Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

ALGUNOS ASPECTOS SOBRE LA PRODUCCION DE ACIDO ITACONICO POR ASPERGILLUS TERREUS.

M.A.X.U.

T E S I S

QUE PRESENTAN

ALONSO DEL CORRAL MARIA DE LOURDES
PETRIZ ELVIRA MARIA DOLORES
VALDES IZAGUIRRE JORGE ARMANDO

PARA OBTENER EL TITULO DE

(MANCOMUNADA)

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

1978

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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 esta 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.

TESIS 1978
M-28 C3
FECHA
PROC.

FACULTAD DE QUIMICA D.E.P.
U.N.A.M.
BIBLIOTECA

PRESIDENTE:	Q.F.B. MARIO A. MIRANDA
VOCAL:	Q.B.P. ALFREDO ECHEGARAY A.
SECRETARIO:	Q.B.P. JORGE SOTO SORIA
1er. SUPLENTE:	Q.F.B. BEATRIZ LUNA
2do. SUPLENTE:	Q.F.B. ROSA MA. RAMIREZ

Sitio donde se desarrolló el tema:

U.N.A.M. Departamento de Microbiología

U.A.M. Xochimilco

Sustentantes: MA. DE LOURDES ALONSO DEL CORRAL

MA. DOLORES PETRIZ ELVIRA

JORGE A. VALDES IZAGUIRRE

(TESIS MANCOMUNADA)

Asesor del tema:

Q.B.P. JORGE SOTO SORIA

A nuestras familias

amigos

y compañeros que

han contribuido a nuestra formación.

A: La Universidad Nacional Autónoma de México.

A: la Facultad de Química.

A: Nuestro Director de tesis,

Q.B.P. Jorge Soto Soria.

A: Abbott Laboratorios.

A la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, por las facilidades prestadas para el desarrollo del presente trabajo.

A M. en C. Magda Fresan Orozco, Jefe del Departamento de Sistemas Biológicos de la U. A. M. Xochimilco.

Al Dr. Luis Felipe Bojalil Jaber, Director de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la U. A. M. Xochimilco.

Y muy especialmente al Q. B. P. Horacio Sandoval Trujillo por su valiosa ayuda.

I N D I C E

		Página
1.	INTRODUCCION Y OBJETIVOS	1
2.	GENERALIDADES	2
2.1.	ACIDO ITACONICO	2
2.1.1.	Historia	2
2.1.2.	Biosíntesis	3
2.1.3.	Síntesis química	6
2.1.4.	Propiedades físicas y químicas	6
2.1.5.	Aplicaciones	9
2.1.6.	Datos económicos	11
2.2.	Aspergillus terreus	12
2.2.1.	Historia	12
2.2.2.	Taxonomía	14
2.2.3.	Distribución en la naturaleza	14
2.2.4.	Descripción macroscópica y microscópica	14
2.2.5.	Usos	15
2.3.	MELAZAS	15
2.3.1.	Procesamiento de la caña de azucar y obtención del melado	15
2.3.2.	Constituyentes de las melazas	16
2.4.	ALGUNOS ASPECTOS SOBRE LOS COMPONENTES DEL MEDIO DE CULTIVO	17
2.4.1.	Los componentes del medio	17
2.4.2.	pH	20
2.4.3.	Inóculo	20
2.4.4.	Aereación y agitación	21
2.4.5.	Temperatura y tiempo	22
3.	MATERIAL, MEDIOS Y REACTIVOS	22
3.1.	EQUIPO	22
3.2.	MATERIAL DE VIDRIO	23
3.3.	PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO	23
3.3.1.	Medio de conservación	23
3.3.2.	Medio de esporulación	23
3.3.3.	Medios de producción	24
3.4.	PREPARACION DE REACTIVOS	25

Página

3.4.1. Reactivos microbiológicos 25
3.4.2. Reactivos químicos 25

3.5. DEFECACION DE MELAZAS Y CUANTIFICACION DE AZUCARES 26

4. METODOLOGIA 31

4.1. MICROBIOLOGICA 32

4.1.1. Conservación e identificación de la cepa 32
4.1.2. Preparación del inóculo 33

4.2. VARIACION DE LAS CONDICIONES DE FERMENTACION 33

4.2.1. Variación de sacarosa 33
4.2.2. Variación de melazas 35
4.2.3. Efecto de la variación del pH inicial 37
4.2.4. Efecto de la variación de temperatura 38
4.2.5. Efecto del tiempo de fermentación sobre la producción de ácido itacónico 39
4.2.6. Estudio comparativo con melazas de distinto origen 40

4.3. MEDICIONES Y CONTROLES EFECTUADOS AL LIQUIDO FERMENTADO 41

4.3.1. Determinación de ácido itacónico 41
4.3.2. Determinación de azúcares residuales 43
4.3.3. Acidez titulable 45
4.3.4. Determinación de pH final 46
4.3.5. Crecimiento Micelial 46
4.3.6. Control microbiológico 47

5. RESULTADOS 48

5.1. VARIACION DE SACAROSA

5.2. VARIACION DE MELAZAS 51

5.3. EFECTO DE LA VARIACION DE pH INICIAL 54

5.4. EFECTO DE LA VARIACION DE TEMPERATURA 57

5.5. EFECTO DEL TIEMPO DE FERMENTACION SOBRE LA PRODUCCION DE ACIDO ITACONICO 60

5.6. ESTUDIO COMPARATIVO DE MELAZAS DE DISTINTO ORIGEN 64

Página

6. DISCUSION 69

7. RESUMEN Y CONCLUSIONES 72

8.- BIBLIOGRAFIA 73

1. INTRODUCCION Y OBJETIVOS.

Ante la necesidad de encontrar sustitutos del petróleo, recurso escaso no renovable, se han iniciado programas de investigación para encontrar nuevas fuentes de --- energía; entre las más importantes están: la solar, nu--- clear, eléctrica, geotérmica y últimamente se han iniciado investigaciones sobre la molécula del azúcar, que puede servir de base para la producción de combustibles y de una gran cantidad de productos derivados, mediante la Sucroquímica.

Su aplicación, se encuentra relacionada en gran parte con la Microbiología Industrial, en la cual, algunos - de sus productos participan como materias primas en otras industrias.

Este estudio presenta al ácido itacónico como un derivado de esta fuente energética con aplicación en la Industria de los plásticos. La introducción a dicha indus-- tria, se debe a la reactividad y versatilidad de usos del ácido itacónico. Es un trabajo experimental a nivel de laboratorio que tiene el fin de optimizar condiciones de -- fermentación que incluye: variación de sacarosa, melazas, pH, temperatura y tiempo. Con esto sentamos un precedente para un posible desarrollo industrial de este producto --

en México, al utilizar los recursos naturales del País, como es el caso de la caña de azúcar y sus derivados.

2. G E N E R A L I D A D E S .

2.1. ACIDO ITACONICO.

2.1.1. Historia.

Los primeros estudios reportados sobre la producción de ácido itacónico, mediante mohos, fueron realizados por Kinoshita (1929, 1931, 1937), quien estableció que el ácido itacónico y manitol eran los principales productos formados a partir de sacarosa por un organismo al que designó como Aspergillus itaconicus Kinoshita (44,46). Calam, Oxford y Raistrick en 1939, anuncian que una raza de Aspergillus terreus Thom producía cantidades significativas de Acido Itacónico a partir de glucosa, en cambio, otras razas de la misma especie, no lo producían (50). Andrew J. Moyer y Robert D. Coghill en 1945, señalan las concentraciones óptimas para la producción del ácido (39). En el mismo año, Lockwood y Reeves estudian los factores que intervienen en la producción del ácido, tales como pH, metales, sales y fuente de carbono. (33). En 1946, Lookwood y Nelson emplean el medio de cultivo agitado, estudian las concentraciones de metales en forma de sulfatos, sulfato de magnesio, sulfato de zinc, concentraciones de sales, inóculo y fuentes de carbono (32). A este trabajo, le siguen Vincentry y colaboradores en 1948 y 1950.(44) Van der

Westhuizen, Spruit y Sephton en 1951, estudian la producción de ácido itacónico utilizando melazas como fuente de carbono. (53)

En materia de producción a nivel de planta piloto, - Nelson, Traufler, Kelley y Lockwood en 1951, estudian la producción en fermentadores de acero inoxidable, ajustando las condiciones de producción tales como pH, fuente de carbono, nitrógeno, aereación, cantidad de inóculo, temperatura y fundamentalmente el efecto de hierro como contaminante en la producción (41). Estos factores y recuperación del ácido, fueron estudiados en 1952 por Pfeifer, -- Vojnovich y Heger. (42)

2.1.2. Biosíntesis.

El ácido itacónico, no es un intermediario en ninguno de los caminos metabólicos mayores relacionados con el metabolismo de los carbohidratos. Calam, Oxford y Rais--- trick, aseguran que el ácido cítrico es un intermediario del ácido itacónico. (50) Bentley y Thiesen estudian la - biosíntesis del ácido itacónico usando 1-C^{14}-glucosa, y - concluyen que es por fermentación del ácido cítrico, se-- guida por una deshidratación de éste a cis-aconítico y finalmente una descarboxilación por la enzima cis-aconítico descarboxilasa hasta ácido itacónico.

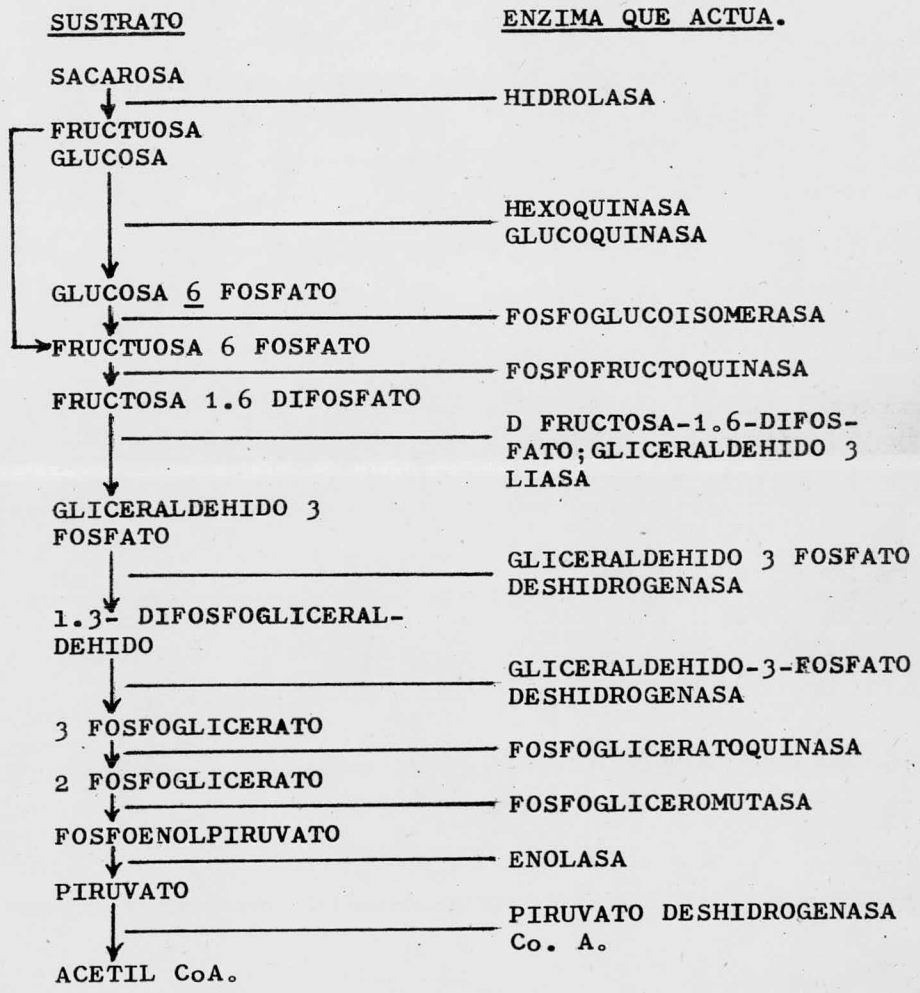
Azúcar ⟶ Acido Glucónico ⟶ Acido Cítrico ⟶ Acido cis-aconítico ⟶ Acido Itacónico.

BIOSINTESIS DEL ACIDO ITACONICO. (30)

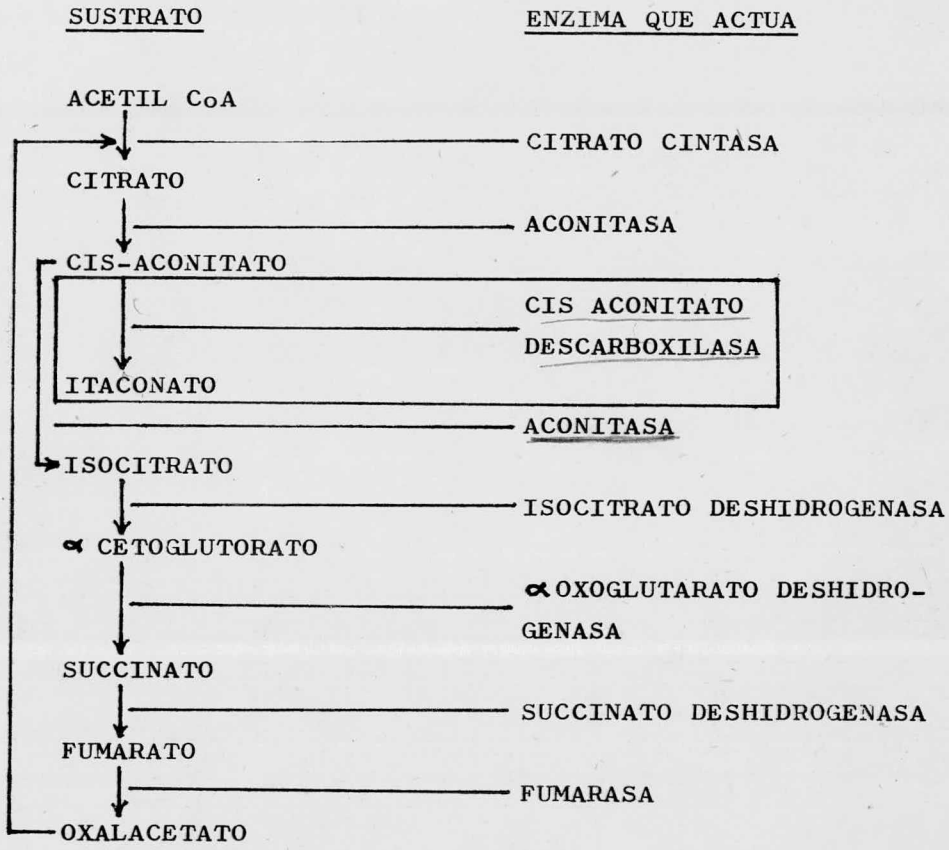
A) Glicólisis.

B) Ciclo del ácido tricarboxílico

A) Glicólisis

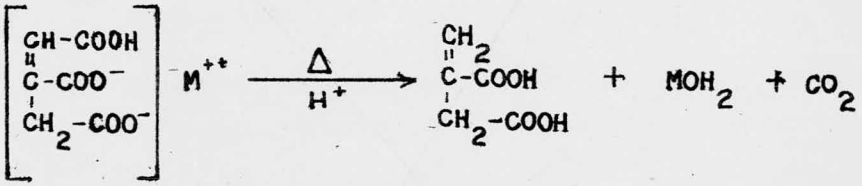


B) Ciclo del ácido tricarboxílico. (30)

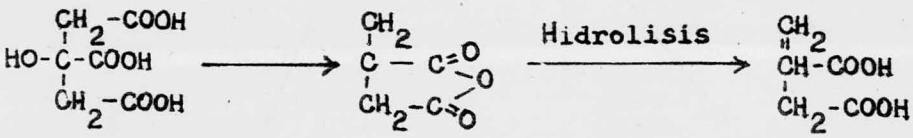


2.1.3. Síntesis Química.

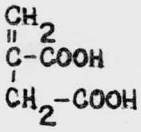
Roberts, Ambler y Curi (1948), patentan un proceso de síntesis por descarboxilación de los aconitatos de calcio- y magnesio recuperados de melazas, (45) por acidificación- y autoclaveado a 140°C.



También, se obtiene ácido itacónico, a partir de la - destilación del ácido cítrico, formándose el anhídrido itacónico, seguida de una hidrólisis. (13, 47)



2.1.4. Propiedades físicas y químicas.



El ácido itacónico, ácido metilensuccínico o ácido -- propilendicarboxílico, son cristales higroscópicos de olor característico. Peso molecular 130.10. C: 46.16%, H: 4.65%

O: 49.19%. Densidad 1.63, punto de fusión 162-164°C, aunque también se ha reportado 165-166°C. En cristalización de agua se obtienen cristales trimétrico octaédricos. Sublima al vacío. (28)

El ácido itacónico tiene una solubilidad de 8.3g. en 100 mililitros de agua a temperatura de 20°C, y de 72.5% a una temperatura de 80°C. Es insoluble en hidrocarburos parafínicos, con una mayor solubilidad en alcoholes y cetonas. Puede decirse que es relativamente atóxico. (44)

Propiedades químicas del ácido itacónico como monómero (en homopolimerización).- El ácido itacónico se distingue del ácido maléico en ser un compuesto vinilideno o un ácido acrílico -sustituído. Se polimeriza en solución N/2 de ácido clorhídrico, empleando como iniciador persulfato de potasio, hasta un peso molecular estimado en 50 000. -- (34)

La polimerización ocurre a un pH correspondiente a la disociación de un grupo carboxílico, sin embargo el ácido completamente disociado no se polimeriza. (12)

Cuando las técnicas de precipitación fallan, el polímero puede ser separado de una solución acuosa por adsorción del monómero que no reaccionó en una resina altamente intercambiadora de iones. (12)

El hecho de que el ácido itacónico no se polimerice a pesos moleculares elevados como los acrilatos, se atribuye a la transferencia de la cadena del hidrógeno alílico con-el monómero que eleva la estabilidad del radical por resonancia. (34)

Es preferible emplear para la polimerización, monoesteres y no diesteres, pues la reacción catalizada por peróxidos es más rápida en monoesteres, además la hidrólisis que se efectúa después de la polimerización es muy difícil de llevarse a cabo en el grupo ester terciario presente solamente en la polimerización de diesteres. (27)

Homopolimerización por diester.-La polimerización con peróxidos orgánicos como catalizadores es más lenta que sus correspondientes acrilatos o metacrilatos y produce polímeros de menor peso molecular. Este efecto puede atribuirse en parte a un efecto estérico del grupo carboalkóxido. (49)

La polimerización término de los itaconatos es aparentemente insignificante, pero la fotoiniciación ocurre particularmente en presencia de un sensibilizante como la hidroquinona.

La polimerización aniónica no se observa porque sucede isomerización a las formas más estables mesaconato y ci

traconato.

Copolimerización.- En la copolimerización con metil - metacrilato o con estireno, los itaconatos entran al copolímero más lentamente que otros monómeros como son el cloruro de vinilo y el acetato de vinilo, esto ocurre porque- hay un pequeño efecto estérico al aumentar el tamaño del - grupo alquílico.

En la copolimerización con bastantes monómeros, el -- itaconato, tiene el efecto de reducir el peso molecular, - probablemente a través de transferencia de cadena.

A bajas concentraciones el itaconato tiende a retar-- dar la velocidad de polimerización, particularmente con -- cloruro de vinilo y acetato de vinilo. (40)

2.1.5. Aplicaciones.

A continuación se indican algunas aplicaciones del -- ácido itacónico y sus derivados:

Resinas de laminación (19), resinas alquílicas (14),- productos plásticos incoloros (15), aditivo para aceites - lubricantes (31), resinas de intercambio iónico (16), fi-- bras sintéticas (17), resinas dentales (23), acondicionadores de suelos (26), plastificantes (17) y elastómeros (21).

Los polímeros de los itaconatos de dimetilo y dietilo

son duros, transparentes y brillantes.

La polimerización de los itaconatos de dibutilo a --- 130-150°C con peróxido o con flujo de aire, forman polímeros líquidos de baja viscosidad y contienen una proporción sustancial de dímeros y trímeros (29). Los productos son - plastificantes efectivos para los copolímeros de cloruro - de vinilo y se han reportado también como agentes antiespumantes (20).

Los copolímeros de cloruro de vinilideno y ácido itacónico al 1 a 5% y con un tercer monómero de acrilonitrilo o un acrilato o ester metacrílico, se usan como impermeabilizantes y como recubridor de celulosa y polietilentereftalato. (36, 43)

También son recomendados como sustratos para emulsiones soporte de haluros de plata en películas fotográficas. (48,38) Las características requeridas son adherencia y estabilidad dimensional, mismas que no se obtienen totalmente si se reemplaza el ácido itacónico por ácido maleico. - (48)

El ácido itacónico se copolimeriza en emulsión a niveles de 2.5 a 7% con acrilatos alquílicos para recubrir las superficies del papel. (35)

El itaconato de dimetilo en un 75 a 80% copolimeriza-

con butadieno puede ser vulcanizado a elastómeros (4).

Se recomienda como aceite aditivo lubricante los copolímeros de esteres del ácido itacónico con anhídrido maleico (25), con ester metacrílico y acrílico (51,37), con acetato de vinilo (6) y con alilestearato (7).

2.1.6. Datos Económicos.

El anuario Estadístico del Comercio Exterior de los Estados Unidos Mexicanos. Secretaría de Industria y Comercio. Dirección General de Estadística. (2)

Año 1974

PAIS	UNIDAD Y CANTIDAD(Kg)	VALOR ($)
ESTADOS UNIDOS	30 845	549 223
FRANCIA	32 000	463 050
IMPORTACION AL INTERIOR	62 845	1 012 273
TOTAL	62 845	1 012 273

Año 1975

BELGICA-LUXEMBURGO	800 100	5 000 625
ESTADOS UNIDOS	5 645 022	34 186 471
FRANCIA	1 000	24 250
SUIZA	3 762 750	22 471 712
IMPORTACION AL INTERIOR	10 208 872	61 683 058
TOTAL	10 208 872	61 683 058

Año 1976	UNIDAD Y CANTIDAD	VALOR ($)
ESTADOS UNIDOS	96 477	2 581 836
FRANCIA	2 000	48 500
CANAL DE PANAMA	15 473	316 499
IMPORTACION AL INTERIOR	113 950	2 946 835
TOTAL	113 950	2 946 835
IMPORTACION DE PRODUCTOS QUE SE PREPARAN CON ACIDO ITACONICO		
RESINAS INTERCAMBIADORAS DE IONES	276 795	16 023 890
RESINAS SIN PIGMENTAR DE IONES	256 822	2 105 059
FIBRAS SINTETICAS O ARTIFICIALES	5 159	1 783 415
ADITIVOS PARA ACEITES LUBRICANTES	241 266	5 868 595
EXPORTACION		
RESINAS ALQUILICAS SIN PIGMENTAR	17 884	370 699
ADITIVOS PARA ACEITES LUBRICANTES	1 923 062	24 877 471

2.2. Aspergillus terreus.

2.2.1 Historia.

La primera vez que se identificó el ácido itacónico - como un producto del metabolismo de un Aspergillus, fué reportado en 1931 por Kinoshita. Esta cepa de color verde, - denominada Aspergillus itaconicus, se aisló del jugo de ciruelas saladas, y sólo crecía bien en medios con altas presiones osmóticas, como soluciones concentradas de azúcar,- 25%, y nitrato de potasio como fuente de nitrógeno.

Después, en 1939, en la Escuela de Higiene y Medicina Tropical de Londres, se encontró entre varias cepas de Aspergillus terreus, una que producía ácido itacónico en un- medio de Czapek Dox con 5% de glucosa y 0.2% de nitrato de potasio. Esta cepa, fue aislada de hilo de algodón, y en - cultivos en Czapek-Dox, su aspecto es aterciopelado, color canela. (50)

Hasta 1945, cuando se impuso el desarrollo de Indus-- trias por Fermentación Microbiológica, la producción de -- ácido itacónico volvió a estudiarse. Se encontró que la cepa de Aspergillus itaconicus no producía ácido itacónico.- (39). Raped aisló 308 cepas de Aspergillus terreus del suelo, 11 de las cuales produjeron ácido itacónico al consu-- mir un 45% de glucosa del medio. Lockwood y Reeves, estu-- diaron una de ellas, la NRRL 1960, para encontrar un medio adecuado de producción (33). Moyer y Coghill estudiaron -- otra de estas cepas de A. Terreus, la NRRL 265, y produje-

ron 30 mutantes de ella por radiación ultravioleta. Estas, no produjeron cantidades apreciables del ácido (39).

2.2.2. Taxonomía.

Aspergillus terreus pertenece a los hongos verdade--- ros, Eumycetales, clase Ascomycetes, orden Moniliales, familia Dematiaceae. Su nombre deriva del latín Aspergillum, una escobilla para rociar agua bendita. (46)

2.2.3. Distribución en la naturaleza.

Se encuentra comunmente en materiales en descomposi-- ción, pues este género posee intensa actividad enzimática. Esta actividad, permite que muchas de sus especies sean -- utilizadas en la Industria Microbiológica.

2.2.4. Descripción macroscópica y microscópica. Re--- producción.

Las especies del género Aspergillus, se clasifican en base a la coloración que adquieren las esporas en un determinado medio debido a que ésta, es una característica del- hongo (46).

En medio de Saboraud, Aspergillus terreus presenta un color blanco en cultivos recientes, y café ocre en culti-- vos envejecidos. El crecimiento es de aspecto aterciopelado y poco abundante. En el medio se observa una tonalidad- café-amarillenta.

Microscópicamente, en su estructura micelial se aprecian hifas muy ramificadas, septadas y hialinas. Característicamente, presenta una cabeza o conidióforo, la cual, está formada por una vesícula a la que rodean numerosas ramas o esterigma, que sostienen en un extremo una cadena de conidas esféricas (5).

Su reproducción se realiza asexualmente por conidias que se forman al septarse el esterigma y quedar incluido un núcleo en esta porción de citoplasma. Sexualmente, se realiza homotálica o heterotálicamente, por la unión de gametos masculino y femenino, y con la formación de ascosporas (1).

2.2.5. Usos.

A. Terreus es usado en la producción de ácido itacónico. Además, otros ácidos identificados como productos metabólicos como ácido oxálico, fumárico y succínico (11). En la producción de antibióticos como geodina y citrinina (22).

2.3. MELAZAS.

2.3.1. Procesamiento de la caña de azúcar y obtención del melado.

Durante la producción comercial del azúcar a partir de caña de azúcar, el jugo de caña es parcialmente inver-

tido para prevenir la cristalización del azúcar, es decir, que el azúcar es parcialmente hidrolizado a monosacáridos- con calor y ácido, y después es neutralizado y concentrado sin separar aún ninguna azúcar, a éstas se les llama melazas invertidas y contienen el azúcar original del jugo de- caña, aunque parcialmente hidrolizado a D-glucosa y D-fructosa. Después, se cristaliza la sacarosa, se separa del licor madre, se vuelve a concentrar y se recupera el azucar- cristalizable. Esto se repite varias veces, hasta que los- inhibidores de la cristalización acumulados existen en tal concentración que la sacarosa que posiblemente se recuperaría, ya no es económicamente costeable (11).

2.3.2. Constituyentes de las Melazas.

Las melazas contienen aproximadamente 52% de azúcares totales, calculado como sacarosa (30% de sacarosa y 22% como azúcares invertidas).

Además de sacarosa, las melazas contienen pequeñas -- cantidades de polisacáridos complejos y azúcares inverti-- das, esto se atribuye a la acción de la invertasa presente en el jugo de caña.

El color negro, corresponde a sustancias poliméricas- que contienen nitrógeno, resultado de una reacción de enne- grecimiento con aminoácidos, causado por el uso de calor y álcalis durante el proceso.

Las melazas contienen iones inorgánicos en altas concentraciones y aún más que en el jugo de caña original, -- pues se concentra para la cristalización del azúcar; se encuentran calcio, constituyentes orgánicos, incluyendo ácidos aconítico, málico, cítrico, láctico, fórmico, acético- y propiónico. Compuestos que contienen nitrógeno, princi-- palmente aminoácidos, particularmente ácido aspártico y -- glutámico, resultado de una deaminación de la asparagina y glutamina del jugo de caña.

Algunas vitaminas estables al calor y álcali como --- myo-inositol, niacina, ácido pantoténico, riboflavina y pequeñas cantidades de biotina.

Compuestos de fósforo como hexafosfato de inositol y- sus sales de calcio y magnesio, conocidas como fitina.

La composición de las melazas, difiere de acuerdo al- área de producción (9).

2.4. ALGUNOS ASPECTOS SOBRE LOS COMPONENTES DEL MEDIO DE CULTIVO Y CONDICIONES DE FERMENTACION.

Los factores que afectan una fermentación a nivel de- laboratorio son:

2.4.1. Los componentes del medio.

A. Fuente de carbono.- Estudios previos a este trabajo reportan concentraciones de glucosa óptimas para la producción de ácido itacónico que van de 5 a 25%; 5 g de glucosa por 100 ml de medio (50), 6% de glucosa anhidra (42), 7.4.g de glucosa por 100 ml. del medio (32) y de 20 a 25 g por 100 ml.- de medio (39). La sacarosa también es metabolizada por el hongo en concentraciones - de 12 a 12.5 g/100 ml. del medio para una- producción mejor de Acido Itacónico (53).- En 1951 Van der Westhuizen estudia el efecto de las melazas en la fermentación, y -- las concentraciones van de 0 a 10% de melazas crudas de caña de azúcar, de 0.03% de- cenizas equivalente a melazas crudas y melazas deionizadas.

B. Fuente de nitrógeno.- Fuentes inorgánicas- de nitrógeno proporcionan buenos rendimientos en la fermentación de Acido Itacónico. Andrew Moyer y Robert Coghill (39) estu--- dian la mejor fuente de nitrógeno. El ni-- trato de amonio al 0.3% rinde el mejor porcentaje de Acido itacónico, y en orden descendente se encuentran, el cloruro de amo-

nio, fosfato de amonio, nitrato de sodio, - urea y nitrato de potasio. Van der Westhuizen (53) confirma al nitrato de amonio como mejor fuente de nitrógeno. Otras investigaciones estudian la adición de licor de maíz con sales minerales de nitrógeno (32,39,41)

C. Sales minerales:

Fosfatos.- Para los iones fosfato, la concentración óptima es de 0.0216% en forma de ácido fosfórico (39), y de 0.01 a 0.015% si se adiciona como $H_2PO_4^-$.

Sulfatos.- El sulfato de magnesio heptahidratado adicionado a cultivos agitados dá - buenos rendimientos en concentraciones de - 0.025% (39) y 0.075%(33), concentraciones - de 0.6% favorecen la formación de ácido itacónico y aumentan la tolerancia a la concentración de iones hidrógeno, por otro lado - el sulfato de magnesio actúa contrarrestando la toxicidad que los iones aluminio tienen sobre la fermentación, efecto que presenta a concentraciones de 0.001% a valor - de pH 2 y de 0.002% a valor de pH 3 e inhibe el crecimiento del hongo y por lo tanto la producción (33).

Tanto los iones hierro como zinc provocan - un efecto tóxico sobre la fermentación en - concentraciones superiores a 1 mg/lt de --- zinc y de 10 mg/lt de hierro. La formación- de micelio se favorece, mientras que la producción de ácido disminuye (39).

Cloruros.- El cloruro de potasio en concentración de 0.005% dá buenos rendimientos de ácido itacónico (39), mientras que el cloruro de sodio requiere 0.04% para el mismo -- efecto (32). Concentraciones superiores a - estos valores conduce a un crecimiento micelial abundante y baja producción (32,39).

2.4.2. pH.- Se reportaron valores de pH óptimo para - la fermentación itacónica de 1.8 a 1.95 (33),- 1.8 (32), 1.8 a 3.0 sin series interferencias- en la producción de ácido itacónico (39) y valor de pH 3.0 (53).

Para el ajuste del pH fueron probados el ácido clorhídrico, ácido sulfúrico y el ácido nítrico. Proporciona el primero mejores rendimientos en la fermentación (53).

2.4.3. Inóculo.- En general, el inóculo consistió en- una suspensión de esporas. L.B.Lockwood (32) -

estudió la inoculación de esférulas, concluyendo que pequeñas cantidades de inóculo es el mejor método para prevenir un exceso de crecimiento a expensas de una mejor producción.

De L.B.Lockwood y G.E.N. Nelson (32) reproducimos la siguiente tabla.

Efecto de la cantidad de inóculo en la producción de ácido itacónico a partir de glucosa -- por A. Terreus

NRRL 1960

Número de esférulas	Acido itacónico producido g/cultivo
1	2.05
2	2.05
3	1.85
4	1.66
5	1.17
8	0.68

2.4.4. Aereación y Agitación.- En 1951 (53) Van der - Westhuizen señala que ocurre una conversión mejor a ácido itacónico en cultivos con mayor -- profundidad. Moyer y Coghill (39) experimentan en matraces de 200 ml. que contienen 60 a- 70 ml. de medio de cultivo y obtienen buenas - producciones cuando logran profundidades de --

1.5 a 2.0 cm.

Pfeifer (42) reporta 100 a 250 rpm con aerea-- ción de 12 a 15 libras/pulgada^2.

2.4.5. Temperatura y Tiempo.- En general se ha reportado como temperatura de fermentación para producciones mejores de ácido itacónico, 30°C en un tiempo promedio de 10 a 12 días (33,39,53).

3. M A T E R I A L , M E D I O S Y R E A C T I V O S .

3.1. EQUIPO.

Microscopio.

Potenciómetro. DIGI-SENSE. DIGITAL pH METER.
COLE-PALMER INSTRUMENT COMPANY.
CHICAGO, ILLINOIS 60648 U.S.A.
MODELO 5985-40

Espectrofotómetro.

Mesa de agitación rotatoria a 188 r.p.m.

Estufa. ESTUFA KINET A 28°C.
ESTUFA KINET DE 0 A 250°C.
ESTUFA ESTERILIZADORA 0 A 300°C.
ROBERT SHAW
NEW STANTON DIVISION
YOUNGWOOD, PENSILVANIA 15697.

Autoclave. BOE-KEL. 110 VOLTS

DE 0 a 22 Kg/cm^2 a 135^oC.

Balanza analítica.

E. METTLER

ZURICH, 1 DIV= 1 mg.

MADE IN ZWITZERLAND/ 200 g.

HOPPMAN-PINTHER BOSWORTH, S.A.

3.2. MATERIAL DE VIDRIO.

Matraces Yodométricos de 250 ml.

Vidriería.

3.3. PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO.

3.3.1. Medio de Conservación.

SABOURAUD

Neopeptona difco	1.0 g.
Bacto dextrosa glucosa	4.0 g.
Bacto agar	2.5 g.
Agua destilada	100.0 ml.

Disolver calentando cuidadosamente con agitación. Esterilizar a 121^oC, 1.5 atmósferas de presión, durante 20 minutos. Repartir en tubos de 16 X 125, inclinarlos.

3.3.2. Medio de esporulación.

KCl	0.005 g.

NH_4NO_3	0.3	g.
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.6	g.
NaH_2PO_4	0.015	g.
Melazas defecadas al 10%	50.0	ml.
Agar	2.0	g.
Agua destilada c.b.p	100.0	ml.

Disolver calentando cuidadosamente y esterilizar a 121°C, 1.5 atmósferas de presión durante 20 minutos.

Preparar cajas de petri con este medio.

NOTA: La concentración de las melazas está referida en 3.5.

3.3.3. Medios de producción.

Medio de producción A

KCl	0.005	g.
NH_4NO_3	0.3	g.
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.6	g.
NaH_2PO_4	0.015	g.

Medio de producción B

KCl	0.005	g.
NH_4NO_3	0.3	g.
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.6	g.
NaH_2PO_4	0.015	g.
Sacarosa	10.0	

Medio de producción C

KCl	0.005	g.
NH_4NO_3	0.3	g.
$MgSO_4^{\circ}7H_2O$	0.6	g.
NaH_2PO_4	0.015	g.
Sacarosa	10.0	g.
Melazas al 10%	0.1	ml.

NOTA: La concentración de las melazas está referida en 3.5.

3.4. PREPARACION DE REACTIVOS.

3.4.1. Reactivos microbiológicos.

Colorante azul de algodón lactofenol.

Cristales de fenol fundido	20.0	ml.
Acido láctico	20.0	ml.
Glicerina	40.0	ml.
Agua destilada	20.0	ml.

Disolver calentando la mezcla a 70°C.

Añadir 0.05 g. de colorante azul de Poerrier o azul de algodón.

Bálsamo de Canadá.

Colorantes para tinción de Gram.

3.4.2. Reactivos Químicos.

Solución de agua de bromo amortiguada pH 1.2.

Solución de Yoduro de potasio al 50%.

Solución decimonormal de tiosulfato de sodio.

Almidón S.I.

Solución saturada de cloruro de sodio.

Acido sulfúrico. Grado reactivo.

Solución de fenol al 5%.

Solución decimonormal de hidróxido de sodio.

Fenolftaleína S.I.

Solución de agua de bromo amortiguada pH 1.2 - (24).

a) Disolver 1 ml. de bromo y 3 g. de bromuro - de potasio en 100 ml. de agua destilada.

b) Agregar 1.87 g. de cloruro de potasio y --- 48.5 ml. de solución normal de ácido clorhídrico.

c) Adicionar agua destilada para tener un volumen final de 500 ml.

d) El pH final es de 1.2 ± 0.1.

e) Guardar en frasco ambar y en refrigeración.

3.5. DEFECACION DE MELAZAS Y CUANTIFICACION DE AZUCARES.

Defecación de melazas.

a) A 50 ml. de melazas, agregar 50 ml. de agua destilada.

b) Ajustar el pH a valor de 4.0, con solución-

al 10% de ácido sulfúrico.

c) Calentar a fuego lento por 30 minutos.

d) A temperatura ambiente, centrifugar.

e) Separar el sobrenadante en un frasco.

Cuantificación de azúcares totales.

Curva patrón.

a) Hacer diluciones de sacarosa U.S.P. que contengan 10, 20, 30, 40, 50, 60. 70, 80, 90 y -- 100 mcg/ml.

Muestra.

a) Medir 1 ml. de melazas defecadas, agregar - agua destilada para tener un volumen final de- 100 ml.

b) Medir 1 ml. de melazas defecadas, agregar - agua destilada para tener un volumen final de- 500 ml.

c) Medir 1 ml. de melazas defecadas, agregar - agua destilada para tener un volumen final de- 1000 ml.

Procedimiento.

a) A las diluciones de sacarosa y melazas, --- practicar el Método de fenol-sulfúrico (4.3.2)

Curva estándar de sacarosa

Concentración (μ g/ml)	Absorbancia
20	0.229
40	0.450
60	0.670
80	0.900
100	1.150

CALCULOS:

Melazas de origen desconocido:

$$\frac{0.40}{0.56} \times 50 \times 1000 \times \frac{100}{10} = 358 \text{ mg/ml}$$

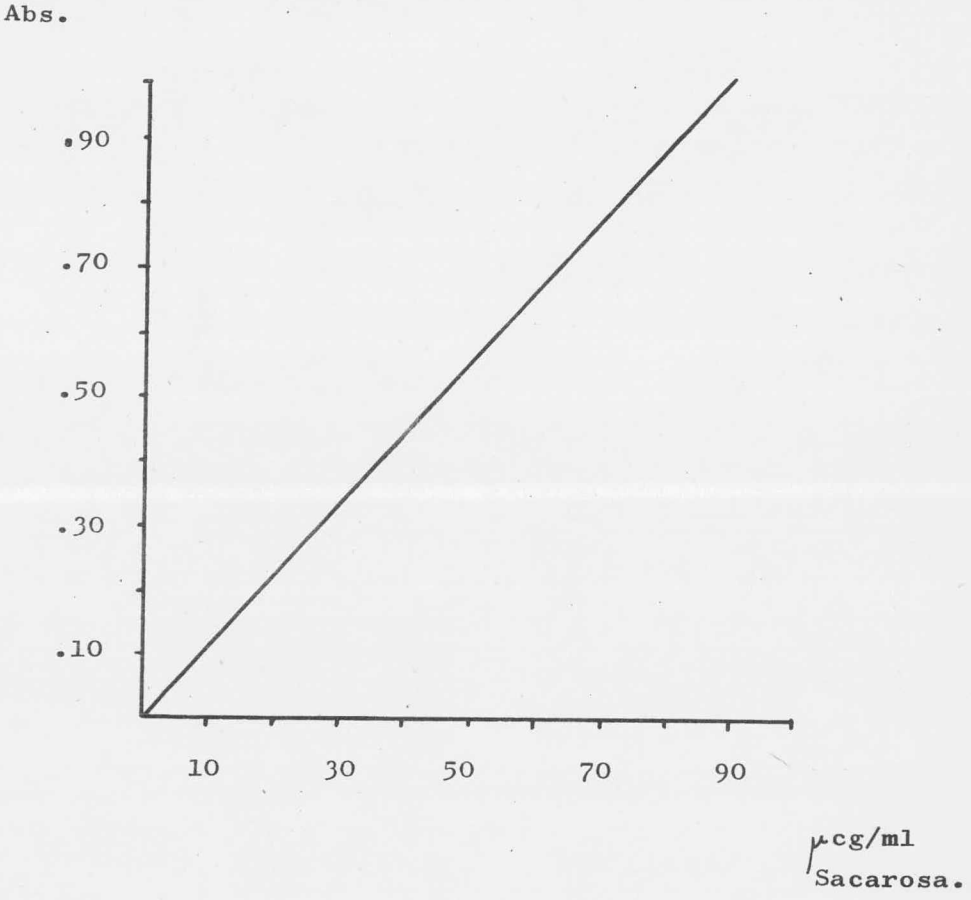
Melazas de Morelos:

$$\frac{0.488}{0.560} \times 50 \times 1000 \times \frac{100}{10} = 435.714 \text{ mg/ml.}$$

Melazas de Veracruz:

$$\frac{0.349}{0.560} \times 50 \times 1000 \times \frac{100}{10} = 311.609 \text{ mg/ml.}$$

CURVA ESTANDAR DE SACAROSA



Cálculos para preparar solución al 10% de azúcares contenidas en las melazas de origen desconocido, Morelos y Veracruz.

Melazas de origen desconocido.

a) 0.358 g de azúcares se encuentran en 1 mililitro de melazas.

10.0 g. de azúcares se encuentran en 28.8 ml. de melazas.

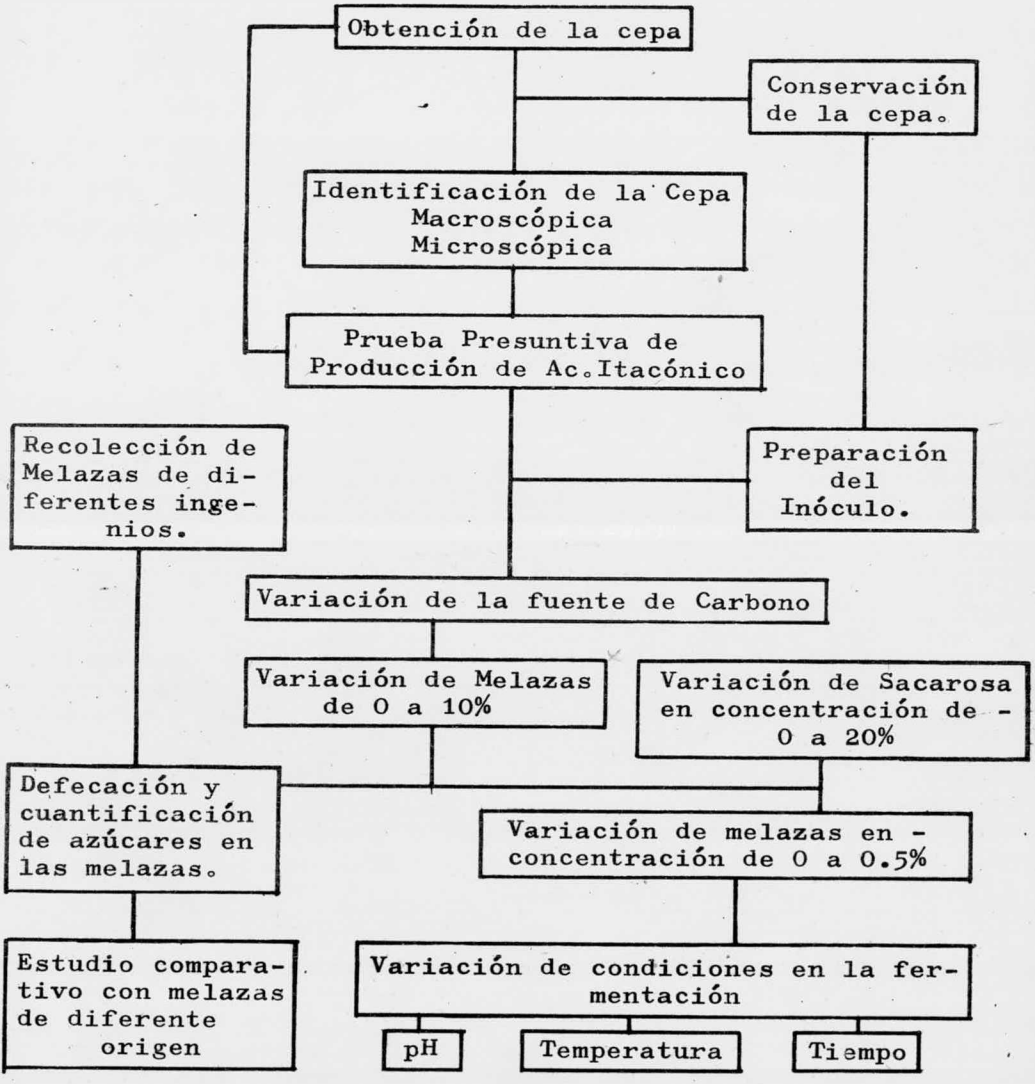
b) Medir 28.80 ml. de melazas de origen desconocido colocarlas en un matraz volumétrico de 100 ml. Adicionar agua destilada al volumen.

c) Esta solución tiene una concentración de 10% de azúcares.

Proceder de la misma forma con las melazas de Veracruz y Morelos, tomando en cuenta la concentración de azúcares por mililitro de melaza.

4. METODOLOGIA.

DIAGRAMA DE FLUJO



Se realizó el estudio con una cepa de Aspergillus terreus, NRRL[1] 265 o ATCC[2] 10029, donada por el Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, para la variación de algunas condiciones de fermentación con sus respectivos controles químicos y microbiológicos.

4.1. MICROBIOLOGICA.

4.1.1. Conservación e Identificación de la cepa.

Conservación.- Efectuar resiembras en medio de Sabouraud, 3.3.1., cada 15 días.

Identificación microscópica.

a) Preparar un microcultivo.
b) Teñir con colorante azul de algodón lactofenol, 3.4.1.
c) Observar al microscopio las estructuras reproductivas características de Aspergillus: un conidióforo conteniendo gran cantidad de conidas esféricas con aspecto de una escobilla.

Identificación macroscópica.

a) Observar la morfología micelial en el medio de Sabouraud, 3.3.1.

1) NRRL.- Northern Regional Research Laboratory.
2) ATCC.- American Type Culture Collection.

b) Observar el cambio de color del medio de -- cultivo.

4.1.2. Preparación del inóculo.

a) Sembrar A. Terreus en medio de Sabouraud, - 3.3.1.

b) Incubar hasta crecimiento abundante a 28°C.

c) Suspender las esporas del hongo en agua --- destilada estéril.

d) Sembrar en caja petri con medio de esporulación 3.3.2.

e) Incubar a 28°C durante 7 días.

f) Cortar con tijeras estériles cuadros de micelio de 0.5 cm. por lado.

g) Inocular cada matraz para fermentación con- un solo cuadro así obtenido.

4.2. VARIACION DE LAS CONDICIONES DE FERMENTACION.

4.2.1. Variación de sacarosa.

a) En siete matraces con capacidad de 300 ml.- colocar en cada uno, medio de producción A, 3.3.3.

b) Añadir a cada uno sacarosa como sigue:

Matraz #	Sacarosa g.	Concentración %
1	0.0	0.0
2	2.5	2.5
3	5.0	5.0
4	7.5	7.5
5	10.00	10.00
6	12.5	12.5
7	15.0	15.0

c) Disolver en una pequeña porción de agua destilada.

d) Llevar a volumen de 100 ml. con agua destilada.

e) Ajustar el pH a un valor de 3.0 con solución normal de ácido clorhídrico.

f) Esterilizar en autoclave a 121°C y 1.5 atmósferas de presión durante 20 minutos.

g) Incubar 24 horas a 28°C como prueba de esterilidad.

h) Inocular, según 4.1.2.

i) Incubar a 28°C, en agitación rotatoria durante 7 días.

j) Efectuar las mediciones y controles, 4.3, - al líquido fermentado y a su correspondiente medio sin fermentar, el cual se emplea -

como blanco.

4.2.2. Variación de melazas.

Variación de melazas en concentración de 1 a - 10%.

a) Colocar en 4 matraces con capacidad de 300- ml. el medio de producción A, 3.3.3.

b) Adicionar solución al 10% de melaza, 3.5.

Matraz #	Solución 10% de melazas ml.	Concentración %
1	100	10.0
2	50	5.0
3	25	2.5
4	10	1.0

c) Llevar a volumen de 100 ml. con agua destilada.

d) Ajustar el pH a un valor de 3.0 con solución normal de ácido clorhídrico.

e) Esterilizar en autoclave a 121°C y 1.5 atmósferas de presión durante 20 minutos.

f) Incubar 24 horas a 28°C como prueba de esterilidad.

g) Inocular, según 4.1.2.

h) Incubar a 28°C, en agitación rotatoria durante 7 días.

i) Efectuar las mediciones y controles, 4.3., al líquido fermentado y a su correspondiente medio sin fermentar, el cual se emplea como blanco.

Variación de melazas en concentración de 0 a 0.5%.

a) Colocar en 4 matraces con capacidad de 300 ml. el medio de producción B, 3.3.3.

b) Adicionar solución al 10% de melazas, 3.5.

Matraz	Solución 10% de melazas	Concentración
#	ml.	%
1	0.0	0.0
2	0.05	0.005
3	0.10	0.010
4	0.25	0.025
5	0.50	0.050
6	0.75	0.075
7	1.00	0.100
8	2.50	0.250
9	5.00	0.500

c) Disolver en una pequeña porción de agua --- destilada.

d) Llevar a volumen de 100 ml.con agua destilada.

e) Ajustar el pH a un valor de 3.0 con solución normal de ácido clorhídrico.

f) Esterilizar en autoclave a 121°C y 1.5 atmósferas de presión durante 20 minutos.

g) Incubar 24 horas a 28°C como prueba de esterilidad.

h) Inocular, según 4.1.2.

i) Incubar a 28°C, en agitación rotatoria durante 7 días.

j) Efectuar las mediciones y controles, 4.3., al líquido fermentado y a su correspondiente medio sin fermentar, el cual se emplea como blanco.

4.2.3. Efecto de la Variación de pH inicial.

a) En 7 matraces con capacidad de 300 ml., colocar en cada uno medio de producción C, -- 3.3.3.

b) Disolver en una pequeña porción de agua destilada.

c) Llevar a volumen de 100 ml. con agua destilada.

d) Ajustar el pH con solución normal de ácido-clorhídrico, de manera que cada matraz contenga valores de pH así:

Matraz	Ajustar el pH a:
1	1.5
2	2.0
3	2.5
4	3.0
5	3.5
6	4.0
7	4.5

e) Esterilizar en autoclave a 121°C y 1.5 atmósferas de presión durante 20 minutos.

f) Incubar 24 horas a 28°C como prueba de esterilidad.

g) Inocular, según 4.1.2.

h) Incubar a 28°C en agitación rotatoria durante 7 días.

i) Efectuar las mediciones y controles, 4.3., al líquido fermentado y a su correspondiente medio sin fermentar, el cual se emplea como blanco.

4.2.4. Efecto de la Variación de temperatura.

a) Preparar seis matraces con capacidad de 300 ml. con medio de producción C, 3.3.3.

b) Disolver en una pequeña porción de agua destilada.

c) Llevar a volumen de 100 ml. con agua destilada.

d) Ajustar el pH con solución normal de ácido-clorhídrico a un valor de 3.0.

e) Esterilizar en autoclave a 121°C y 1.5 at-- mósferas de presión durante 20 minutos.

f) Incubar 24 horas a 28°C como prueba de esterilidad.

g) Inocular, según 4.1.2.

h) Incubar en agitación rotatoria durante 7 -- días.

A cada matraz le corresponde diferente temperatura.

Matraz #	Incubar a: Temperatura °C.
1	24
2	26
3	28
4	30
5	32
6	34

i) Efectuar las mediciones y controles, 4.3.,- al líquido fermentado y a su correspondiente medio sin fermentar, el cual se emplea - como blanco.

4.2.5. Efecto del tiempo de fermentación sobre la producción de ácido itacónico.

a) Preparar 17 matraces con capacidad de 300 - ml. colocando en cada uno medio de producción C, 3.3.3.

b) Disolver en una pequeña porción de agua destilada.

c) Llevar a volumen de 100 ml. con agua destilada.

d) Ajustar el pH con solución normal de ácido-clorhídrico a un valor de 3.0.

e) Esterilizar en autoclave a 121°C y 1.5 atmósferas de presión durante 20 minutos.

f) Incubar 24 horas a 28°C como prueba de esterilidad.

g) Inocular, según 4.1.2.

h) Incubar a 28°C en agitación rotatoria.

Cada día retirar un matraz de la fermentación.

i) Efectuar las mediciones y controles, 4.3.,- al líquido fermentado y a su correspondiente medio sin fermentar, el cual se emplea - como blanco.

4.2.6. Estudio comparativo con melazas de distinto -- origen. Melazas correspondientes a la primera-quincena de agosto de 1977. Obtenidas del Ingenio de Martínez de la Torre, Veracruz.

Melazas correspondientes a la primera quincena de noviembre de 1977. Obtenidas del Ingenio de Zacatepec, Morelos.

a) Defecar y cuantificar azúcares totales, según 3.5.

b) Seguir la metodología de variación de melazas en concentración de 0 a 0.5%, según --- 4.2.2.

4.3. MEDICIONES Y CONTROLES EFECTUADOS AL LIQUIDO FERMENTADO.

Determinación de ácido itacónico.

Determinación de azúcares residuales.

Acidez titulable.

Determinación de pH final.

Crecimiento micelial.

Control microbiológico.

4.3.1. Determinación de ácido itacónico. (24)

a) Medir 10 ml. del líquido fermentado en un - matraz yodométrico.

b) Añadir 50 ml. de solución de agua de bromo- amortiguada pH 1.2 $\pm$ 0.1, 3.4.2.

c) Tapar el matraz y agregar solución saturada de cloruro de sodio, para evitar la pérdida de vapores de bromo.

d) Dejar el matraz 10 minutos a temperatura ambiente y 5 minutos en baño de hielo.

e) Agregar 5 ml. de solución al 50% de yoduro de potasio en el cono del matraz.

f) Abrir cuidadosamente para permitir la entrada de la solución de yoduro de potasio al matraz.

g) Dejar el matraz 10 minutos a temperatura ambiente.

h) Valorar el yodo liberado con solución decimonormal de tiosulfato de sodio, emplear como indicador almidón S.I. (Vm)

i) Preparar un blanco de reactivos, y practicar el ensayo. (VB1).

Reacción: (3)

1) $$\begin{matrix} CH_2 \\ \| \\ C\text{-}COOH \\ | \\ CH_2\text{-}COOH \end{matrix} + \underset{\text{Exceso}}{Br_2} \longrightarrow \begin{matrix} Br\text{-}CH_2 \\ | \\ Br\text{-}C\text{-}COOH \\ | \\ CH_2\text{-}COOH \end{matrix} + Br_2$$

2) $$Br_2 + 2KI \longrightarrow 2KBr + I_2$$

3) $$I_2 + 2Na_2S_2O_3 \longrightarrow 2NaI + Na_2S_4O_6$$

Cálculos:

(1)

$$\text{g. de A. itacónico/100 ml.} = \frac{(VB1-Vm) \times \text{Normalidad} \times 0.065 \times 100}{\text{Alicuota}}$$

Donde VB1= Volumen de tiosulfato de sodio consumido por el blanco

Vm = Volumen de tiosulfato de sodio consumido por la muestra.

Normalidad=Normalidad de la solución de tiosulfato de sodio

4.3.2. Determinación de azúcares residuales.

Preparación de la solución ~~madre~~ Patrón.

a) En un matraz volumétrico de 100 ml. colocar 500 mg. de sacarosa U.S.P.

b) Llevar a volumen con agua destilada.

Preparación de la Solución ~~patrón~~ Madre.

a) De la solución madre, medir 10 ml. y vertirlos en un matraz volumétrico de 1000 ml.

b) Agregar agua destilada al volumen.

La concentración final es de 50 µcg./ml.

Preparación de la muestra y blanco.

a) En un matraz volumétrico de 1000 ml. colocar 1 ml. de líquido fermentado y llevar al volumen con agua destilada.

b) En un matraz volumétrico de 1000 ml. colocar 1 ml. de líquido sin fermentar, y lle--

var al volumen con agua destilada.

Procedimiento.

Estándar, problema y blanco tratarlos de la siguiente manera:

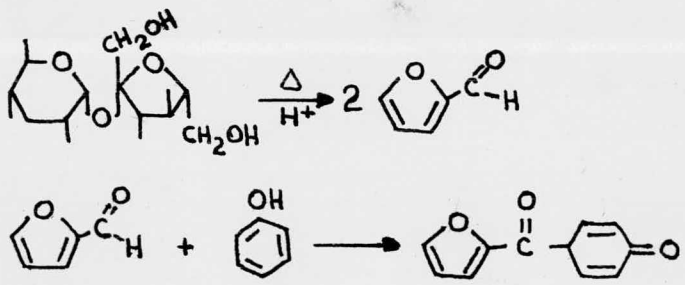
a) Medir 1 ml. de estándar, problema y blanco y vertirlos a tres tubos de 16 X 150, respectivamente.

b) Agregar 1 ml. de solución de fenol al 5%.

c) Añadir 5 ml. de ácido sulfúrico grado reactivo.

d) A temperatura ambiente leer a 485 nm. en el espectrofotómetro.

Reacción:



Cálculos:

Azúcares presentes en el líquido sin fermentar:

(2)

$$\text{mg/ml de azúcares en el medio sin fermentar.} = \frac{\text{Abs Bl X Conc. Patrón X 1000}}{\text{Abs. Patrón}}$$

Azúcares presentes en el líquido fermentado:

(3)

$$\text{mg/ml de azúcares en el medio fermentado} = \frac{\text{Abs Pb X Conc. Patrón X 1000}}{\text{Abs. Patrón}}$$

Donde Abs bl= Absorbancia del blanco.

Abs Pb= Absorbancia del problema.

Abs Patrón= Absorbancia del patrón.

Conc. Patrón= Concentración del patrón.

Azúcares consumidas:

(4)

Azúcares consumidas= mg/ml Azúcares en el medio sin fermentar - mg/ml Azúcares en el medio fermentado. X 0.1.

% de Azúcares consumidas:

(5)

$$\text{\% de Az. consumidas} = \frac{\text{mg/ml Azúcares consumidas X 100}}{\text{mg/ml Azúcares en el blanco}}$$

En base a los resultados de ácido itacónico -- producido y azúcares consumidas, se relaciona para obtener el Rendimiento:

(6)

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{mg/ml de Acido Itacónico X 100}}{\text{mg/ml. de Azúcares consumidas}}$$

4.3.3. Acidez titulable.

a) Medir volumétricamente 10 ml. del líquido -

fermentado.

b) Añadir 2 gotas de fenolftaleína S.I.

c) Valorar con solución decimonormal de hidróxido de sodio a rosa tenue.

d) Repetir el ensayo utilizando líquido no fermentado, éste es el blanco.

Cálculos:

(7)

$$mEq./l. = \frac{(V\ NaOH\ muestra - V\ NaOH\ Blanco)\ X\ Normalidad}{Alicuota}$$

Donde VNaOH muestra= Volumen de hidróxido de sodio consumida por la muestra.

VNaOH Blanco = Volumen de hidróxido de sodio consumida por el blanco.

Normalidad = Normalidad de la solución de hidróxido de sodio.

4.3.4. Determinación de pH final.

a) Medir potenciométricamente el pH del líquido fermentado.

4.3.5. Crecimiento micelial.

a) Transcurrido el tiempo designado a la fermentación, filtrar el líquido fermentado a través de papel filtro whatman # 1.

b) Lavar el micelio con agua destilada hasta que ésta quede transparente.

c) Secar a 70°C por 24 horas.

d) Secar un papel filtro húmedo sin muestra bajo las mismas condiciones.

8)

micelio/100 ml=(Peso papel y micelio seco)-(Peso papel seco)

4.3.6. Control microbiológico.

a) Con una asa estéril tomar una pequeña porción de micelio para hacer un microcultivo.

b) Con una asa estéril tomar una pequeña porción de líquido fermentado para hacer tinción de Gram.

c) Observar ambas preparaciones al microscopio.

5. R E S U L T A D O S .

5.1. VARIACION DE SACAROSA.

Bajo las condiciones de trabajos aplicadas, -- 4.2.1., al incrementar la concentración de sacarosa, la -- producción óptima de ácido itacónico, está en el rango de- 10 a 12.5% y a concentraciones de sacarosa superiores solo aumenta muy ligeramente la producción y la pendiente de la curva se hace casi cero.

El máximo aprovechamiento de sacarosa, se en-- cuenta en 10 g de sacarosa por 100 mililitros, observándo- se que no metaboliza más azucar a mayor cantidad adminis-- trada.

La acidez total del medio aumenta en la misma- proporción que el ácido itacónico hasta una concentración- aproximada de sacarosa de 12.5 g por 100 ml., en la cual - ocurre una desviación. La acidez total es sensiblemente ma- yor a la acidez provocada por el ácido itacónico.

El micelio presenta un ligero aumento según se incremente el azúcar administrada.

VARIACION DE SACAROSA

TABLA 5.1

CONSTANTES

pH	3.0
TEMPERATURA	28°C
TIEMPO	7 DIAS.

VARIANTES

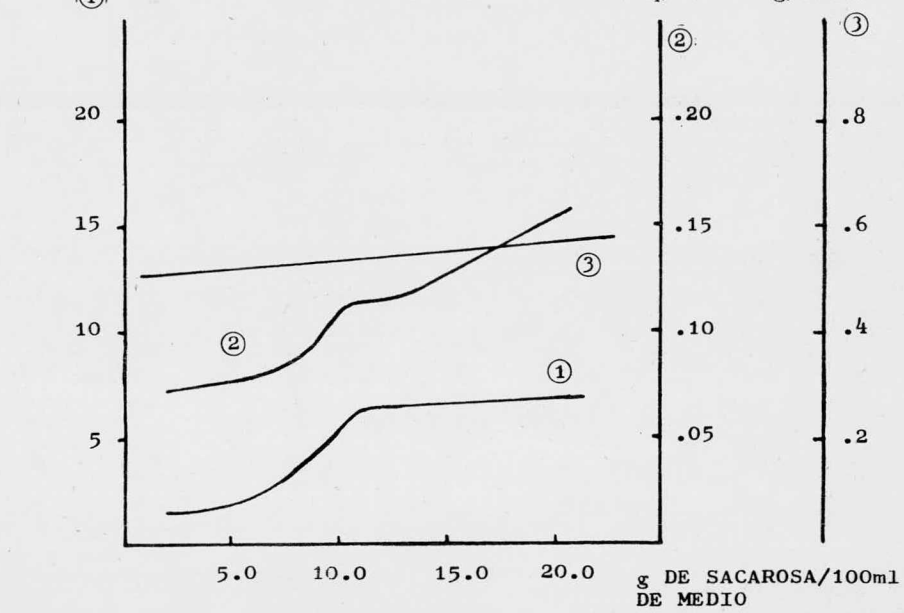
SACAROSA DE 2.5 A 20.0 %

. METODOLOGIA . CALCULO . GRAFICA	4.3.2. (4) (5) 5.1.2.		4.3.1	(6)	4.3.5. (8) 5.1.1.	4.3.3. (7) 5.1.1.	4.3.4.
VARIACION DE SACAROSA	AZUCAR CONSUMIDA g/100ml	AZUCAR CONSUMIDA %	ITACONICO g/100mlx10	RENDIMIENTO % DE ITACONICO POR AZUCAR CONSUMIDA	MICELIO g/100ml	ACIDEZ meq/lt	pH
2.5 %	2.5	100	1.34	5.36	0.629	0.072	2.16
5.0 %	5.0	100	1.938	3.876	0.5724	0.079	2.05
7.5 %	7.2	96	2.948	4.10	0.4904	0.084	2.16
10.0 %	9.0	90	5.402	6.00	0.5426	0.11	2.18
12.5 %	7.0	72	6.31	7.01	0.5227	0.0114	2.22
15.0 %	8.55	57	6.39	7.47	0.5727	0.0123	2.12
17.5 %	8.22	47	6.60	8.02	0.5693	0.144	2.15
20.0 %	6.4	32	6.70	10.47	0.5948	0.151	2.20

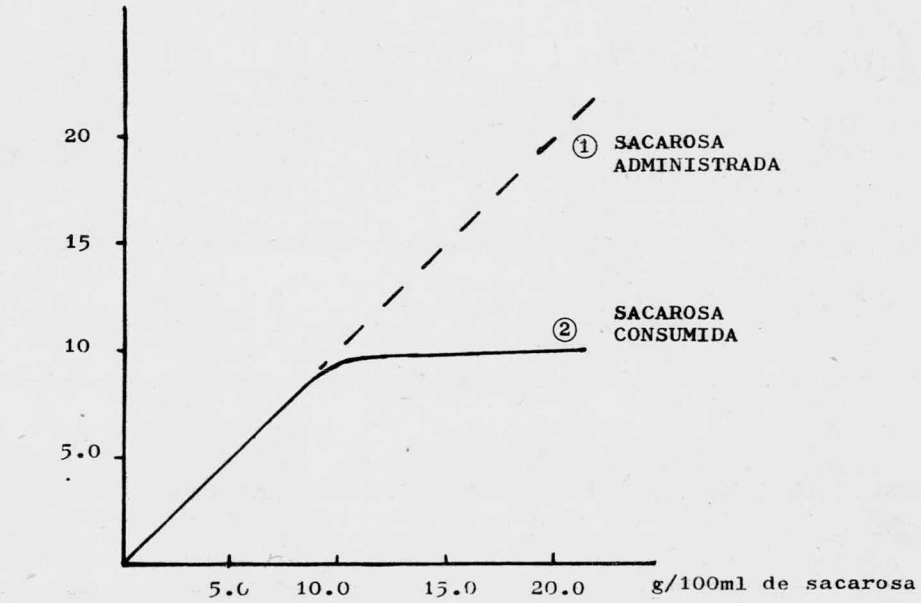
VARIACION DE SACAROSA

GRUPO 5.1

GRAFICA 5.1.1



GRAFICA 5.1.2



5.2. VARIACION DE MELAZAS.

Variación de melazas en concentraciones de 1 a 10%.

Bajo las condiciones de trabajo aplicadas, 4.2.2., solo hubo un ligero crecimiento micelial, con escasa producción de ácido itácónico a la concentración de melazas de - 1%. Las demás concentraciones no presentaron crecimiento - micelial.

Variación de melazas en concentración de 0 a 0.5%.

Sin embargo, bajo las mismas condiciones, 4.2.2., empleando sacarosa al 10% y variando las melazas a bajas concentraciones, la producción de ácido itacónico es óptima a concentración de 0.01% de melazas, sufriendo un marcado -- descenso, según aumenta la concentración de las mismas.

El Consumo de azúcar, es casi constante y la conversión de ella a ácido itacónico es mejor en 0.005% de melazas.

La acidez total se ve incrementada en el rango de --- 0.005 a 0.01%, consecuentemente, el pH final es más bajo.

VARIACION DE MELAZAS

TABLA 5.2.

CONSTANTES

pH 3.0 TIEMPO 7 D
TEMPERATURA 28°C
SACAROSA 10 %

VARIANTES

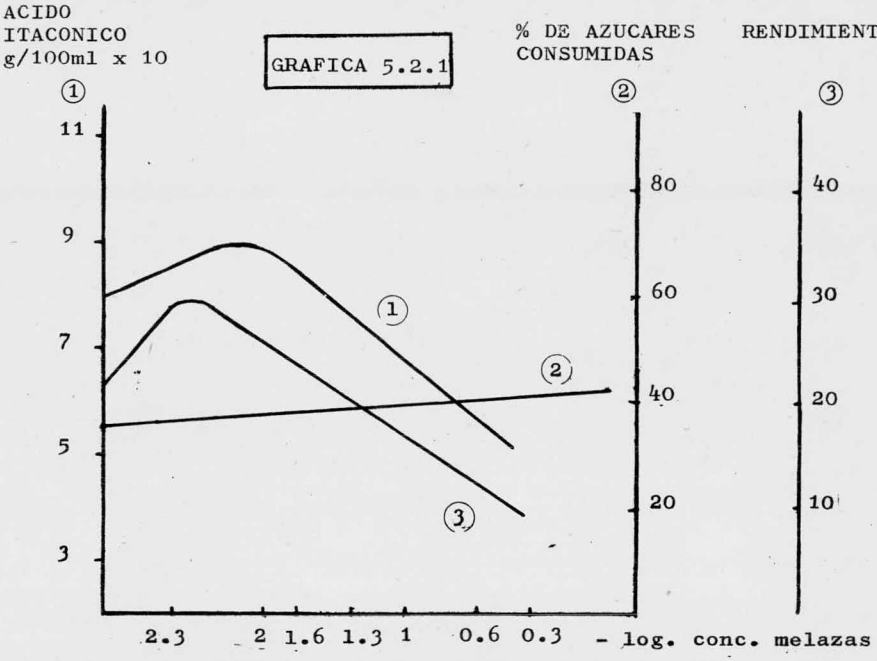
MELAZAS DE 0 A 0.5%

METODOLOGIA		4.3.2.		4.3.1.		4.3.5.	4.3.3.	4.3.4.
CALCULO		(4)	(5)	(1)	(6)	(8)	(7)	
GRAFICA		5.2.1		5.2.1.	5.2.1.	5.2.2.	5.2.2.	5.2.2.
% DE MELAZAS		AZUCAR CONSUMIDA g/100ml	%	ITACONICO g/100mlx10	RENDIMIENTO % DE ITACONICO POR AZUCAR CONSUMIDA	MICELIO g/100ml	ACIDEZ meq/lt	pH
%	- log.conc.							
0		3.552	35.52	8.02	22.58	1.8877	0.1374	2.20
0.005	2.3	2.943	29.41	9.207	31.28	1.9381	0.1562	2.15
0.01	2	3.869	38.65	9.708	25.01	1.9100	0.1614	1.025
0.025	1.6	4.037	40.27	5.213	12.91	2.1954	0.0949	2.65
0.05	1.3	3.600	35.84	7.912	21.78	2.0950	0.1205	2.45
0.075	1.1249	2.859	28.38	4.487	15.69	1.9852	0.0682	2.75
0.01	1	4.573	45.28	6.650	14.54	2.2150	0.1259	2.70
0.25	0.6	5.030	49.07	7.870	15.65	2.2250	0.1658	2.80
0.5	0.3	4.359	41.51	3.287	7.54	2.3420	0.1309	2.87

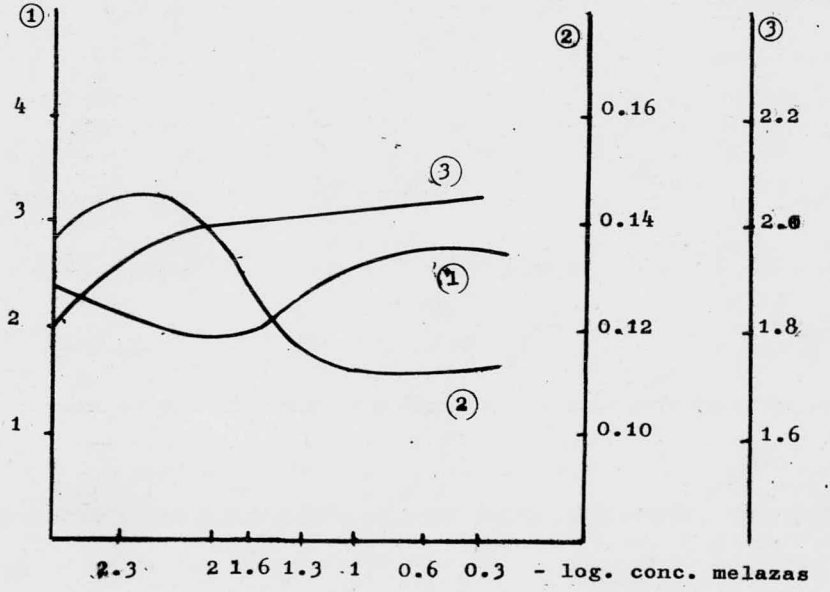
VARIACION DE MELAZAS

GRUPO 5.2.

GRAFICA 5.2.1



GRAFICA 5.2.2



5.3. EFECTO DE LA VARIACION DE pH INICIAL.

Bajo las condiciones de trabajo aplicadas, 4.2.3., - se presentó un rango de buena producción de ácido itacónico, entre los valores de 2.8 y 3.2. Se presentaron resultados similares en azúcares consumidas, conversión de azúcar a ácido itacónico y acidez total.

El crecimiento micelial es abundante a valor de pH - de 2 a 2.5, disminuye paulatinamente a valores mayores y- menores de este rango.

Un interesante fenómeno morfológico del hongo sucedió, las esférulas en el medio, aumentan en su diámetro - conforme se incrementó el pH inicial. El tamaño varió desde 1 milímetro de diámetro a valores de pH 2.0, hasta --- aproximadamente 1 centímetro a pH de 4.5.

EFECTO DE LA VARIACION DEL pH INICIAL

TABLA 5.3.

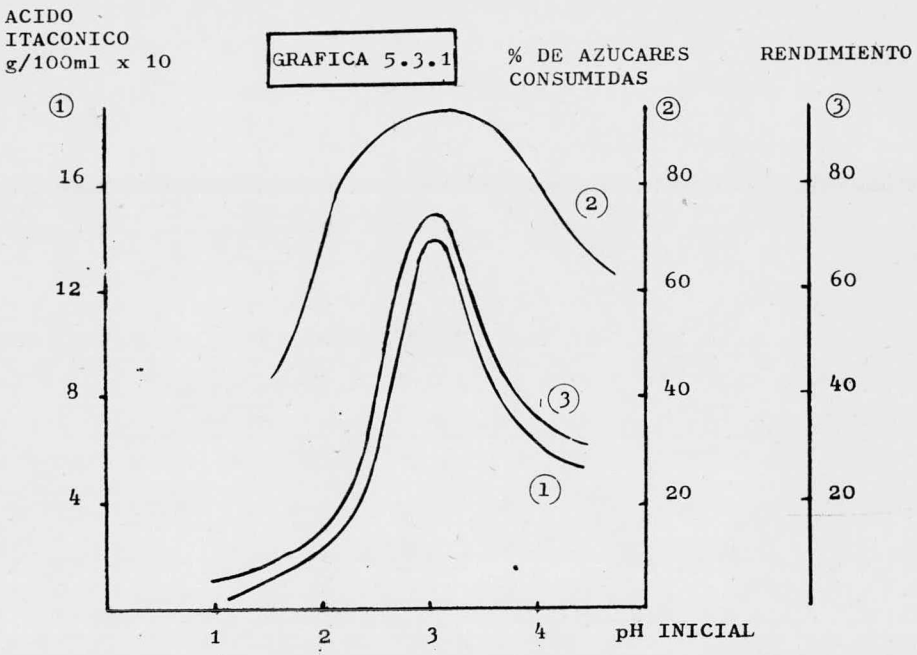
CONSTANTES	VARIANTES
TEMP. 28°C TIEMPO 7 D SACAROSA 10% MELAZAS 0.01%	pH DE 1.5 A 4.5

METODOLOGIA	4.3.2.		4.3.1.		4.3.5.	4.3.3.	4.3.4.
CALCULO	(4)	(5)	(1)	(6)	(8)	(7)	
GRAFICA	5.3.1.		5.2.1.	5.3.1.	4.3.5.	4.3.3.	4.3.4.
VARIACION DE pH	AZUCAR CONSUMIDA g/100ml	%	ITACONICO g/100mlx10	RENDIMIENTO % DE ITACONICO POR AZUCAR CONSUMIDA	MICELIO g/100ml	ACIDEZ meq/lt	pH
1.5	3.91	39.06	0.407	1.04	0.2010	0.0345	1.87
2.0	9.11	91.00	2.51	2.755	1.2441	0.0525	2.08
2.5	7.91	79.02	6.51	8.230	0.9181	0.0960	2.26
3.0	9.41	94.00	13.84	14.707	1.0580	0.1640	2.35
3.5	9.11	91.00	9.5	10.428	0.8870	0.1390	2.43
4.0	8.81	88.01	4.5	5.107	0.8482	0.0660	2.45
4.05	6.66	66.53	5.9	8.858	0.8097	0.0720	2.55

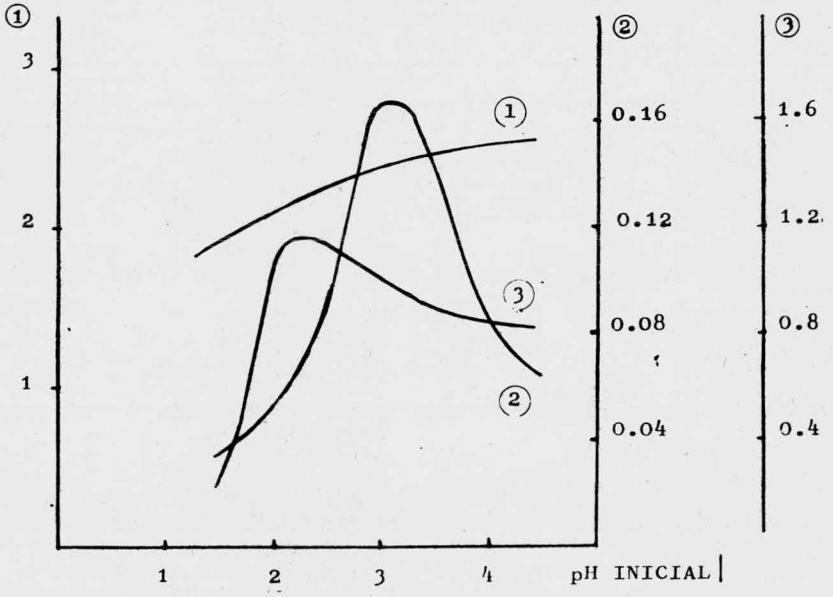
EFECTO DE VARIACION DE pH INICIAL

GRUPO 5.3.

GRAFICA 5.3.1



GRAFICA 5.3.2



5.4. EFECTO DE LA VARIACION DE TEMPERATURA.

Bajo las condiciones de trabajo aplicadas, 4.2.4., la producción de ácido itacónico presentó un óptimo entre 28- y 29°C, a estas temperaturas, el azúcar consumida, la conversión a ácido itacónico y la acidez total, encontraron - su máximo.

A temperaturas más altas, se favoreció el desarrollo- micelial, pero no la producción de ácido itacónico.

EFECTO DE LA VARIACION DE TEMPERATURA

TABLA 5.4.

CONSTANTES

pH 3.0 TIEMPO 7 D.
SACAROSA 10%
MELAZAS 0.01%

VARIANTES

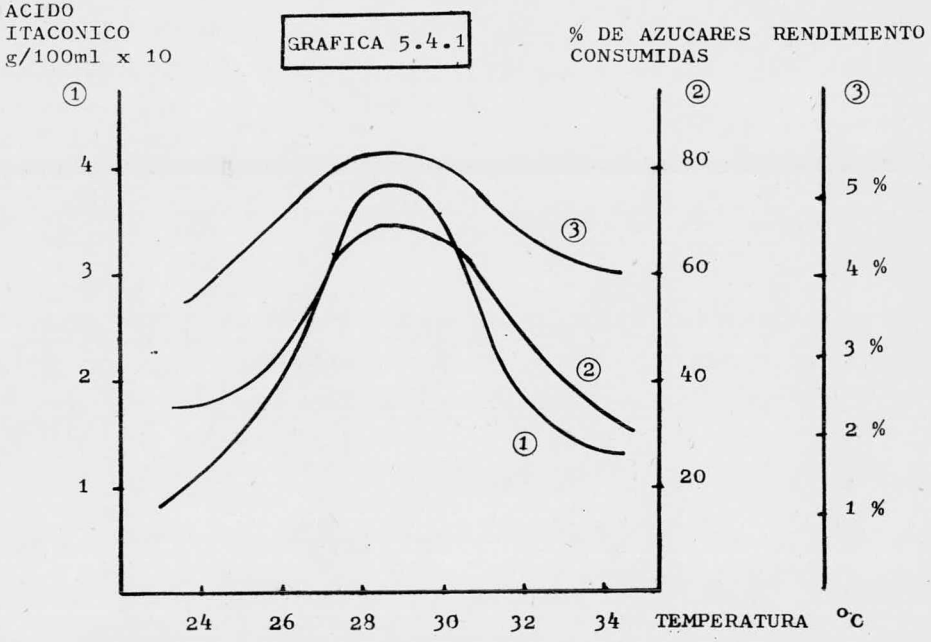
TEMPERATURA DE 24°C A 35°C

METODOLOGIA	4.3.2.		4.3.1.		4.3.5.	4.3.3.	4.3.4.
CALCULO	(4)	(5)	(1)	(6)	(8)	(7)	
GRAFICA	5.4.1		5.4.1.	5.4.1.	5.4.2.	5.4.2.	5.4.2.
VARIACION DE TEMPERATURA	AZUCAR CONSUMIDA g/100ml	%	ITACONICO g/100mlx10	RENDIMIENTO % DE ITACONICO POR AZUCAR CONSUMIDA	MICELIO g/100ml	ACIDEZ	pH
24°C	5.465	54.59	1.22	2.23	0.7047	0.0160	2.85
26°C	7.013	70.06	2.15	3.06	0.6443	0.0290	2.70
28°C	8.207	82.03	3.66	4.46	1.0436	0.0500	2.79
30°C	7.923	79.15	3.40	4.25	1.1075	0.0450	2.80
32°C	6.663	66.57	1.87	2.80	1.6540	0.0260	2.88
35°C	6.663	66.57	1.28	1.92	1.6217	0.0160	2.90

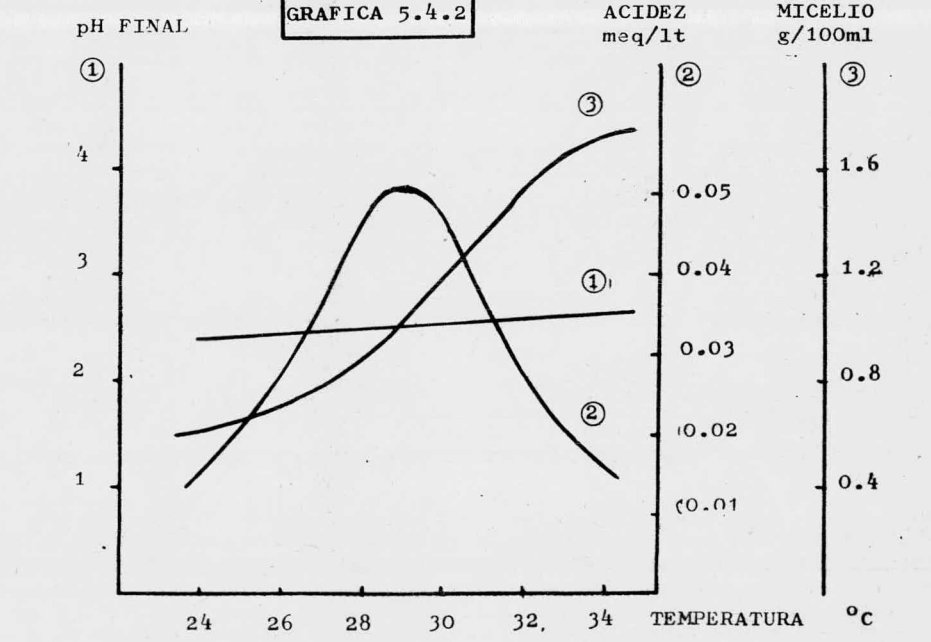
EFECTO DE LA VARIACION DE LA TEMPERATURA

GRUPO 5.4

GRAFICA 5.4.1



GRAFICA 5.4.2



5.5. EFECTO DEL TIEMPO DE FERMENTACION SOBRE LA PRODUCCION DE ACIDO ITACONICO.

Bajo las condiciones de trabajo aplicadas, 4.2.5., - los primeros 5 días, ocurrieron sin producción de ácido - itacónico, iniciándose ésta el sexto día, hasta alcanzar- un máximo de producción a los 10 días. A partir de entonces, la concentración de ácido itacónico se mantuvo prácticamente constante.

El consumo de azúcares guardó un comportamiento semejante a la producción de ácido itacónico, y el rendimiento fué óptimo a partir del octavo día de fermentación.

A los once días, presentó la máxima producción de -- ácidos totales. El pH final correspondió a estos resultados.

El crecimiento micelial fué logarítmico, y presentó- su máximo crecimiento en los días octavo a décimo.

EFECTO DE TIEMPO DE FERMENTACION

TABLA 5.5.

CONSTANTES

pH 3.0 TEMP. 28°C
SACAROSA 10%
MELAZAS 0.01%

VARIANTES

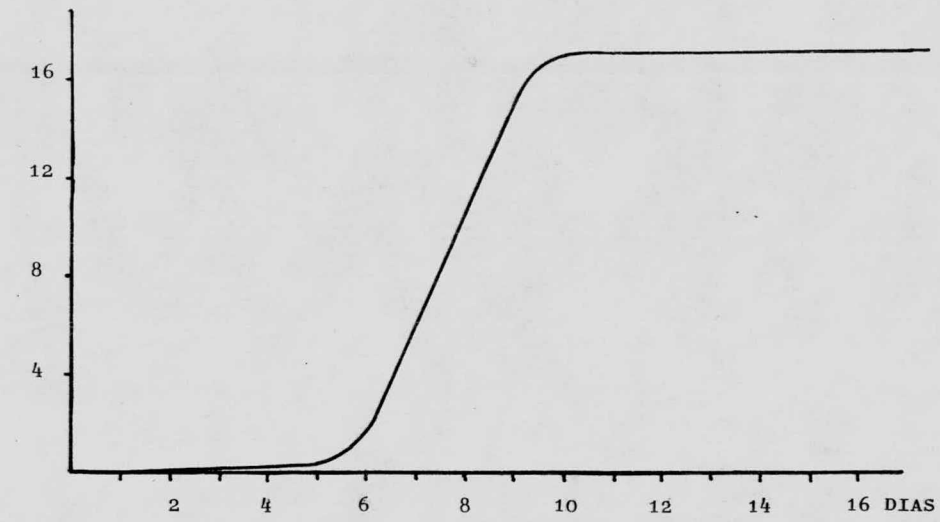
TIEMPO 17 DIAS DE FERMENTACION

METODOLOGIA	4.3.2.		4.3.1.		4.3.5.	4.3.3.	4.3.4.
CALCULO	(4)	(5)	(1)	(6)	(8)	(7)	
GRAFICA	5.5.2.		5.5.1.	5.5.2.	5.5.4.	5.5.3.	5.5.3.
D I A S	AZUCAR CONSUMIDA g/100ml	%	ITACONICO g/100mlx10	RENDIMIENTO % DE ITACONICO POR AZUCAR CONSUMIDA	MICELIO g/100ml	ACIDEZ meq/lt	pH
1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2102	0.011	3.08
2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.422	0.012	3.07
3	0.0913	0.95	0.0	0.0	0.4954	0.012	2.81
6	0.7510	7.828	0.6274	8.355	0.7225	0.026	2.32
7	3.3120	34.51	6.6504	20.079	0.9641	0.124	2.34
8	4.3150	37.78	8.7208	24.645	1.1468	0.1584	2.35
9	5.6056	56.00	14.3	25.51	1.05	0.29	2.20
10	5.9290	61.78	17.2535	29.10	1.0639	0.308	2.20
13	6.8300	71.16	17.8809	26.18	1.1502	0.3187	2.35
14	4.6180	48.12	10.9167	23.64	0.9552	0.198	2.03
15	6.0420	62.96	16.68	27.618	1.1152	0.243	1.99
16	5.9590	62.09	15.183	25.48	1.0714	0.267	1.90
17	6.3720	66.40	17.567	27.56	1.1742	0.324	1.88

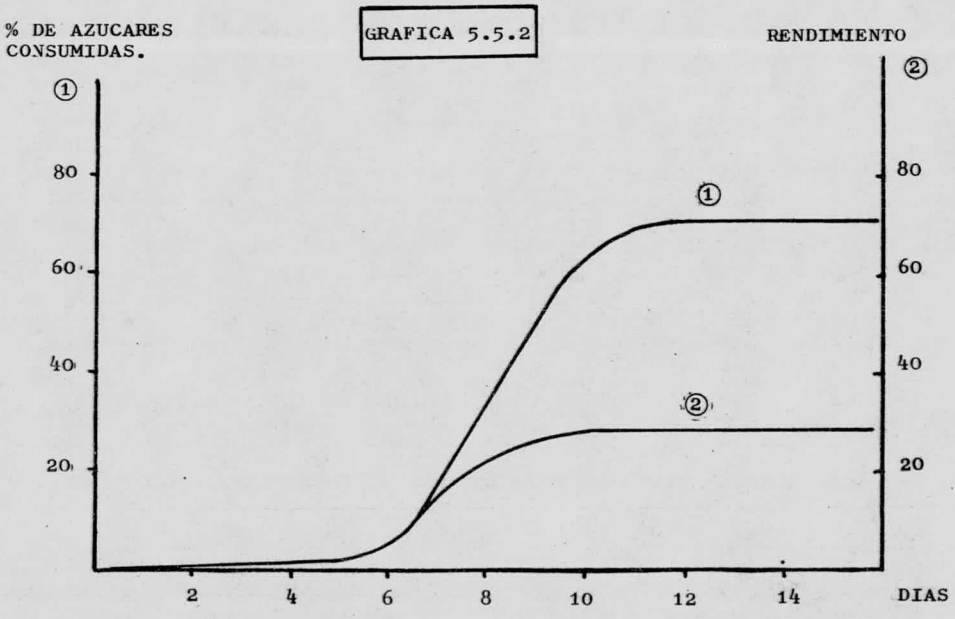
EFECTO DEL TIEMPO SOBRE LA FERMENTACION

GRUPO 5.5.

GRAFICA 5.5.1



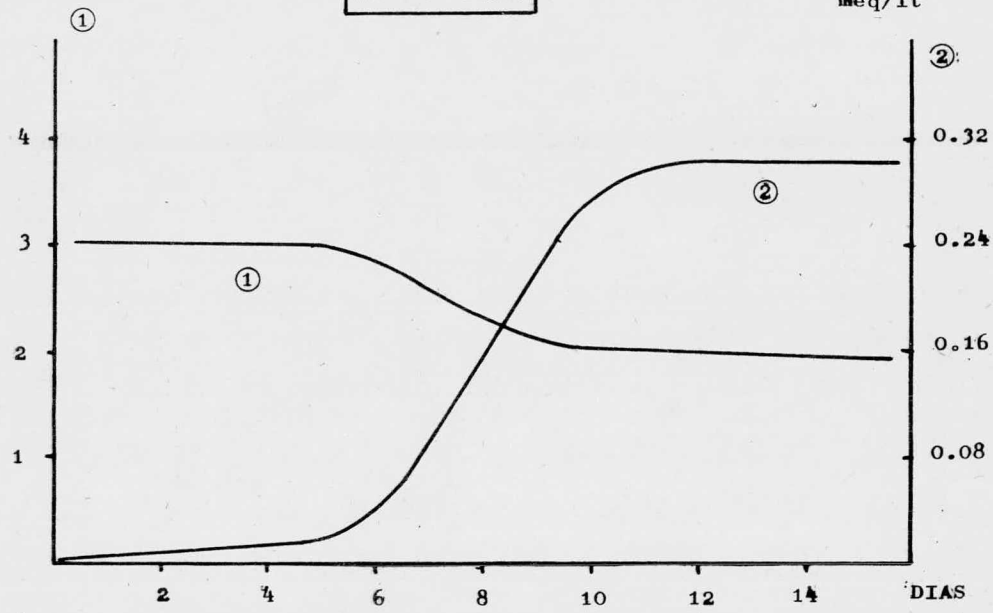
GRAFICA 5.5.2



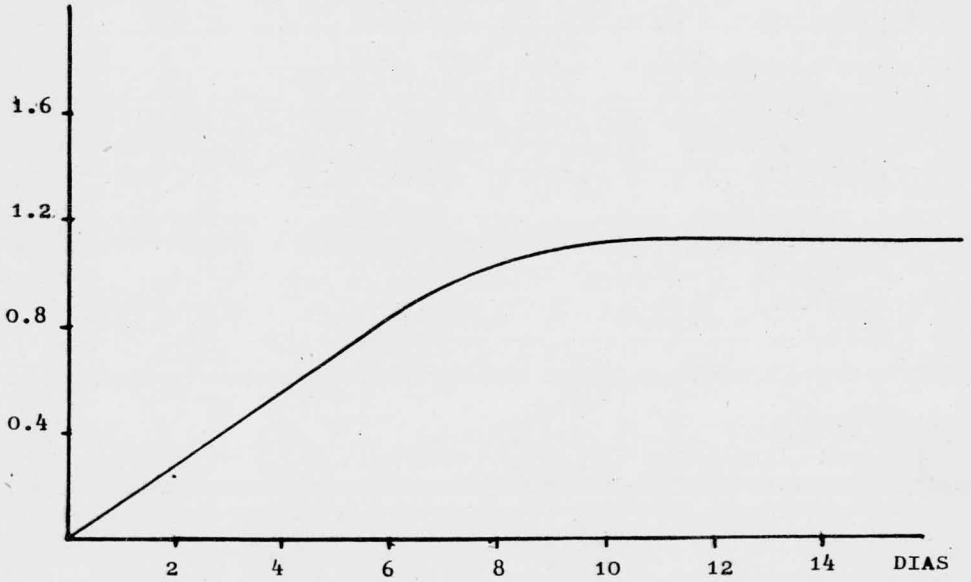
EFECTO DEL TIEMPO SOBRE LA FERMENTACION

GRUPO 5.5.

GRAFICA 5.5.3



GRAFICA 5.5.4



EFECTO DE TIEMPO DE FERMENTACION

TABLA 5.5.

CONSTANTES

pH 3.0 TEMP. 28°C
SACAROSA 10%
MELAZAS 0.01%

VARIANTES

TIEMPO 17 DIAS DE FERMENTACION

METODOLOGIA	4.3.2.		4.3.1.		4.3.5.	4.3.3.	4.3.4.
CALCULO	(4)	(5)	(1)	(6)	(8)	(7)	
GRAFICA	5.5.2.		5.5.1.	5.5.2.	5.5.4.	5.5.3.	5.5.3.
D I A S	AZUCAR CONSUMIDA g/100ml	%	ITACONICO g/100mlx10	RENDIMIENTO % DE ITACONICO POR AZUCAR CONSUMIDA	MICELIO g/100ml	ACIDEZ meq/lt	pH
1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2102	0.011	3.08
2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.422	0.012	3.07
3	0.0913	0.95	0.0	0.0	0.4954	0.012	2.81
6	0.7510	7.828	0.6274	8.355	0.7225	0.026	2.32
7	3.3120	34.51	6.6504	20.079	0.9641	0.124	2.34
8	4.3150	37.78	8.7208	24.645	1.1468	0.1584	2.35
9	5.6056	56.00	14.3	25.51	1.05	0.29	2.20
10	5.9290	61.78	17.2535	29.10	1.0639	0.303	2.20
13	6.8300	71.16	17.8809	26.18	1.1502	0.3187	2.35
14	4.6180	48.12	10.9167	23.64	0.9552	0.198	2.03
15	6.0420	62.96	16.68	27.618	1.1152	0.243	1.99
16	5.9590	62.09	15.183	25.48	1.0714	0.267	1.90
17	6.3720	66.40	17.567	27.56	1.1742	0.324	1.88

MELAZAS DE MORELOS

TABLA 5.6.

CONSTANTES

pH 3.0 TIEMPO 7 D.
TEMPERATURA 28°C
SACAROSA 10%

VARIANTES

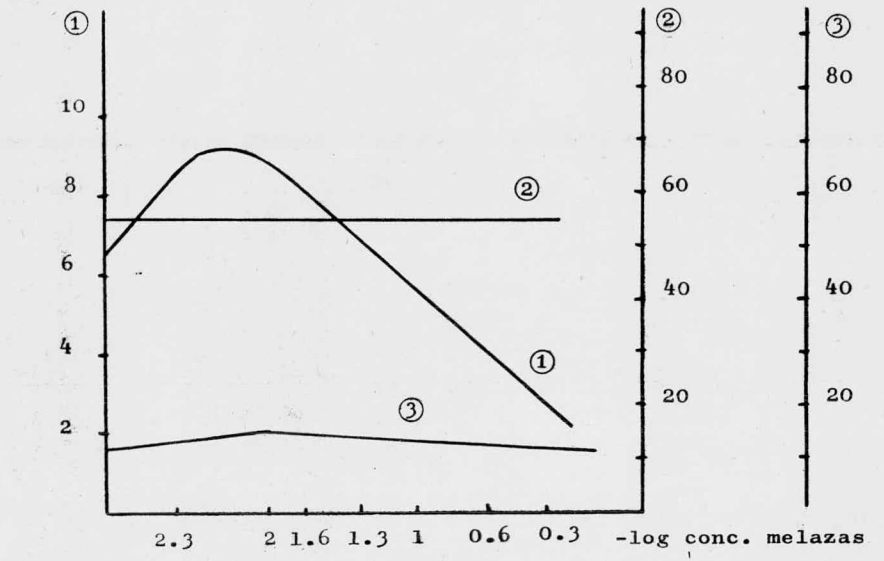
MELAZAS DE
0 A 0.25%

METODOLOGIA CALCULO GRAFICA	4.3.2. (4) (5) 5.6.1.		4.3.1. (1) 5.6.1	(6) 5.6.2.	4.3.5. (8) 5.6.2.	4.3.3. (7) 5.6.2.	4.3.4. 5.6.2.
% DE MELAZAS	AZUCAR CONSUMIDA g/100ml	%	ITACONICO g/100mlx10	RENDIMIENTO % DE ITACONICO POR AZUCAR CONSUMIDA.	MICELIO g/100ml	ACIDEZ meq/lt	pH
% -log conc.							
0	5.509	55.09	6.65	12.07	0.9152	0.13	2.05
0.005 2.3	5.678	56.75	8.79	15.445	0.9275	0.1649	2.05
0.01 2	5.703	57.00	8.87	15.498	0.9363	0.1732	1.99
0.025 1.6	5.107	50.94	4.797	9.39	0.8718	0.1377	1.90
0.05 1.3	5.334	55.068	6.387	11.97	0.9905	0.1278	2.15
0.075 1.1249	5.534	54.93	7.51	13.57	0.9698	0.1289	2.00
0.1 1	5.100	50.49	5.81	11.39	1.0550	0.095	2.15
0.25 0.6	5.660	55.22	6.574	11.61	1.3300	0.1005	2.40

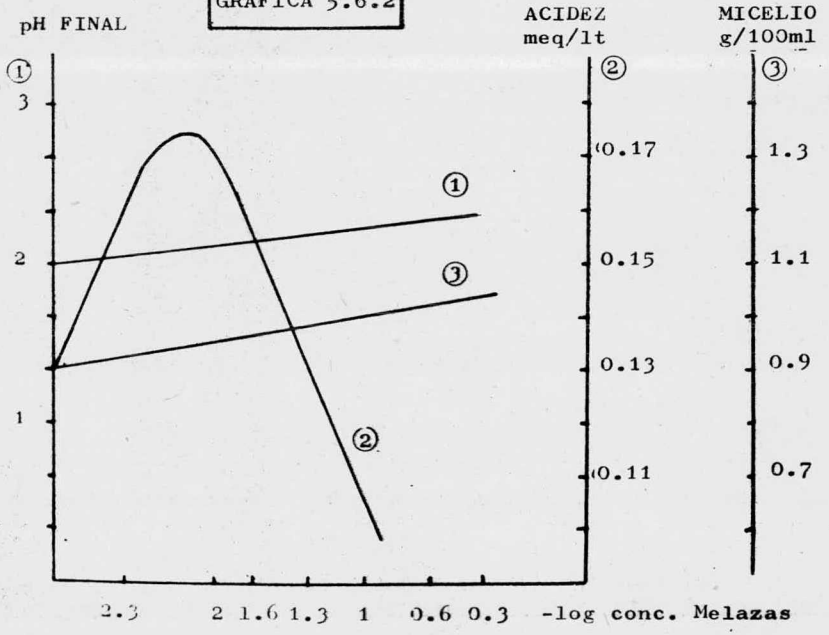
MELAZAS DE MORELOS

GRUPO 5.6

GRAFICA 5.6.1



GRAFICA 5.6.2



MELAZAS DE VERACRUZ

TABLA 5.6.

VARIANTES

pH 3.0 TIEMPO 7 D.
TEMPERATURA 28°C
SACAROSA 10%

CONSTANTES

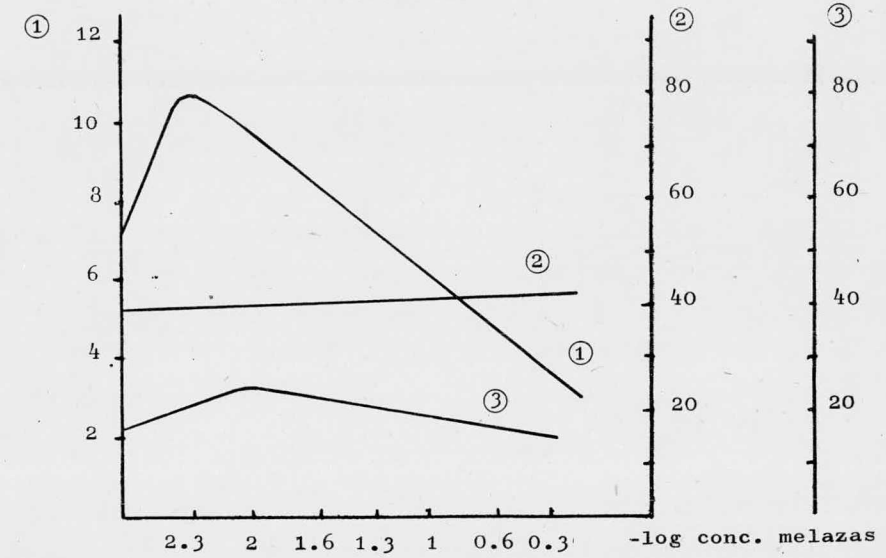
MELAZAS DE
0 A 0.25%

METODOLOGIA CALCULO GRAFICA		4.3.2. (4), (5) 5.6.3.		4.3.1. (1) 5.6.3.	(6) 5.6.3.	4.3.5. (8) 5.6.4.	4.3.3. (7) 5.6.4.	4.3.4. 5.6.4.
% DE MELAZAS		AZUCAR CONSUMIDA g/100ml	%	ITACONICO g/100mlx10	RENDIMIENTO % DE ITACONICO POR AZUCAR CONSUMIDA.	MICELIO g/100ml	ACIDEZ meq/lt	pH
%	-log conc.							
0		4.05	40.5	7.277	17.96	0.6019	0.158	2.05
0.005	2.3	4.435	44.325	10.916	24.69	0.6644	0.2164	2.05
0.01	2	3.798	37.94	8.375	21.84	0.6237	0.1617	2.17
0.025	1.6	3.650	36.41	9.677	26.69	0.6907	0.1922	2.10
0.075	1.1249	4.631	45.96	7.76	17.03	0.6828	0.1508	2.25
0.1	1	4.096	40.55	6.65	16.64	0.7470	0.1224	2.65
0.25	0.6	0.765	7.46	6.085	1.18	0.0100	0.1289	2.60

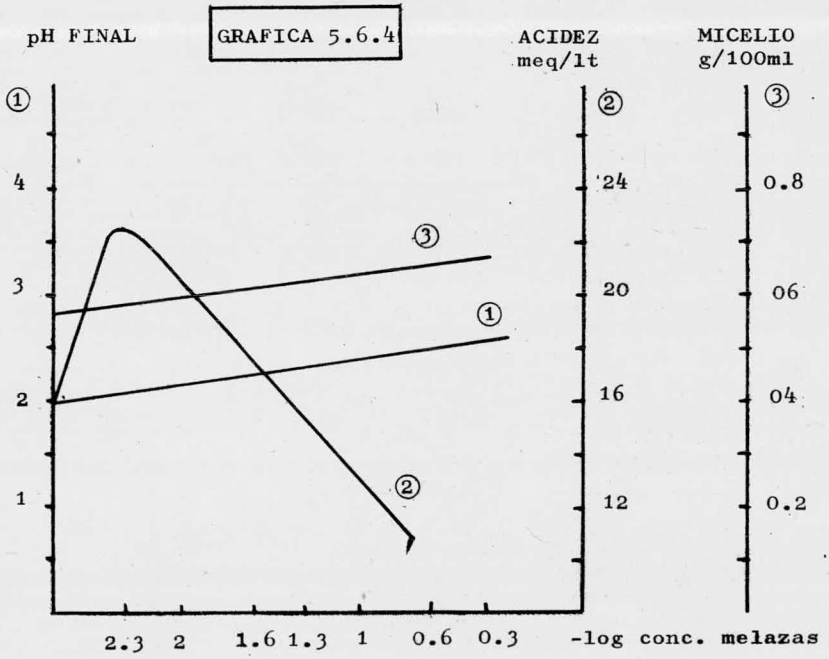
MELAZAS DE VERACRUZ

GRUPO 5.6

GRAFICA 5.6.3



GRAFICA 5.6.4



6. D I S C U S I O N .

Si bien es cierto, que en la Industria de fermentaciones, es muy importante el empleo de fuentes nutritivas de bajo costo y fácil disponibilidad, no debemos olvidar que una fermentación se ve afectada por la fisiología del microorganismo, por lo cual, pueden utilizarse los nutrimentos como fuente de carbono o como factor estimulante de producción.

A través de este trabajo, se destaca la importancia del uso de las melazas a bajas concentraciones, de 0.005 a 0.01%, como un factor activador de la producción de ácido itacónico por Aspergillus terreus, e inhibidor a concentraciones mayores de 1%.

La producción de ácido itacónico se ve sensiblemente incrementada en la fermentación con sacarosa-melazas, respecto de sacarosa pura, a causa de posibles oligoelementos contenidos en las melazas.

Se efectuó un estudio comparativo empleando tres melazas de diferente origen y se encontró este factor de estimulación de la fermentación en todas, por lo que se supone que los elementos estimuladores, se encuentran presentes en las tres.

Debido al efecto inhibidor de las melazas en concentraciones mayores de 1%, se adicionó sacarosa al medio de cultivo como fuente de carbono, siendo 10% la concentración óptima, valorada a través de la asimilación por el hongo, así como por la conversión y producción de ácido itacónico.

A concentraciones de sacarosa mayores del 10%, se desvía el metabolismo a otros ácidos orgánicos, baja el rendimiento y dificulta la purificación del ácido itacónico. Ahora bien, utilizando las melazas a bajas concentraciones y sacarosa al 10%, este efecto no se produce y se observan curvas paralelas de producción de ácido itacónico y acidez total.

El pH inicial de 3.0, acepta sólo una pequeña variación de $\pm$ 0.25 unidades, para una fermentación óptima. Durante el proceso de fermentación, se produce un aumento paulatino de la acidez del medio llegando a un valor de pH de 2.0 alrededor del séptimo día de fermentación, con una consecuente inhibición de la producción del ácido itacónico.

Es de esperar que en todas las fermentaciones, el pH-final se encuentre por debajo del inicial, sin embargo, a-valores de pH menores del óptimo, el pH final es ligeramente superior quizá al poco crecimiento micelial, poca pro--

ducción de ácido itacónico y un consumo de iones ácidos por el microorganismo.

A valores de pH mayores que el óptimo, el ácido itacónico acumulado es suficiente para modificarlo.

Por otro lado, el máximo crecimiento micelial, se obtuvo cuando las fermentaciones llegaron al nivel de 2.0 en el pH aunque no coincidió con el valor óptimo de producción de ácido itacónico. En general, los resultados de la variación de melazas, temperatura y tiempo, nos indicaron que un máximo de crecimiento micelial, no se asocie a la producción de ácido itacónico. Altas temperaturas, 32 a 35°C, favorecen el desarrollo micelial abundante y no la producción del ácido itacónico.

Pequeñas cantidades de inóculo, aseguran un desarrollo micelial adecuado.

A partir del noveno día de fermentación, el micelio alcanza su fase estacionaria y la conversión de sacarosa a ácido itacónico se mantiene constante. Así, la producción óptima está comprendida entre 9 y 10 días de fermentación.

7. RESUMEN Y CONCLUSIONES.

La producción del ácido itacónico a nivel de laboratorio, por la cepa de Aspergillus terreus NRRL 265, en un medio de cultivo compuesto de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.6%, NH_4NO_3 0.3%, KCl 0.005% NaH_2PO_4 0.015% y sacarosa 10%, se mejora cuando se adicionan melazas en concentraciones entre 0.005 a 0.01%

Estas concentraciones en el medio, se vieron favorecidas a valor de pH 3.0, temperatura de 28 a 30°C y a los 10 días de fermentación.

Probablemente, los oligoelementos contenidos en las melazas, sean los responsables de la estimulación de la fermentación bajo todas las condiciones estudiadas.

B I B L I O G R A F I A

1.- ALEXOPOULUS. Introductory Micology. John Wiley and Sons, Inc., New York, London. 2a. Edición. 1952.

2.- ANUARIO ESTADISTICO DEL COMERCIO EXTERIOR DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS. SECRETARIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO. DIRECCION GENERAL DE ESTADISTICA. 1974, 1975,1976

3.- AYRES, Gilbert H. Análisis Químico Cuantitativo. Ediciones del Castillo, S. A. Madrid 1970.

4.- BANES F. W. and E. Arundale (to Esso Research and Engineering C.), U.S.Pat. 2,771,459), 1956.

5.- BARRET, H.L. and B.B. Hunter. Illustrated genera of imperfect fungi. Burguess Publishing Company. Mineapolis, Minnesota, 3a. Edición.

6.- BARTLETT J.H. (to Standard Oil Development Co.), U.S. Pat. 2,666,747, 1954.

7.- BAUER, L.N., H.T. Neher, and W.L. Van Horne (to Rohm & Haas Co.), U.S.Pat. 2,731,448. 1956.

8.- BENTLEY, R. and C.P. Thiessen. J.Biol. Chem., 226,673. 1957.

9.- BINDLEY, W.W. and M.L. Wolfrom. Composition of cane final molasses. Scientific Report Series, 15, Sugar Res. Foundation, Inc., New York, 1953.

10.- BROWN and Zerban. Sugar analysis. John Wiley and Sons, London. 3a. Edition. 1941.

11.- CASIDA, L.E., Jr. Industrial Microbiology. John Wiley and Sons, Inc. New York, London, Sidney. 1968.

12.- Chem. High Polymers (Tokyo) 17, 748, 1960.

13.- CROWELL, J.H. (to National Aniline), U.S.Pat. 2,258,947, 1941.

14.- D'ALELIO, G.F.: Patente americana 2,279,883, 14 de Abril de 1942.

15.- D'ALELIO, G.F.: Patente americana 2,279,883, 14 de abril 1942.

-: Patente americana 2,279,881, 14 de abril de 1942

-: Patente americana 2,279,882, 14 de abril de 1942

-: Patente americana 2,279,885, 14 de abril de 1942

-: Patente americana 2,298,039, 6 de octubre de 1942.

-: Patente americana 2,310,731, 9 de febrero de 1943.

16.- D'ALELIO, G.F.: Patente americana 2,340,110, 25 de - enero de 1944.

17.- D'ALELIO, G.F.: Patente americana 2,366,495, 2 de enero de 1945.

-: Patente americana 2,531,408, 28 de noviembre de 1950.

-: Patente americana 2,531,410, 28 de noviembre de 1950.

-: Patente americana 2,583,325, 22 de enero de 1952.

-: Patente americana 2,687,400, 24 de agosto de 1954.

-: Patente americana 2,583,326, 22 de enero de 1952.

18.- D'ALELIO, G.F.: Patente americana 2,297,290, 29 de septiembre de 1942.

-: Patente americana 2,340,108, 25 de enero de 1944.

19.- D'ALELIO, G.F.: Patente americana 2,323,706, 6 de julio de 1943.

Ellis, C.: Patente americana 2,195,362, 26 de marzo - de 1940.

20.- DAZZI, J. and J. E. fields (to Monsanto Chemical Co.), U.S. Pat. 2,727,006, 1955.

21.- DOROUGH, G.L.: Patente americana 2,384,239, 4 de septiembre de 1945.

22.- ENGELS, B.G. and Co. Helv. Chim. Acta, 316, 55, 1949.

23.- FEAGIN, R. C. and C.G.Prange.: Patente americana ---- 2,318,845, 11 de mayo de 1943.

24.- FRIEDKIN, M. "Determinatión of Itaconic Acid in Fermentation liquors". Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 17(10); 637-638,1945.

25.- GIAMMARIA J.J. (to Socony-Vacuum Co.), U.S.Pats. 2,616,853, 1952.

26.- HEDRICK, R.M. and D.T. Mowry.: Patente americana 2,625,529, 1953.

27.- HULL, E.H., J.M. Leach, and B.E. Tate (To Chas.Pfizer & Co., Inc.) U.S. Pat. 3,055,873, 1962.

28.- INDEX MERCK THE, An Encyclopedia of Chemicals and Drugs. 9a. Editión. Published By Merck & Co., Inc. Rahway, N.J. U.S.A.

29.- KNUTH, C.J. and P.F. Bruins. Ind. Eng. Chem., 47, - 1572, 1955.

30.- LEHNINGER, Albert L. Bioquímica. Ediciones Omega, S.A. Barcelona, 1972.

31.- LIPPINCOTT, S.B. and L.A. Mikeska.: Patente americana 2,542,542, 20 de febrero de 1951.
Giammaria, J.J.: Patente americana 2,616,849, 4 de noviembre de 1952.

32.- LOCKWOOD, L.B. and G.E. Nelson. "Some factors Affec-- ting the Production of Itaconic Acid By Aspergillus - terreus in Agitated Cultures". Arch. Biochem. 10(3) - 365-374, 1946.

33.- LOCKWOOD L.B. and M.D. Reeves. "Some Factors Affecting the Production of Itaconic Acid by Aspergillus terreus" Arch. Biochem. 6: 455-469, 1945.

34.- MARVEL C.S. and T.H. Shepherd. J. Org. Chem. 24, 599, 1959.

35.- McLAUGHLIN P.J., W.W. Toy, and T.E. Bockstahler (to Rohm & Haas Co.), U.S. Pat. 2,790,736, 1957.

36.- MICHEL, R.H. (to E. I. du Pont de Nemours & Co., Inc.) U.S. Pat. 2,762,720, 1956,

37 MIXON L.W. and R.W. Watson (to Standard Oil Co.) U.S.- Pat. 2,672,446, 1954.

38.- MORGAN, J.G. (to E.I. du pont de Neumours & Co., Inc.) U.S. pat 3,021,229, 1962.

39.- MOYER, A.J. and R.D. Coghill. "The Laboratory Scale - Production of Itaconic Acid by Aspergillus terreus". Arch. Biochem. 7: 167-183, 1945.

40.- NAGAI S. and K. Yoshida. Chem. High Polymers (Tokyo) 17, 77, 1960.

41.- NELSON, G.E.N., D.H. Traufler, S.E. Kelley, and L.B. Lockwood. "Production of Itaconic Acid by Aspergillus terreus in 20-Liter Fermentors". Ind. Eng. Chem. 44(5): 1166-1168, 1952.

42.- PFEIFER V.F., C. Vojnovich, and E.N. Heger. "Itaconic Acid by Fermentation with Aspergillus terreus". Ind. Eng. Chem. 44(12): 2975-2980, 1952.

43.- PITZL G. (to E.I. du Pont de Nemours & Co. Inc.) U.S. Pat. 2,570,478, 1951.

44.- PRESCOTT, S.C. and C.G. Dunn. Industrial Microbiology. McGraw-Gill Book Co. Inc., New York. 3a. Edition.1959.

45.- ROBERTS, E.J., J.A. Ambler (to U.S. Secretary of Agriculture), U.S. Pat. 2,448,831, 1948.

46.- ROSE, A.H. Industrial Microbiology. Ed. Butterworths. Washington. 1961.

47.- SHRINER et al., in Organic Synthesis. Vol. II, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1931.

48.- SWINDELLS, F.E. (to E.I. du Pont de Nemours & Co., Inc.) U.S.Pat 2,698,235, 1954.

49.- TATE, B.E. and E.H. Hull, private comunication.

50.- TOWERS, C.C., A.E. Oxford and H. Raistrick. "Itaconic Acid, a Metabolic Product of a Strain of Aspergillus terreus Thom". Biochem. J. 33:1488-1495, 1939.

51.- TUTWILER, T.S. (to Standard Oil Development Co.), U.S. Pat. 2,637,698, 1953.

52.- UNDERKOFLER, L.A. and R.J. Hickey. Industrial Fermentations. Ed. Chemical Publishing Co., Inc., New York. Vol I. 1954.

53.- VAN DER WESTHUIZEN, C.J.P. Spruit and H.H. Sephton. "Itaconic Acid. I.- Production by Aspergillus terreus from Unrifined Cane Sugar. Jour. Appl. Chem. I:356-360, 1951.

Este Trabajo se imprimió en los Talleres Gráficos de Guadarrama Impresores, S. A. Av. Cuauhtémoc 1201, Col. Vértiz Narvarte, México 13, D. F., Tel. 559 22 77, con 3 líneas.