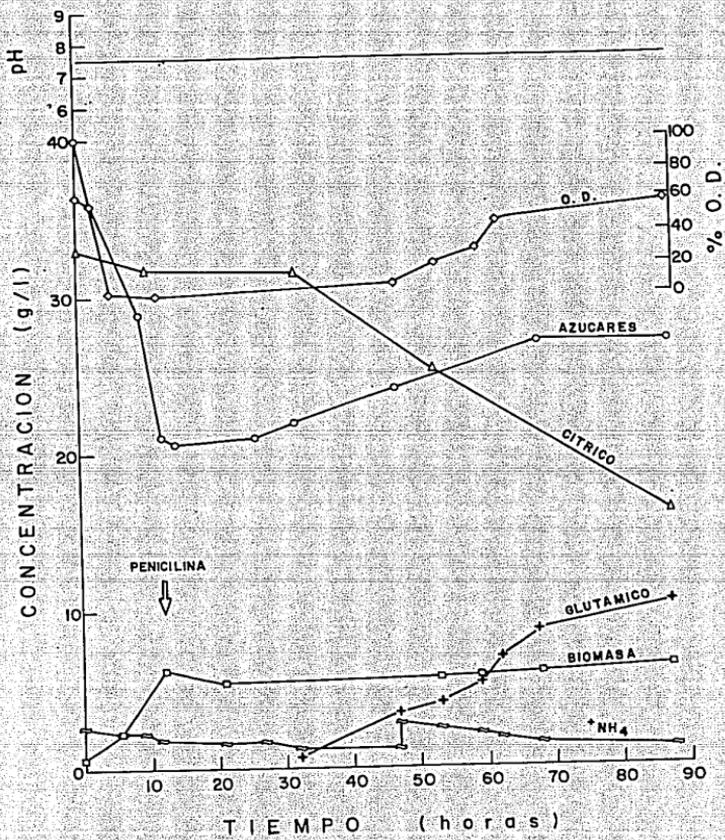


Figura 42. Fermentación FJ-11: Corroboración del procedimiento propuesto.

VI. CONCLUSIONES

A partir de los resultados experimentales de la parte I de este trabajo, se pudo concluir que la utilización de melazas de caña, originó incrementos en la producción de ácido glutámico, siempre y cuando se usara penicilina en el momento adecuado. El análisis de los resultados de esta etapa demostraron que entre las diferentes composiciones probadas, la combinación de jugo cocido de limón con melazas de caña, sin la adición de las sales de K, Mg y Mn, en las concentraciones utilizadas, resultó ser el mejor medio para obtener las más altas producciones posibles de ácido glutámico, dentro de las condiciones dadas.

Por otra parte, se considera que sería importante estudiar de modo más profundo el perfil de azúcares reductores en las fermentaciones en cuyos medios se utilicen melazas, con el fin de poder explicar los aparentes aumentos de la concentración de reductores que se presentaron en varias de las fermentaciones alrededor de las 48 horas de fermentación.

En la etapa II se extrajeron como principales conclusiones, la proposición de un medio de fermentación y procedimiento susceptible de llevarse a cabo en un fermentador, remarcando la importancia de utilizar el hidróxido de amonio con más precisión, de modo que satisfaga convenientemente los requerimientos del microorganismo.

La hidrólisis de los disacáridos y otras reacciones involucradas, deben ser motivo de mayor consideración, pues éstas suceden fácilmente si se esteriliza el medio sin agustar el pH del jugo cocido de limón el cual es originalmente muy ácido (1.5 a 2.5).

En relación a la posible actividad de invertasa del microorganismo, ésta no parece estar asociada a algún factor en particular o al menos no se pudo encontrar ninguna relación de este tipo.

Al analizar la importancia de la presencia de los iones amonio, se confirmó como un aspecto fundamental su evaluación y control a lo largo de la fermentación, pues su concentración es crítica para la producción de

glutámico, los niveles óptimos encontrados oscilan en un rango de concentraciones que están entre los 5 y los 15 g/l, pero siempre en relación a la concentración celular y su actividad metabólica indicada en estas fermentaciones por el perfil de respiración.

En relación a la utilización del tween-60, se encontró que está restringida a un límite de concentración limitado por una evaluación de "riesgo-beneficio" en relación a los problemas ocasionados por la producción de espuma causada por dicho adyuvante y la habilidad para favorecer la excreción de glutámico, además de que aún faltaría considerar el costo involucrado por la concentración tan alta en que fué usado.

En el mismo apartado referente al uso de adyuvantes para estimular la producción de ácido glutámico, la utilización de penicilina demostró ser mejor promotor de la excreción de glutámico; sin embargo, esta adición debe cumplir con ciertas condiciones, tal que la penicilina pueda ejercer efectivamente su acción. Estas condiciones son el mantener en observación estricta la relación entre el tiempo transcurrido de fermentación y el momento de adición de la penicilina o la concentración celular al momento de esta adición. Esto último dió lugar a recordar el concepto farmacológico de dosis efectiva (D.E.), que para las condiciones estudiadas, se estableció manteniendo fija la concentración de antibiótico dejando cambiar la concentración de microorganismos en función del tiempo. En otras palabras, la dosis efectiva en los experimentos fué de 4 UI para una concentración celular de 7 a 8 g/l en peso seco, y para determinar el momento de la adición es de gran utilidad conocer la velocidad específica de crecimiento que presenta el microorganismo en el sistema de trabajo, pues con dicho parámetro es posible conocer con exactitud el momento en que el sistema alcanzará la concentración celular indicada, conociendo solamente la concentración del inóculo y los volúmenes de trabajo y/o la concentración celular al tiempo cero (t_0).

Como se indicó anteriormente, la velocidad específica de crecimiento encontrada para el sistema particular de estudio fué:

$$\mu = 0.399 \text{ h}^{-1}$$

que sustituyéndose en la ecuación de crecimiento, y dejándola en forma tal que el tiempo de adición de la penicilina quede como función de la biomasa

crítica susceptible a la acción de ésta a la dosis dada resulta:

$$Y = 0.59 e^{0.399 x}$$

donde (x) es la concentración celular en g/l e (Y) el tiempo transcurrido de fermentación en horas.

Con base en lo anterior es posible proponer un procedimiento que asegure la producción de ácido glutámico en las condiciones dadas utilizando al jugo cocido de limón como principal componente del medio de fermentación.

Procedimiento propuesto:

I Composición del medio de fermentación

Jugo cocido de limón	800.0 ml
Melazas de caña	75.0 g
NH ₄ Cl	7.6 g
Agua cbp	1000.0 ml

II Procedimiento

El jugo cocido se neutraliza previamente a pH = 7 con sosa en escamas, disolviendo ésta completamente antes de cada adición hasta alcanzar el pH indicado.

Las melazas se disuelven con el mismo jugo cocido de limón previamente neutralizado.

El NH₄Cl se adiciona después de que el medio se ha esterilizado.

III Inóculo

El inóculo deberá tener una edad de 9 a 12 h, proveniente de una segunda adaptación, con una densidad óptica de 5 a 12 unidades, inoculando un volumen a proxímado del 10% del volumen final.

IV Controles en proceso

Cuantificar cada tres horas el crecimiento microbiano desde el momento de la inoculación, hasta las primeras 12 h para determinar el momento adecuado de la adición de penicilina: $x \ t_a = 7.5 \text{ g/l}$ o según la posibilidad de utilizar una computadora capaz de generar las gráficas a partir de una función dada en este caso, la ecuación propuesta en el presente trabajo.

Condicionar la adición del medio y/o amonio, a la confirmación de que la penicilina ha causado el efecto deseado, verificándose esto en el perfil de oxígeno disuelto que debe demostrar una disminución brusca de la demanda bioquímica de oxígeno y una disminución en la velocidad específica de crecimiento después de dicha adición.

Posteriormente se determinará la velocidad de consumo de azúcares y amonio cada 12 h y en base a su evolución determinar posteriores adiciones.

V Parámetros del fermentador

pH : Control continuo a pH = 7.6 NaOH/HCl

Agitación: 500 rpm

Aereación: 1 VVM

Temperatura: 29°C

Volumen inicial del medio: 90%

Volumen del inóculo: 10%

Duración de la fermentación: 60 a 96 h.

Finalmente, cabe decir que la gran similitud de un proceso biotecnológico a otro entre los que se producen compuestos tan variados como lo son los aminoácidos, antibióticos, vitaminas, enzimas y/o proteína unicelular y otros, permite tomar muchos procesos como buenos ejemplos de las problemáticas que se presentan en la biotecnología para tomarlos como sistemas de estudio para la formación de profesionales especializados en estas áreas; de este modo, la fermentación para la producción de ácido glutámico, se consideró como un ejemplo adecuado para desarrollar y poner en práctica los diferentes conocimientos adquiridos durante estos estudios.

El proceso de fermentación para la producción de ácido glutámico, ha sido desde su descubrimiento objeto de muy variados estudios que han incluido casi todos los aspectos concernientes a la biotecnología como son el desarrollo de procesos fermentativos y de equipos de fermentación, desarrollo de sistemas de control dirigidos por computadora, desarrollo de procesos de

extracción y purificación; desarrollo de cepas hiperproductoras por métodos de selección natural, mutación y/o métodos de ingeniería genética, desarrollo de bioreactores de enzimas o células inmovilizadas, además de los estudios colaterales de la bioquímica de los microorganismos productores, que cuyo conocimiento es fundamental para el manejo y control de los procesos en que ellos se involucran. Todos estos esfuerzos han conducido a un proceso ampliamente desarrollado de una gran importancia económica, técnica y científica en la actualidad.

Se sabe bien que los rendimientos de producción comercial de las fermentaciones de ácido glutámico (aproximadamente 35-40 g/l. Tanaka, 1960), están muy por arriba de los rendimientos alcanzados por las fermentaciones de este trabajo; sin embargo, debe tenerse presente que el objetivo principal no fué el de buscar incrementar dichos rendimientos, pues de haber sido así, se hubiera comenzado por tratar de reproducir dichos procesos utilizando los medios industriales convencionales y las cepas hiperproductoras de muy poca estabilidad y que son manejadas de modo confidencial por las principales compañías productoras de éste aminoácido.

La importancia de llevar a cabo aún más estudios sobre un proceso tan conocido, como lo es la fermentación para la producción de ácido glutámico, consistió básicamente en la asociación de este proceso de fermentación con otro completamente diferente, pero que involucraba una problemática especial. Ese otro proceso, es la industrialización del limón mexicano (Citrus aurantifolia-Swingle) que requiere en la actualidad de la búsqueda de una solución a los problemas originados por la necesidad de procesar o utilizar de alguna manera, las muy grandes cantidades de tipo orgánico, como lo es el jugo cocido de limón.

Este trabajo ha cumplido con el principal objetivo de estudiar la fermentación para la producción de ácido glutámico, utilizando el jugo cocido de limón como principal componente del medio de fermentación y la cepa Corynebacterium glutamicum ATCC 13032, con la intención de demostrar la existencia de vías alternativas de aprovechamiento para este "residuo"; el cual, ante las perspectivas de los resultados presentados y otros anteceden

tes, podría llamarse "subproducto" de la industrialización del limón mexicano; pues como pudo verse el jugo cocido de limón demostró poder ser utilizado como componente principal en peso, en un medio de fermentación, siendo capaz de sostener con ayuda de algunos complementos, el crecimiento microbiano y la producción de un metabolito de interés económico como lo es el ácido glutámico; y más aún, promover de alguna manera el incremento de los rendimientos de producción, al utilizarse en combinación de sustratos convencionales como lo son las melazas de caña.

Lo que faltaría es proponer esta posibilidad al principal productor de ácido glutámico con tecnología japonesa en México: Fermex, S.A. de C.V.

REFERENCIAS

- Abe, S. y Takayama, S. (1972). Amino Acid-producing Microorganisms: Variety and classification. Tokyo Res. Lab., Kyowa Hakko Co., Ltd., Machida, Japan In: Microbial Prod. Amino Acids, 72, 3-38. Publ.: Kondansha Ltd., Tokyo, Japan.
- Akashi, K.; Shigeho, I.; Shibai, H.; Kobayashi, K. y Horose, Y. (1978) Determination of Redox Potentials Critical Levels for Cell Respiration for L-Leucin Production. Biotechnol. Bioeng. 20, 27.
- Andrade, A.J.L. (1973). Industrialización del limón Mexicano. Comisión Nacional de Fruticultura S.A.G. México. Serie técnica. Folleto No. 18. p. 10, 23-26.
- Bailey, J.E. & Ollis, D.F. (1977). Cap. 8.2.1. Measurement of K_a Using Gas-Liquid Reactions. En: Biochemical Engineering Fundamentals. International Student Edition. McGraw-Hill Kogakusha, Ltd.
- Beutler, H.O. and Michal, G. (1974). In: Methods of Enzymatic Analysis. Bergmeyer H.U., Ed. 4, 1708-1713; Verlag Chemie, Weinheim/Academic Press, Inc. New York.
- Demain, A.L. y Solomon, N.A. (1981). Microbiología Industrial. En: Investigación y Ciencia (Edición en Español de Scientific American) No. 62, p.15.
- Dills, S.S.; Apperson, A.; Schmidt, M.R. y Saier, M.H. (1980). Carbohydrate Transport in Bacteria. Microbiological Reviews. 44, 3, 385-418.
- García-Hernández, F. y Pérez-Mendoza, J.L. (1983). Fermentación de Desechos Agroindustriales para la obtención de metabolitos de interés industrial. Bol. Estud. Med. Biol., Mex. Suplemento 32, 177-195.
- Eveleigh, D.E. Elaboración Microbiológica de Productos Químicos Industriales. Investigación y ciencia (Edición en Español de Scientific American). No. 62, p.95, 100, 103-104 (1981).
- Hikuma, M.; Yasuda, T.; Karube, I. and Susiki, S. (1981). Application of Microbial Sensors to the Fermentation Process. Ann. N.Y. Acad. Sci. 369, 307-319.
- Hirose, Y.; Sonoda, H.; Kinoshita, K. and Okada, H. Studies on Oxygen Transfer in Sumerged Fermentations versus effects of Aeration on Glutamic Acid Fermentation. Agric. Biol. Chem., 30, 585, (1966).
- Hirose, Y.; Sonoda, H.; Kinoshita, K.; and Okada, H. (1968). Studies on Oxygen transfer in Sumerged Fermentations and Oxygen Demand in Glutamic Acid Fermentation. Agric. Biol. Chem. 32, 855.
- Ikeda, K. (1908). A new Flavor Enhancer. J. Tokyo Chem. Soc. 30, 820.

Izumi, Y.; Tani, Y. and Ogata, K. (1973). Conversion of bisnorbiotin and bisnordethiobiotin to biotin and dethiobiotin, respectively, by microorganisms. Biochem. Biophys. Acta. 326, 485.

Islas-Murgía, L.; Pérez-Mendoza, J.L. y García-Hernández, F. (1984). Production of Glutamic Acid by Fermentation of an Industrial Waste product of the Mexican Lime (Citrus aurantifolia-Swingle). Developments in Industrial Microbiology. 25, 651-656.

Kaneko, H.; Tanaka, T. and Sakaguchi, K. (1979). Isolation and Characterization of a plasmid from Brevibacterium lactofermentum. Agric. Biol. Chem., 43, 867-868.

Kamiryo, T.; Parthasarathy, S. and Numa, S. (1976). Evidence that Acyl-Co-A Synthetase activity is required for the repression of yeast Acetyl-Co-A Carboxylase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 386-390.

Kansaki, T.; Isobe, K.; Okazaki, H. and Fukuda, H.L. (1969). Glutamic Acid Fermentation. VII. Relation between Biotin and Oleic acid. Agric. Biol. Chem. 33, 5:771.

Kinoshita, S.; Udaka, S. and Shimono, M. (1957). Amino Acid Fermentation. I. Production of L-Glutamic Acid by various microorganisms. J. Gen. Appl. Microbiol. 3, 193-205.

Kinoshita, S. and Tanaka, K. (1972). Glutamic Acid. In The Microbial Production of Amino Acids. Yamada, K.; Kinoshita, S.; Tsunoda, T. and Aida, K. Eds. p. 263-324. John Wiley & Sons. U.S.A.

Kwei-Chao and Foster, J.W. (1959). A Glutamic Acid producing Bacillus. Journal of Bacteriology. 77, 715.

Memose, H.; Miyashiro, S. and Oba, M. (1976). Transducing Phages in Glutamic Acid producing bacteria. J. Gen. Appl. Microbiol. 22, 119-129.

Momose, H. and Takagi, T. (1978). Glutamic Acid production in Biotin rich media by temperature sensitive mutants of Brevibacterium lactofermentum, a novel fermentation process. Agric. Biol. Chem. 42, 1911-1917.

Meyer, L.H. (1960). Food Chemistry. The AVI Publishing Co. Inc. p. 160-161.

Nakanishi, T.; Nakajima, J. and Kanda, K. (1975). Conditions for conversion of L-Glutamic Acid Fermentation by Corynebacterium glutamicum into L-Glutamine production. J. Ferment. Technol. 53, 543-550.

Nara, T.; Samejima, H. and Kinoshita, S. (1964). Effect of Penicillin on Amino Acid Fermentation. Agr. Biol. Chem. 28, 2, p. 120-124.

- Ohsawa, T.; Shibukawa, M. and Takahashi, H. (1968). U.S. Pat. 3339114. Aug. 27 Assigned to Asahi Kasei K.K. Japan.
- Okada, H.; Kameyama, I.; Okumura, S. and Tsunoda, T. (1961). L-Glutamic Acid and Succinic Acid metabolism by Brevibacterium flavum 1996. J. Gen. Appl. Microbiol. 7, 177-199.
- Ono, E.; Tosaka, O. and Takimami, K. (1980). Fermentative production of L-Glutamic Acid. Jpn. Pat. 5521762.
- Santana-Castillo, L.; Pérez-Mendoza, J.L. y García-Hernández, F. (1985). Production of Vitamin B₁₂ by Fermentation of an Industrial Waste-Product of the Mexican Lime (Citrus aurantifolia-Swingle). Developments in Industrial Microbiology. 26, Chap. 64, p. 769.
- Shapiro, J.A. (1976). Observations on lysogeny in Glutamic Acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 32, 179-182.
- Shio, I.; Otsuka, S. and Ysunoda, T. (1960). Glutamic Acid Fermentation from glucose by bacteria. IV. Carbon Dioxide Fixation and Glutamate formation in Brevibacterium flavum 2247. The J. of Biochem. 43, 1:110.
- Shio, I.; Otsuka, S. and Takahashi, M. (1962). Effect of Biotin on the bacterial formation of Glutamic Acid. I. Glutamate Formation and Cellular Permeability of Amino Acids. The J. of Biochem. 51, 1:59-62.
- Shio, I. and Ujigawa, K. (1980). Presence and regulation of a-Ketoglutarate dehydrogenase complex in a Glutamate producing bacterium, Brevibacterium flavum. Agric. Biol. Chem. 42, 1897-1904.
- Steenkamp, J. and Villiers, O.T. (1980). Gas-Liquid Chromatographic Determination of Organic Acids of the Krebs Cycle in Apples. South African Journal of Sciences. 7:42.
- Tanaka, K.; Akita, S.; Kimura, K. and Kinoshita, S. (1960). Studies on L-Glutamic Acid Fermentation. VI. The role of Biotin. J. Agric. Chem. Soc. Jpn. 34, 600.
- Ting, S.V. (1956). Rapid Colorimetric Methods for Simultaneous Determination of total reducing Sugar and Fructose in Citrus Juices. Agric. and Food. Chem. 4, 3:363.
- Tosaka, O.; Murakami, Y.; Akashi, K. and Yoshii, H. (1981). L-Glutamic Acid Fermentation with mutants. Jpn. Pat. 5692795.
- Tsuhida, T.; Miwa, K.; Nakamori, S. and Momose, H. (1981). L-Glutamic Acid fermentation with microorganisms obtained by genetic transformations. Jpn. Pat. 56148295.
- Weatherburn, M.W. (1967). Phenol-Hypochlorite Reaction for Determination of Amonia. Clin. Chem. Acta. 39, 8.

Yamada, K.; Kinoshita, S.; Tsunoda, T. and Aida, K. (1972). Taxonomic Classification of L-Glutamic Acid producing bacteria. In The Microbial Production of Amino Acids. p. 5. Kondansha Ltd., Tokyo, Jpn.

Yamada, T.; Takagi, T. and Takinami, K. (1978). Fermentative Production of L-Glutamic Acid. Jpn. Pat. 5332193.