



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

OBTENCION DEL ACIDO GLUTAMICO CON
MICROCOCCUS GLUTAMICUS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :

ALFONSO LUIS HACES CAJIGA



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 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.

CLAS TESIS 1979

ABO M.T. 1637

FECHA _____

PREC _____



PROTECCIÓN DEL ÁCIDO GLUTÁMICO CON

MICROORGANISMOS GLUTÁMICOS

T E S I S

CON LA PARTICIPACIÓN DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES Y FARMACIA

ALFONSO LUIS HACES CALBA

Jurado asignado originalmente según el tema:

Presidente: Natalia Salcedo Olavarrieta.
Vocal: Ninfa Guerrero de Callejas.
Secretario: Emilio Barragán Hernández.
1er. Suplente: Jorge Soto Soria.
2o. Suplente: Wenceslao Fuentes Solís.

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Tecnología de Alimentos.
Facultad de Química.

Sustentante:

Alfonso Luis Haces Cajiga.

Asesor del tema:

Emilio Barragán Hernández.

A MI PADRE Y A MI MADRE

Al Ingeniero Emilio Barragán
por su valiosa ayuda y cons-
tante apoyo.

I N D I C E

	pag.
Introducción.	1
1.0 Codiciones de cultivo.	3
1.1 Fuente de carbono.	
1.2 Fuente de nitrógeno.	
1.3 Sales inorgánicas.	
1.4 Factores de crecimiento.	
1.5 Otros componentes.	
1.6 Potencial hidrógeno.	
1.7 Aeración y agitación.	
1.8 Temperatura.	
2.0 Mecanismo bioquímico de acumulación.	6
2.1 Ruta metabólica.	
2.2 Función de la biotina.	
3.0 Efecto de varios agentes en la formación del - ácido glutámico.	18
3.1 Efecto de la penicilina.	
3.2 Efecto de los tensoactivos.	
4.0 Regulación de la membrana celular.	19
4.1 Relación de aminoácidos libres intracelulares.	
4.2 Principales transformaciones celulares.	
4.3 Cambios de lípidos en la membrana celular.	

5.0 Alteraciones en la producción del ácido - glutámico.	24
5.1 Acido láctico.	
5.2 Acido succínico.	
5.3 Acido alfa-cetoglutárico.	
5.4 Acumulación de glutamina.	
6.0 Especificaciones del ácido glutámico.	26
7.0 Usos y toxicidad.	26
8.0 Materiales y métodos.	38
8.1 Características generales de <u>Micrococcus glutamicus</u> .	
8.2 Descripción del equipo.	
8.3 Medio de mantenimiento.	
8.4 Medio de crecimiento.	
8.5 Medio de inducción.	
8.6 Técnicas de análisis.	
9.0 Parte experimental.	48
9.1 Mantenimiento del microorganismo.	
9.2 Crecimiento del microorganismo.	
9.3 Inducción del microorganismo.	
9.4 Producción del microorganismo.	
9.5 Extracción del ácido glutámico.	
10.0 Resultados.	54

11.0 Discusión.	67
12.0 Conclusiones.	74
Bibliografía.	

INTRODUCCION.

Uno de los grandes problemas que afronta el país es, sin duda, el alto volumen de importaciones de manufacturas y materias primas, y de estas últimas, las de la rama de productos químicos producen una fuerte fuga de divisas, desequilibrando la balanza comercial del país.

El glutamato monosódico es de los productos químicos de importación que ocupa de los primeros lugares en cuanto al valor de la compra, siendo el ácido glutámico el antecesor inmediato en la formación del glutamato monosódico, se presenta la viabilidad del estudio para la obtención del mismo, mediante la tecnología adaptada a los recursos que se tienen.

La obtención es por medio de diferentes microorganismos, ya que así lo han demostrado numerosos estudios reportados - al respecto, principalmente en el Japón, los cuales han utilizado diferentes tipos de sustrato, desde glucosa, melazas, hasta derivados del petróleo. Con esto se presenta la alternativa de utilizar productos de desecho, o secundarios que abatirán los costos de producción, y con derivados del petróleo.

El descubrimiento del glutamato monosódico fue hecho por K. Ikeda en 1908, siendo la industria alimentaria la principal consumidora. La demanda aumentó principalmente después -

de la segunda guerra mundial, y en consecuencia se tiene la necesidad de encontrar mejores métodos de obtención, siendo dos los métodos encontrados, el primero consiste en la conversión bioquímica, mediante el empleo de un microorganismo, y la segunda por síntesis química, esta última con el problema del racemato formado, pues la forma activa es la levó-gira. En 1957, dos grupos de investigadores, en forma independiente, encontraron una bacteria capaz de producir eficientemente el ácido L-glutámico a partir de glucosa y una sal de amonio. Micrococcus glutamicus es el primer microorganismo usado para la fermentación directa a escala industrial del ácido L-glutámico por Kyowa Hakko Co. Ltd., después de este suceso, se desarrollaron diferentes métodos de fermentación para satisfacer la gran demanda mundial del glutamato monosódico.

Este estudio parte de glucosa como sustrato y mediante la utilización de una bacteria que es Micrococcus glutamicus.

1.0 Condiciones de cultivo.

1.1 Fuente de carbono.

La fuente de carbono no sólo sirve para proporcionar las unidades de carbono que se requieren para la formación del ácido glutámico, sino también para satisfacer los requerimientos de energía para su biosíntesis. La glucosa, sacarosa, fructosa, maltosa, ribosa, y xilosa pueden ser usadas como fuente de energía y de carbono. Principalmente son usadas la glucosa y la sacarosa. Para fines industriales se emplean hidrolizados de melazas, requiriéndose una técnica específica por su alto contenido de biotina.

1.2 Fuente de nitrógeno.

El nitrógeno, al igual que el carbono, es un constituyente principal en la obtención del ácido glutámico. La fuente puede ser inorgánica u orgánica, siendo los cloruros, sulfatos y fosfatos de amonio y la urea, respectivamente, los más utilizados. Durante la biosíntesis se requieren grandes cantidades de ión amonio, que se va agregando en pequeñas cantidades, ya que altas concentraciones del mismo producen inhibición de la producción del ácido glutámico.

1.3 Sales inorgánicas.

Los iones inorgánicos generalmente usados en el medio, son los cationes K^+ , Mg^{++} , Fe^{++} , y Mn^{++} , y los aniones PO_4^- , SO_4^- y Cl^- . Las cantidades aproximadamente son; de 0.05 al 0.2% de KH_2PO_4 y de K_2HPO_4 , del 0.025 al 0.1% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$.

del 0.0005 al 0.01% de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, y del 0.0005 al 0.005% de $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Los iones fierro, potasio y manganeso, son factores determinantes, especialmente este último, para la producción del ácido glutámico. (13).

Es necesaria mayor cantidad de iones potasio para la producción del ácido glutámico que la requerida para el crecimiento de las células; según estudios de Shio (13) se requiere cerca del 0.01% de potasio para el crecimiento, mientras que es necesario del 0.02 al 0.1% de potasio para la producción del ácido glutámico, siendo proporcional la cantidad de ácido glutámico producido a la cantidad de potasio. Existen otras bacterias que requieren ciertas cantidades de otros iones como el zinc para Microbacterium ammoniaphilum; y cobalto para Corynebacterium alkanolyticum. (2).

1.4 Factores de crecimiento.

El principal factor es la biotina durante la producción del ácido glutámico, siendo éste esencial para las bacterias productoras de ácido glutámico. La concentración de biotina para la producción de ácido glutámico debe ser inferior a la necesaria para el crecimiento. Algunas cepas requieren además de biotina, tiamina y cistina.

1.5 Otros componentes.

La adición de citratos tiene dos finalidades, que son: la de inhibir el crecimiento de bacteriófagos durante la fermentación y como precursor en la biosíntesis del ácido glutámico.

co, como se verá en la ruta metabólica. (2,4). También se pueden utilizar ácido oxálico, polifosfatos y ácido cítrico. (13).

1.6 El potencial hidrógeno.

El pH óptimo para el crecimiento de la bacteria productora de ácido glutámico se encuentra entre siete y ocho. Durante la fermentación se ajusta frecuentemente el pH del medio, tendiendo éste a bajar por la formación del ácido glutámico u otros ácidos. (13). La adición constante de hidróxido de amonio cumple dos funciones, una la de ajustar el pH y la de proveer de nitrógeno. La urea puede reemplazar al hidróxido de amonio, debido a que las bacterias productoras de ácido glutámico poseen ureasa (fig. 1). (11,13).

1.7 Aereación y agitación.

El valor K_d (coeficiente de transferencia de oxígeno) óptimo en el proceso es de 3 a 5 x 10^{-6} mol O_2 /atm.min.ml. (13). En condiciones deficientes de oxígeno, la producción de ácido glutámico disminuye y aumenta la cantidad de ácido láctico y ácido succínico; si la cantidad de oxígeno se incrementa la concentración de ácido cetoglutárico aumenta. Lo adecuado es mantener baja la aereación durante la fase de crecimiento, seguida del nivel normal de aire en la fase estacionaria. (13,18).

1.8 Temperatura.

La temperatura óptima para la fermentación es de 30° a 35°. C. Cuando las temperaturas de propagación y la de producción

son las mismas. el rendimiento de ácido glutámico aumenta, - pero si éstas fuesen diferentes, el rendimiento sería menor. (11,13).

[Es necesario mantener la temperatura óptima constante, debido a que cambios en ésta provocan que los requerimientos - nutricionales varíen, además de desviaciones en la biosíntesis como acumulación de ácido láctico.] (13).

2.0 Mecanismo bioquímico de acumulación.

2.1 Ruta metabólica.

En varios microorganismos el metabolismo de glucosa es -- por medio de una cooperación de funciones entre la ruta Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) y la desviación de la hexosa mono fosfato (HMD). La glucosa se convierte a piruvato, el que entra al ciclo de ácido tricarbóxico (TCA), formando ácido - cetoglutárico y eventualmente ácido glutámico. Con Microco-- coccus glutamicus, se demuestra que el metabolismo de la glu cosa es vía el citrato, y el glutamato se sintetiza por ami nación reductiva del cetuglutarato.(fig. 2).(13).

La participación de EMP y HMD sugiere la formación anaeró bica del lactato y de las enzimas activas como la deshidroge nasa de la glucosa 6-fosfato y la deshidrogenasa del 6-fosfo gluconato que generan el NADPH requerido para la aminación - reductiva del cetoglutarato.

En la biosíntesis de ácido glutámico, la fijación del bio

xido de carbono es selectiva, incorporándose al grupo alfa carboxílico del ácido glutámico, (fig. 3).(13). Esta fijación del CO_2 en el piruvato forma parte del ciclo del glioxalato, que suple al de los ácidos dicarboxílicos y ejerce un efecto importante en la producción del ácido glutámico. (13).

Una característica de las bacterias productoras del ácido glutámico es la deficiencia que presentan para oxidar el cetoglutarato, (tabla 1). En consecuencia, el ciclo TCA bloqueado por la oxidación del ácido cetoglutarico, lo cual favorece la formación del ácido glutámico y previene una degradación posterior del alfa-cetoglutarato. La deficiencia de Micrococcus glutamicus para oxidar el TCA se demuestra debido al efecto de la permeabilidad de la membrana celular hacia estos ácidos, y la ausencia de un sistema enzimático para reoxidar el NADPH/ La oxidación del citrato por un homogeneizado de células ocurre solamente con la adición de colorantes de óxido-reducción como el azul de metileno, (fig. 4). El citrato formado dentro de las células no puede ser liberado ni oxidado por las mismas. Cuando se adiciona hidróxido de amonio, el citrato es transformado a glutamato por medio de una oxidación y aminación reductiva, pudiendo así pasar por la membrana celular. El fenómeno de acumulación del ácido glutámico puede ser un mecanismo de defensa de la célula cuando existe una sobreproducción de citrato.(13).

La síntesis del ácido glutámico a partir de acetato se observa en Brevibacterium flavum, y es postulada una modificación al TCA, incluyendo la vía del glioxalato, como la vía biosintética para el ácido glutámico. (fig. 5).

Otra característica de la producción de ácido glutámico es la asimilación de nitrógeno, la adición de amoníaco es una parte importante del proceso. La formación de ácido glutámico a partir de los ácidos tricarboxílicos se efectúa por oxidación con deshidrogenasa del isocitrato y posteriormente una aminación reductiva de la deshidrogenasa del glutamato. (13).

Las bacterias que sintetizan al ácido glutámico poseen actividad de NADP asociada con la deshidrogenasa del glutamato, (tabla 2). Una mutante de Micrococcus glutamicus requiere ácido glutámico y posee la deshidrogenasa del glutamato, esto evidencia la importancia de la doble reacción para la biosíntesis del ácido glutámico. (13).

Los cambios de energía libre asociados con los pasos del citrato hacia el glutamato se pueden calcular empleando los datos recopilados por Burt y Krebs, expresados en la fig. 6. (11).

Se observa que la conversión del citrato y amoníaco en L-glutamato, es acompañada de una ganancia neta de energía de 13.6 Kcal/mol. El equilibrio de la reacción, tomado como un sistema aislado, está a favor de la síntesis del L-glutamato.

Este experimento se realizó en condiciones anaerobias. Bajo condiciones aerobias, el NADPH presente en la célula es oxidado continuamente por oxígeno molecular vía el sistema oxidativo terminal, como lo demuestra la fig. 7.

La ganancia neta de energía en esta reacción promueve la oxidación de algún sustrato enzimáticamente enlazado con el NADP.(11).

En ausencia de amoníaco, la glucosa se oxida a cetoglutarato, ésto prueba la existencia de un sistema enzimático oxidativo asociado con la reacción de la fig. 7. La reacción -- completa en el proceso es el NADP asociado a la deshidrogenación del isocitrato y su regeneración por oxidación. Este -- mismo sistema oxidativo terminal, es posible con la deshidrogenación del L-glutamato. En este caso la ganancia neta de -- energía es adecuada para cambiar el equilibrio de la reac-- ción (6e) hacia la producción del cetoglutarato. Aquí se pre-- senta la dificultad para explicar cómo el L-glutamato puede permanecer inerte a la oxidación por la abundancia de aire. Considerando primero la oxidación del citrato, el paso de la deshidrogenación implica la suma de la reacción, fig. 8.

La relación de oxidación entre el citrato y el L-glutamato debe estar en equilibrio con el NADPH, figs. 6e y 8; por lo tanto, la relación de oxígeno absorbido es menor respecto a la del citrato. La comprobación es la incubación anaerobia prolongada de células intactas de Brevibacterium flavum en --

L-glutamato, midiéndose pequeñas cantidades de cetoglutarato.
(11).

2.2 Función de la biotina.

[Otra característica en la obtención de ácido glutámico, - es el efecto de la biotina en la producción del aminoácido. Diversos microorganismos necesitan biotina para producir áci do glutámico. Con un exceso de biotina el crecimiento bacteriano es abundante, pero la producción de ácido glutámico -- disminuye, y se presenta aumento en la concentración de ácido láctico y ácido cetoglutárico. La concentración óptima de biotina para lograr la máxima producción de ácido glutámico es menor a la requerida para obtener el máximo de crecimiento microbiano.] En la tabla 3 se demuestra el efecto de la biotina en la producción del ácido glutámico por Micrococcus glutamicus. (2,11,13).

[La biotina puede ser reemplazada parcialmente por el ácido aspártico y el ácido oleico. La tiamina y la riboflavina se han utilizado en mutante que requieren estas vitaminas -- junto con biotina; cuando las cantidades son limitadas, la - concentración del ácido glutámico aumenta y el crecimiento bacteriano disminuye.] (11).

Se ha estudiado la actividad de diferentes análogos de la biotina. La norbiotina tiene poca actividad para reemplazar a la biotina, pero pueden hacerlo la destiobiotina, biotina-d-sulfóxido, sulfato de biotina y biocitina. La homobiotina

es inhibidora tanto del crecimiento bacteriano como de la producción de ácido glutámico.

Varios precursores de la biotina pueden reemplazarla, como los ácidos 7,8-diaminopelargónico, el 7-ceto, 8-aminopelargónico, el 7-amino, 8-hidroxipelargónico, 7-amino, 8-cetopelargónico, el 7, 8-dicetopelargónico, y el biotin-diaminocarboxílico. La adición en concentraciones de 200 a ----- 400,000 $\mu\text{g}/\text{l}$ según el caso, produce ácido glutámico en concentración mayor al 40% respecto a la glucosa consumida.(13). Después de estudiar las actividades de estos precursores en el crecimiento bacteriano y la producción de ácido glutámico, se presenta la posible ruta biosintética de la biotina en la fig. 9.

→ El ácido oleico reemplaza a la biotina tanto para el crecimiento bacteriano, como para la producción de ácido glutámico, debido a que no sólo mejora la permeabilidad celular sino también es un precursor de la biotina.(13).

— En Microbacterium ammoniaphilum se reemplaza a la biotina por ácido oleico contenido en tensoactivos como el mono o trioleato sódico en concentraciones de 400 a 600 mg/l . Se piensa que estos derivados del ácido oleico se hidrolizan en la bacteria y el ácido oleico producido sustituye a la biotina. Los ácidos grasos insaturados de C_{18} , como -- los ácidos elaidínico, ácido vaccénico, ácido linoleico, ácido linolénico, y el ácido hidroxioleico, en ciertas con--

centraciones reemplazan a la biotina para el crecimiento bacteriano. Existen otros compuestos que reemplazan a la biotina, como algunas hormonas de plantas, siendo el ácido indolacético y el ácido 2, 4-diclorofenoxiacético, los más estudiados en Brevibacterium lactofermentum.

Se ha pensado que la biotina ejerce una regulación en la relación HMD/EMP en la glucolisis. El HMD provee al sistema del NADPH requerido para la formación del ácido glutámico. Se ha calculado la relación HMD/EMP en células intactas de Brevibacterium flavum, marcando la glucosa en el carbono uno o en el seis y midiendo la radiactividad del grupo carboxílico del piruvato en condiciones aerobias y con un inhibidor metálico, siendo esta relación de 10/90. Este resultado difiere con la suposición de la gran proporción de HMD en glucolisis. La estimación del HMD se efectúa en células ricas y deficientes en biotina, siendo el porcentaje de participación de cada una de, 38% en las ricas, y de 26% para las pobres en biotina. Por lo tanto, la biotina no afecta la relación entre estas dos rutas metabólicas en glucolisis, pero si ejerce una influencia en su velocidad.(13).

Con exceso de biotina la glucolisis aumenta produciendo grandes cantidad de piruvato, que no puede ser completamente oxidado por la oxidasa del piruvato, convirtiéndose a lactato y siendo excretado al medio. La biotina ejerce una influ- }

encia decisiva en el metabolismo del piruvato, regulando la proporción de oxidación de los sustratos de carbono y determinando la producción total de ácido glutámico.(13).

Cuando la glucosa es oxidada en células ricas en biotina, se requiere cerca del 70% del oxígeno para su completa oxidación. Algunos ácidos orgánicos que no son permeables a la membrana celular puede ser oxidados, exceptuando al ácido cítrico, al ácido cis-aconítico y al ácido cetoglutárico. - En células deficientes en biotina la oxidación de la glucosa, acetato y succinato decrecen, pero si se adiciona NAD, se nota que los niveles de oxidación se comparan con los de las células abundantes en biotina. Se cree que esta disminución en la oxidación se debe a las bajas concentraciones de NAD y de NADPH, ya que su concentración es la mitad o cuarta parte respecto a las abundantes en biotina.

En células de Micrococcus glutamicus deficientes en biotina, se piensa que la oxidación del acetato es baja y se efectúa mediante la ruta del glioxalato. Este sistema, incluyendo los pasos de descarboxilación oxidativa del oxaloacetato, malato y piruvato, es de oxidación completa dentro dentro de la bacteria.(13).

El ciclo del glioxalato provee de los ácidos dicarboxílicos necesarios para la biosíntesis del ácido glutámico, --- siendo regulado por la concentración del acetato. La actividad de la enzima clave en este ciclo es la liasa del isoci-

trato, la que en células que crecen en glucosa y deficientes en biotina es mínima.(13).

La disminución que se presenta en la oxidación del piruvato es como resultado de la disminución en la formación del acetato y la baja en la inducción de la liasa del isocitrato. La liasa del isocitrato puede ser reprimida, como en otros microorganismos, por succinato, el que se acumula pues disminuye su oxidación en células abundantes en biotina. En células pobres en biotina la desviación del ciclo del glioxalato y la falta de un sistema completo de oxidación del acetato, favorecen la producción de ácido glutámico, incidiendo en el flujo metabólico del isocitrato al cetoglutarato y finalmente el glutamato.

Algunas cepas en condiciones deficientes en biotina tienen actividad de liasa del isocitrato en un medio de glucosa. En estas cepas la acumulación del ácido glutámico se explica mediante el ciclo del glioxalato, si se suprime la descomposición de los ácidos dicarboxílicos, malato y oxaloacetato principalmente.(13). Es importante notar que el ciclo del glioxalato tiene una doble función, dependiendo del grado en el cual pueden ser descompuestos el malato y el oxaloacetato. Una es la de completar el sistema de oxidación del acetato, y la otra, la de reforzar el sistema de biosíntesis del ácido glutámico. En Brevibacterium flavum, la deshidrogenasa del isocitrato es inhibida concertadamente por el glioxalato

y el oxaloacetato, y la liasa del isocitrato es inhibida -- competitivamente por glioxalato, malato, oxaloacetato y cetoglutarato. Esto sugiere que la acción de las dos enzimas en el isocitrato es importante para mantener el balance metabólico entre el ciclo TCA y el ciclo del glioxalato.(13).

Ha sido observada la regulación alostérica de la carboxilasa del fosfoenolpiruvato y la cinasa del piruvato. La primera es activada por acetil-Co-A y 1-6, difosfato de --- fructosa, e inhibida por el aspartato, y la última se activa por el AMP y se inhibe por el ATP. Se piensa que estos - controles son significativos para el equilibrio en la forma ción de acetil-Co-A y el oxaloacetato, siendo éste importan te para la biosíntesis del ácido glutámico. En la oxidación final de la glucosa, tanto los iones como la biotina actúan como reguladores de su actividad.

La relación de glucosa consumida en presencia de amonio por células deficientes en biotina es rápida, y la producción de ácido glutámico es mayor que si en ausencia de amonio el consumo de glucosa baja y aumenta la concentración - de cetoglutarato, piruvato, acetato y succinato. La rela--- ción de oxígeno absorbido y glucosa consumida es presencia de NH_4^+ es casi uno; de otra manera, en su ausencia, esta - relación es mayor a dos. En Micrococcus glutamicus la amina ción reductiva del cetoglutarato casi no es afectada por la presencia de oxígeno, produciendo una mayor proporción con

la respiración aerobia; se nota aquí la importancia del amoníaco en el metabolismo aeróbico de la glucosa.(13). 19

En la oxidación de la glucosa se ha estudiado el efecto de amoníaco por la cantidad de CO_2 radiactivo que se desprende de glucosa-6- ^{14}C , demostrando que el amoníaco en las células deficientes en biotina ejerce un efecto en la completa oxidación, a diferencia de las células ricas en biotina, en las que no se aprecia ningún efecto.(Tabla 3).(13). Por lo tanto, la biotina y el amoníaco regulan el metabolismo de los compuestos de carbono después del piruvato, y en la relación de la oxidación completa y biosíntesis del ácido glutámico. La oxidación completa predomina en las células ricas en biotina, mientras que la biosíntesis del ácido glutámico, y en los pasos que envuelven a la liasa del isocitrato, la oxidación del succinato y la presumible descarboxilación del malato u oxaloacetato, son retardadas por la deficiencia en biotina y la conversión del citrato a ácido glutámico no se afecta.

La actividad de la deshidrogenasa del glutamato, que es importante en la asimilación del nitrógeno, es mayor en un medio natural que en un químico, y no es afectada por la concentración de la biotina.(13).

El glutamato exógeno no afecta el crecimiento celular, debido a que no es consumido ni utilizado para la reproducción celular. Esta es una característica importante de los

microorganismos productores de ácido glutámico.

En condiciones de alto contenido de biotina, la liasa del isocitrato es reforzada y el ciclo del glioxalato trabaja activamente para proporcionar la cantidad de energía requerida para la biosíntesis de proteínas. En condiciones deficientes en biotina, disminuye la actividad del ciclo del glioxalato y los requerimientos de energía, por lo que es reprimida la biosíntesis de proteínas. En estas condiciones las reacciones de la deshidrogenasa del isocitrato y la deshidrogenasa del glutamato producen mayor cantidad de ácido glutámico.(2).

Se concluye que estas reacciones de oxidación y reducción del isocitrato, que son un mecanismo básico de asimilación del nitrógeno por la bacteria, están en fuerte competencia con la biosíntesis de proteínas.

En diferentes niveles de biotina se determina la concentración de los aminoácidos. Cuando la concentración del medio es abundante en biotina la concentración del ácido glutámico respecto al total de aminoácidos dentro y fuera de la célula es del 12%. Los aminoácidos excretados por la célula son; ácido aspártico, ácido glutámico, prolina, isoleucina, leucina, tirosina, lisina e histidina. En condiciones deficientes de biotina la cantidad de ácido glutámico excretado es del 92% respecto al total de aminoácidos. Se excretan de la célula, treonina, ácido glutámico, glicina, alani

na, valina, metinina, leucina, lisina e histidina.(13).

Con mayor cantidad de biotina se excreta en abundancia la alanina. Las células con mayor concentración de biotina en el medio contienen mayor cantidad de aminoácidos intracelulares que las deficientes en biotina. En la tabla 4 se demuestra esta relación. En deficiencia de biotina la oxidación completa se reduce, dando una disminución en la producción del ATP que es requerido para la biosíntesis de -- proteínas.]

3.0 Efecto de varios agentes en la formación del ácido glutámico.

3.1 Efecto de la penicilina.

[Desde que se conoció la acción de la biotina el problema que se presentó fue la utilización de melazas que contienen grandes cantidades de biotina. El problema fue resuelto con la adición de penicilina durante la fermentación.(11,13,14).

La fermentación se empieza con un medio rico en biotina de la manera usual, después de un cierto tiempo en la fase de crecimiento, horas después de haberse iniciado la fermentación, la penicilina G se adiciona al medio en una concentración aproximada de 4 unidades por ml. Con la adición de la penicilina el crecimiento bacteriano se restringe llegando a un nivel comparable con un medio deficiente en biotina; la fermentación sigue igual y se acumula una mayor cantidad

de glutamato.(fig. 10).(11,13).

Al igual que la penicilina, otros antibióticos como cefalaspantina C, oxamicina, novobiocina, oxitetraciclina, cloro tetraciclina, tetraciclina, bacitracina, cloramfenicol, estreptomycinina y dextromycinina, son efectivos para la acumulación de ácido glutámico. Siendo la penicilina el antibiótico más efectivo, se ha encontrado que la efectividad del mismo puede estar relacionada con la permeabilidad de la membrana celular, la que es removida.(13).

3.2 Efecto de los Tensoactivos.

La adición de tensoactivos no-iónicos, catiónicos o aniónicos, produce un aumento en la producción de ácido glutámico. La efectividad del tensoactivo depende de la naturaleza del ácido graso saturado que lo constituye. De esta manera el Tween 60 (polioxietilen-monoestearato sórbico) y el Tween 40 (mismo derivado del ácido palmítico) son efectivos, pero el Tween 20 y el 80 (derivados del ácido láurico y de ácido oleico respectivamente) no lo son. La capacidad de aumentar la producción de ácido glutámico de estos compuestos no puede ser explicada estrictamente en base a que mejoran la permeabilidad celular.(13).

4.0 Regulación de la membrana celular.

4.1 Relación de aminoácidos libres intracelulares.

Desde el descubrimiento de la acción de la penicilina en

La obtención de ácido glutámico, ha crecido la tendencia al estudio no sólo de la penicilina sino también de la biotina en terminos de regulación de la membrana celular.

Se liberan una mayor cantidad de aminoácidos intracelulares de células deficientes en biotina, lavandolas con soluciones reguladoras, a diferencia de las abundantes en biotina, que no los liberan. Lavando estas células con CATAB --- (tensoactivo) los aminoácidos son liberados. Esto implica - que la diferencia de habilidad de producir el ácido glutámico entre células abundantes y deficientes en biotina es debida a la diferencia de permeabilidad celular hacia el glutamato. Del 75 al 96% de los aminoácidos intracelulares y - el ácido glutámico pueden ser liberados por simples lavados, de células deficientes en biotina, o con penicilina o tween 60 adicionados durante la fermentación a células abundantes en biotina. En este caso solamente se libera del 5 al 28% - de los aminoácidos.(13).

4.2 Principales transformaciones celulares.

Las células de un medio abundante en biotina, en fase estacionaria, no se pueden convertir en productoras de ácido glutámico con la adición de penicilina o Tween 60. Esto indica que al adicionar penicilina, tensoactivos, ácidos grasos, isobutanol, violeta degenciana y desoxicolato, se presentan cambios durante la fase de crecimiento. Las células que crecieron con adición de penicilina no sintetizan com-

pletamente la pared celular y frecuentemente sufren elongaciones y protuberancias. Con la adición de tensoactivos y ácidos grasos, la barrera de permeabilidad celular es removida, pero no se efectúan los drásticos cambios en la estructura celular que se presentan con la adición de penicilina.(13).

Los efectos de la penicilina y de los tensoactivos, son comparados con la adición a cada medio, de las sustancias que alteran la presión osmótica (nitrato de sodio y beta-alanina), y los resultados demostraron que la penicilina es inefectiva en un medio con mayor presión osmótica, en cambio los tensoactivos actúan independientemente de la presión osmótica. Cuando la penicilina es usada, el cambio en la estructura celular sucede solamente con una presión osmótica baja. Estas observaciones llevan a la conclusión de que la función de la penicilina es la de inhibir la síntesis de la pared celular, permitiendo que la membrana celular quede desprotegida, y rompiendo la barrera por el daño mecánico de la membrana celular. En cambio los tensoactivos causan cambios en la composición química de la membrana, lo que resulta en un aumento en la permeabilidad de la membrana celular.(13).

4.3 Cambios de lípidos en la membrana celular.

Los tensoactivos interfieren con la formación de la membrana celular, compitiendo probablemente con los ácidos gra

tos insaturados. Esto se asume debido a que la biosíntesis de los ácidos grasos insaturados se limita a células deficientes en biotina, dando una incompleta membrana con menor contenido de lípidos y una mejora en la permeabilidad hacia el ácido glutámico principalmente.(13).

Los ácidos grasos insaturados de 18 C, como el ácido oleico y sus derivados, pueden reemplazar a la biotina, mientras que los ácidos grasos saturados de 14 C a 18 C demuestran una actividad semejante a la penicilina. Más del 90% de los ácidos grasos intracelulares de Brevibacterium lactofermentum consiste en los ácidos palmítico y oleico, pero cuando el sorbon T-40 (polioxietilén-monopalmitato sórbico) se adiciona al medio que es abundante en biotina, el ácido esteárico se forma y el ácido oleico decrece, llegando a niveles encontrados en las células deficientes en biotina. Cuando la penicilina se adiciona en las mismas condiciones el ácido palmítico y el ácido oleico aumentan. Esto sugiere que el modo de acción de la penicilina y el sorbon T-40 son diferentes.(13).

Cuando el tensoactivo POEFE (éster del ácido graso y polioxietilén sorbato), es adicionado a un medio de melazas, Microbacterium ammoniaphilum adquiere habilidad para producir ácido glutámico, siendo la relación intracelular entre los ácidos grasos saturados e insaturados mayor de uno, de otra manera si no fuese adicionado, la relación sería menor

a uno. Por fraccionamiento de la membrana celular después del tratamiento con lisozima se demostró que se presentan cambios en la composición de los ácidos grasos. Una diferencia similar en la composición de los grasos se observa entre las células ricas y deficientes en biotina, pero esta diferencia no es detectada con o sin la adición de la penicilina.(13).

El contenido de fosfolípidos de células que crecen con alto contenido de biotina, decrece hasta el nivel de las deficientes en biotina al agregar margarato de polietilén glicol. Cuando las células crecen en un medio suplementado con ácido oleico en lugar de biotina y se adiciona margarato de polietilén glicol, no se produce ácido glutámico principalmente, y no se presentan cambios significativos en el contenido de fosfolípidos intracelulares. Se concluye de estas observaciones que la producción de ácido glutámico está estrechamente relacionada con la biosíntesis de fosfolípidos intracelulares y los ácidos grasos saturados compiten con la biotina en la biosíntesis. Cuando la penicilina se adiciona a un medio suplementado con ácido oleico, gran cantidad de ácido glutámico se produce, pero no ocurren cambios apreciables en los fosfolípidos, con ésto se deduce que la acción de la penicilina es indirecta con respecto a la composición de la membrana celular.

Por lo tanto, el cambio de permeabilidad hacia el ácido

glutámico se debe a la síntesis incompleta de los lípidos - en la membrana celular, siendo la causa principal de la producción del ácido glutámico.(13).

[El mecanismo de regulación de biotina en la obtención de ácido glutámico. que ha sido el problema central en su estudio, se sintetiza en tres puntos; disminuye la habilidad de la oxidación completa, disminuye la biosíntesis de proteínas, y aumenta la permeabilidad celular.]

5.0 Alteraciones en la producción de ácido glutámico.

5.1 Acido láctico.

[Una ligera variación de las condiciones óptimas de fermentación produce un cambio en el metabolito deseado. Un aumento de crecimiento de la biomasa por un exceso de biotina, es suficiente para variar el curso de la fermentación - produciendo ácido láctico.] Una **asración** deficiente en Micrococcus glutamicus también presenta un cambio en el producto de fermentación. Inclusive en otros microorganismos como Brevibacterium divaricatum el cambio de temperatura de 30° a 37°C produce esta alteración. Se piensa que el ácido láctico es formado por la vía del ciclo de la pentosa monofosfato. (13).

5.2 Acido succínico.

[El oxígeno ejerce una influencia sobre la producción del ácido succínico en lugar de ácido glutámico.] La cantidad de

ácido succínico aumenta o decrece con la variación del coeficiente de transferencia de oxígeno. Se ha encontrado que sustancias como el extracto de maíz adicionado al medio de fermentación producen ácido succínico. La producción de ácido succínico se debe a la reducción del ácido fumárico -- con el NADH como donador de hidrógeno, y no con el NADPH -- que es utilizado con el ácido glutámico. (13).

5.3 Acido alfa-cetoglutarico.

[Existen varios cambios en el medio de cultivo que producen ácido alfa-cetoglutarico, pueden ser la alta concentración de biotina, la disminución de la actividad de la deshidrogenasa del glutamato. También cuando se utiliza para controlar el pH NaOH en lugar de hidroxido de amonio o urea se presenta la acumulación del cetoglutarato. (13).

5.4 Acumulación de glutamina.

Este tipo de acumulación se ve favorecida por un pH ligeramente ácido, dando glutamina y N-acetilglutamina. Existen dos hechos que favorecen su acumulación; la glutaminasa de la bacteria tiene un pH óptimo alcalino, que también es activado por bajas concentraciones de sulfato de amonio, y la sintetasa de la glutamina tiene un pH óptimo entre 5.5 y -- 6.5. Por lo tanto el pH del medio y la concentración de iones amonio juegan un papel importante en la acumulación de glutamina. (13).

6.0 Especificaciones de ácido glutámico.

Peso molecular	147.13
Nitrógeno	9.52 %
Cristales	rómbicos
Cte. de disociación	$pK_{COOH} = 2.19$; $pK_{COOH} = 4.25$; $pK_{NH_3} = 9.67$
Punto isoelectrico	3.22
Rotación específica	$D^{20} = +31.6^\circ$ (2N HCl, c=10)

Insoluble en disolventes orgánicos.

Solubilidad en agua: (g/100 g H₂O) = 0.34 (0°), 0.50 (10°),
0.72 (20°), 1.04 (30°), 1.51 (40°),
2.19 (50°), 3.17 (60°), 4.59 (70°),
6.66 (80°), 9.66 (90°), 14.00 (100°).

(1,12).

7.0 Usos y toxicidad.

Es un constituyente común de las proteínas, especialmente de las proteínas de granos como el gluten, es un cofactor en los sistemas de oxidación-reducción del organismo, como sal sódica es un excelente saborizante. Nutricionalmente es un aminoácido no esencial, pero fisiológicamente es muy importante. Esta situación es un punto clave del metabolismo de azúcares y grasas. Por desaminación o transaminación forma ácido alfa-cetoglutarico, el cual forma parte del ciclo de Krebs. Es un importante donador de nitrógeno en la síntesis de varios aminoácidos o sus ceto-análogos. (1).

Con amoníaco forma L-glutamina y de esta manera desintoxica a la célula. El ácido acetil-L-glutámico es un cofactor en la formación del fosfato de carbamilo para la síntesis de urea. (1).

[Juega un papel importante en el metabolismo cerebral llegando a llamar alimento cerebral.] Participa en el transporte de potasio en el cerebro, también lo desintoxica del amoníaco.] Forma el ácido gama-aminobutírico por descarboxilación en los tejidos del sistema nervioso central. Algunos gama-glutamil-péptidos han sido encontrados en los tejidos cerebrales. En síntesis, [el ácido glutámico es esencial para mejorar y mantener la función cerebral.] (1).

[Sus principales usos son para tratar la epilepsia, coma hepático, distrofia muscular y retardo mental. También en algunos desórdenes sexuales y principalmente su sal de sodio como saborizante.]

Las dosis que se puede adquirir por medicamentos es de 8 a 20 g diarios. Si se ingiere en cantidades mayores de 20 g diarios produce; perturbaciones, insomnio, náuseas y vómitos.] (3,9).

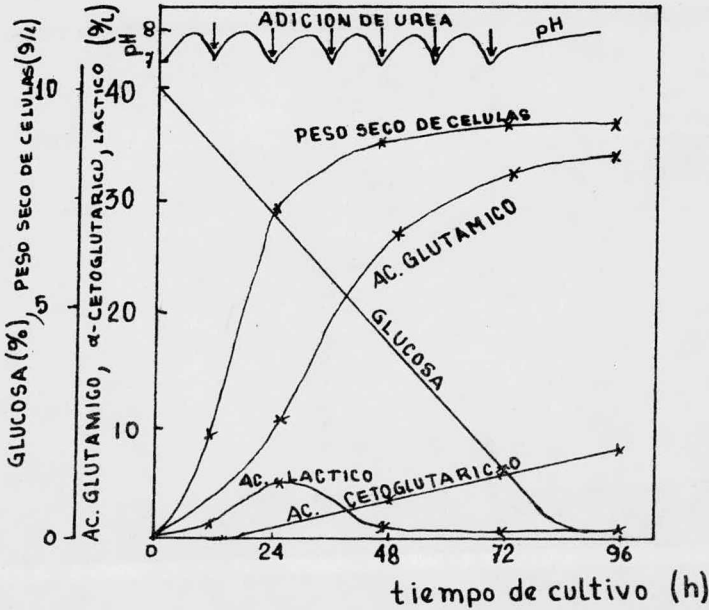


Figura 1. Curso de la fermentación de ác. glutámico por Micrococcus glutamicus. Composición del medio; glucosa 10%, Extracto de maiz, 0.25%; NZ-amina, 0.5%; K_2HPO_4 , 0.1%; --- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.025%; urea, 0.5%, con agitación y a 28°C.

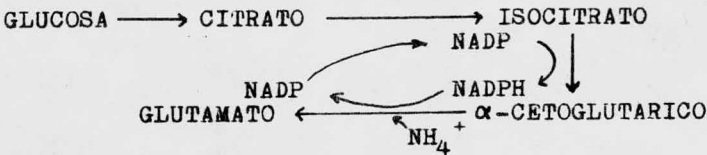


Figura 2. Vía metabólica de glucosa hacia glutamato en, --- Micrococcus glutamicus.

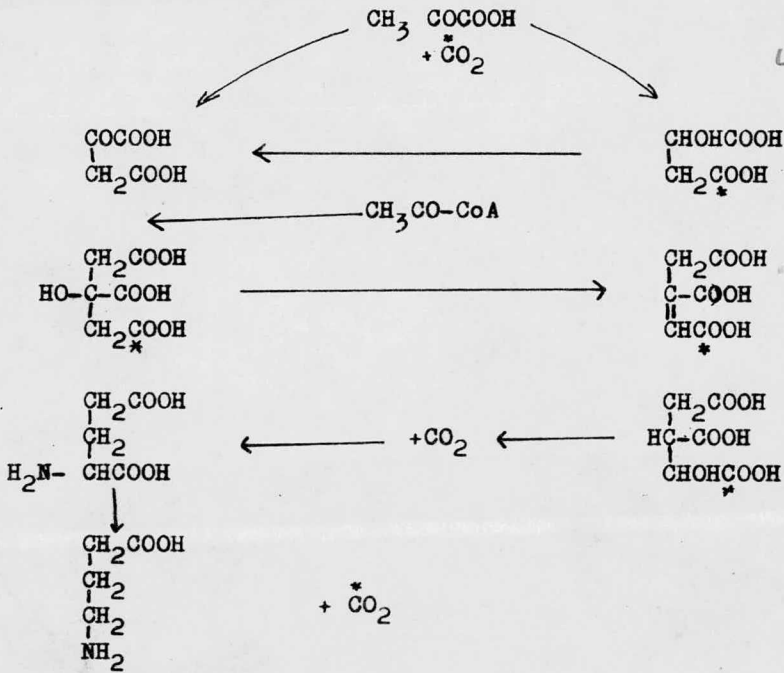


Figura 3. Incorporación del bióxido de carbono marcado durante la fermentación del ácido glutámico con Micrococcus glutamicus.

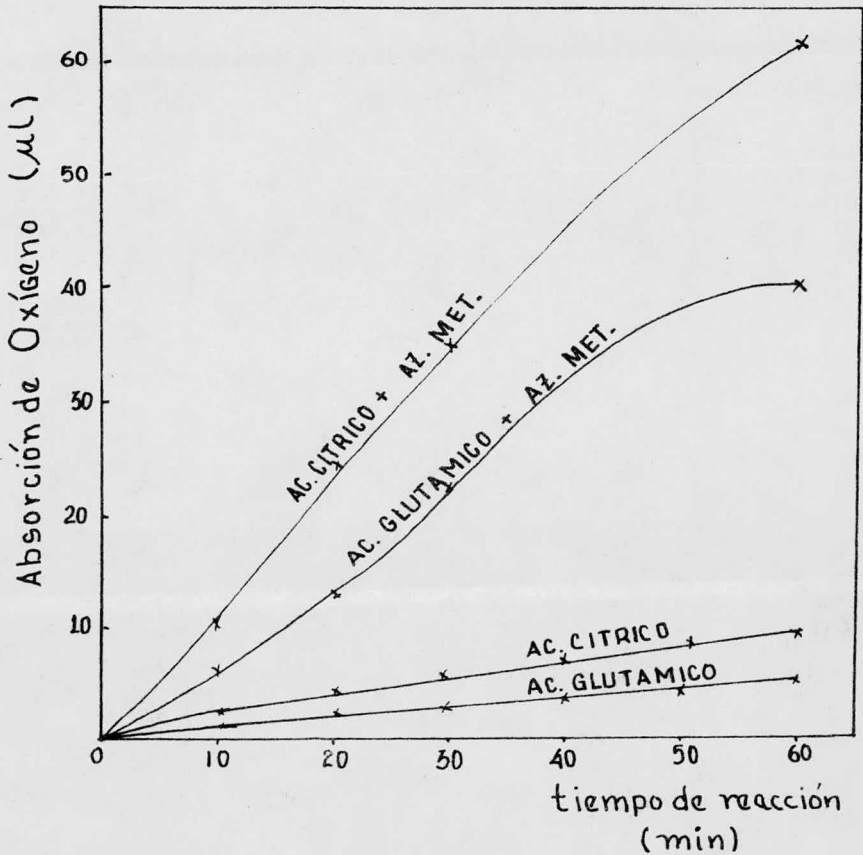


Figura 4. Efecto del azul de metileno sobre la oxidación del ácido cítrico y el ácido glutámico con homogenizado de células. - Composición de la mezcla de reacción; citrato o glutamato de sodio 50 μmol ; azul de metileno, 2 μmol ; bofer de fosfatos, 100 μmoles , (pH 7.8); Homogenizado de células, 75 mg. A - 37°C, 2.5 ml de volumen total, y aire.

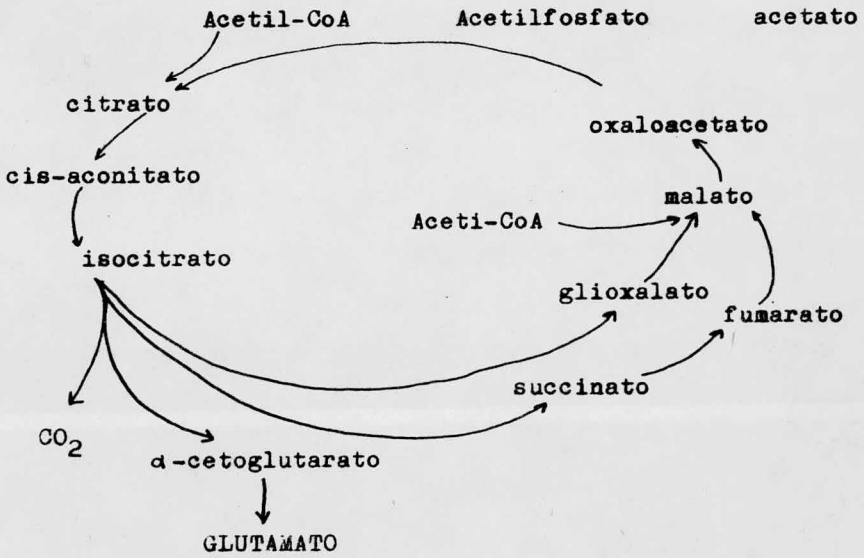


Figura 5. Posible ruta de formación del ácido glutámico a partir de acetato.

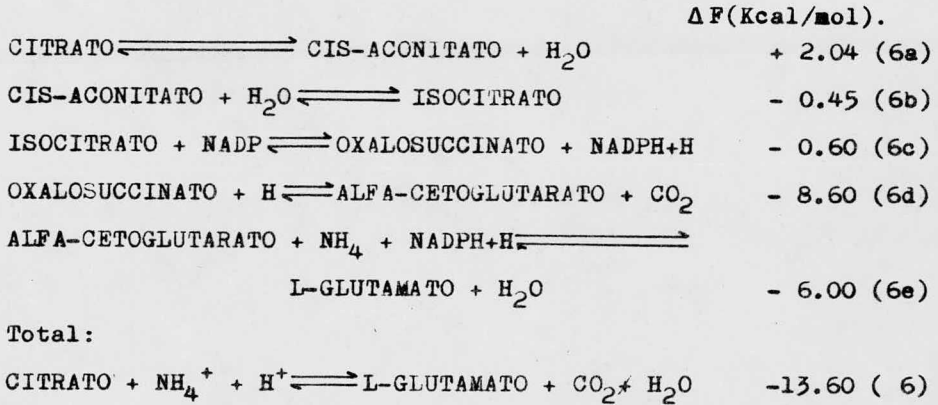


Figura 6. Cambios de energía libre del citrato al glutamato.

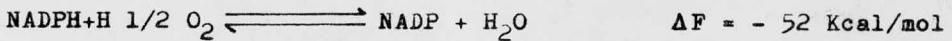


Figura 7. Energía libre en la oxidación del NADPH

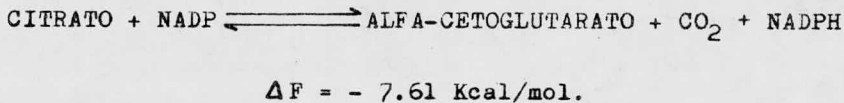


Figura 8. Cambio de energía libre del citrato al cetoglutarato.

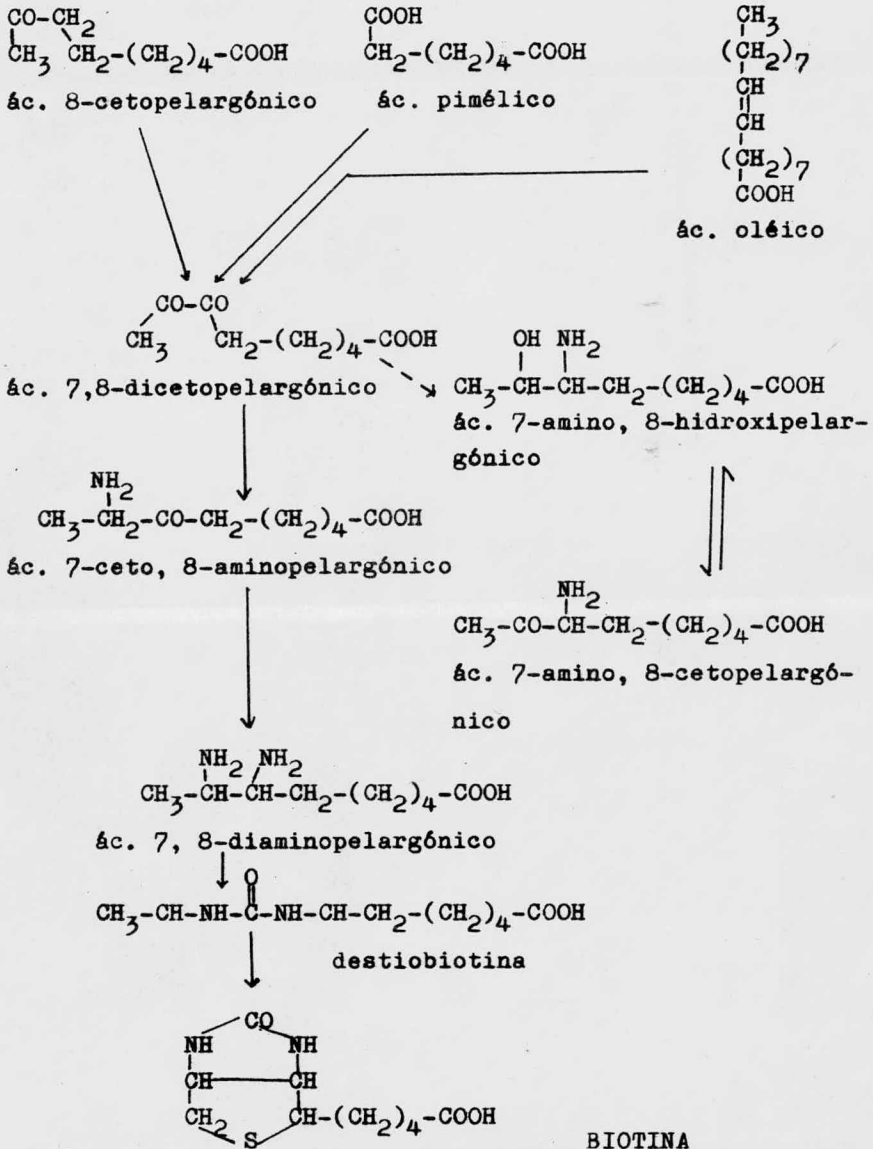
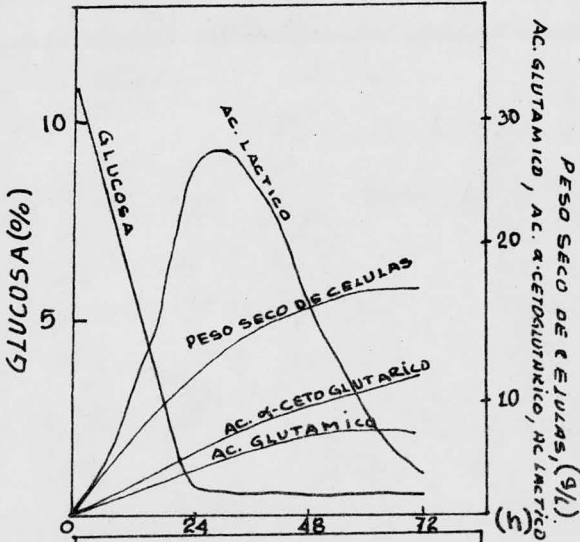


Figura 9. Posible biosíntesis de la biotina.

a)



b)

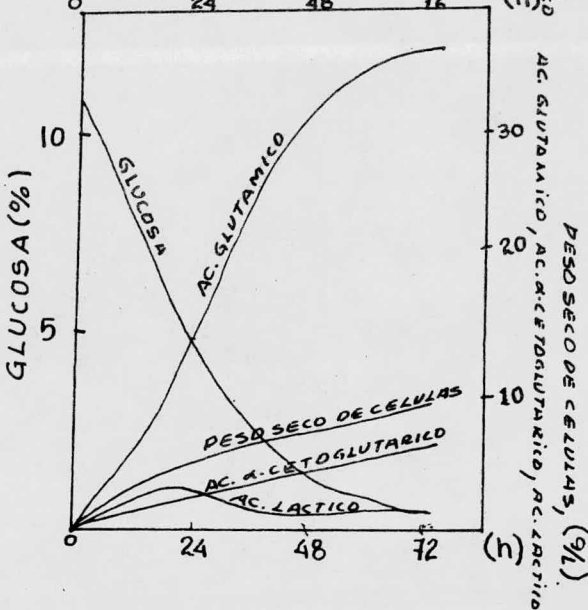


Figura 10. a) sin penicilina, b) penicilina adicionada después de 8 h.

Tabla 1

Capacidad de oxidar varios sustratos de células pobres y ricas en biotina.

Sustrato ⁺	células pobres en biotina		células ricas en biotina	
	células intactas	homogeneizado de células	células intactas	homogeneizado de células
Glucosa	58	43	65	58
Piruvato	14	9	23	15
Lactato	35	22	44	45
Acetato	11	9	41	39
Oxaloacetato	19	13	25	18
Citrato	-	-	-	-
Cis-acnitato	-	-	-	-
α -cetogluturato	-	-	-	-
Succinato	1	3	29	15
Fumarato	9	8	20	10
Malato	11	9	18	11

⁺ Composición de la mezcla de reacción: sustrato, 25 μ moles; regulador de fosfatos (pH=7.8) 150 μ moles; células intactas u homogeneizadas, 20 mg; volumen total, 2.0 ml. A 37°C y con aire.

Tabla 2

Actividad de la deshidrogenasa del glutamato en varios microorganismos. (13).

Microorganismo	Actividad específica ΔE/(g. de proteína)
<u>Bacillus subtilis</u>	2.7
<u>Bacillus natto</u>	1.4
<u>Bacillus cereus</u>	21.5
<u>Bacillus megaterium</u>	6.5
<u>Escherichia coli</u>	134.0
<u>Proteus vulgaris</u>	1020.0
<u>Serratia marcescens</u>	410.0
<u>Serratia lutea</u>	40.0
<u>Pseudomonas fluorescens</u> NRRL B-6	26.4
<u>Pseudomonas ovalis</u>	419.0
<u>Micrococcus epidermis</u> Hucker	1.4
<u>Micrococcus sodonensis</u>	-
<u>Micrococcus conglomeratus</u>	28.0
<u>Micrococcus lysodeikticus</u> Fleming 3333	-
<u>Micrococcus varians</u> ATCC 399	6.0
<u>Micrococcus citreus</u> ATCC 4012	3.0
<u>Micrococcus flavus</u>	75.0
<u>Micrococcus pyogenes</u> var. albus	-
<u>Micrococcus caseolyticus</u> ATCC 8460	-
<u>Micrococcus glutamicum</u> No. 516	205.0
<u>Micrococcus glutamicum</u> No. 541	531.0
<u>Micrococcus glutamicum</u> No. 560	434.0
<u>Micrococcus glutamicum</u> No. 582	380.0
<u>Micrococcus glutamicum</u> No. 588	570.0
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	266.0
<u>Torula utilis</u>	660.0
<u>Rhodotorula glutinis</u>	356.0
<u>Xanthomonas citricus</u>	-
<u>Aspergillus niger</u>	132.0
<u>Penicillium chrysogenum</u>	630.0
<u>Rhizopus nigricans</u>	720.0

Tabla 3

Relación entre la concentración de biotina y el metabolito acumulado en
Micrococcus glutamicus.

Biotina (g/l)	glucosa residual (%)	pH	ác. glutámico (mg/ml)	ác. cetoglutárico (mg/ml)	ác. láctico (mg/ml)
0.0	8.5	8.90	1.3	trazas	trazas
0.5	2.5	8.60	17.0	3.0	7.6
1.0	0.5	8.37	25.0	4.6	7.4
2.5	0.4	8.21	30.8	10.1	6.9
5.0	0.1	8.17	10.8	7.0	13.7
10.0	0.2	8.37	6.7	8.0	20.5
25.0	0.1	8.83	7.5	10.1	23.1
50.0	0.1	8.42	5.7	6.2	30.0

8.0 Materiales y métodos.

8.1 Características generales de Micrococcus glutamicus.

Clase: Esquizomicetos

Orden: Eubacteriales

Familia: Micrococcaceae

Género: Micrococcus

Especie: glutamicus

Son bacterias esféricas dispuestas en masas irregulares pero nunca apelonadas; la mayoría de las desarrolladas en alimentos son Gram-positivas, pero algunas especies pierden esta característica y son reportadas Gram-negativas, aerobias y catalasa positiva. Su temperatura óptima de crecimiento está entre los 25 y 30°C, crecen bien en gelosa nutritiva y no presentan coloración. Las colonias se desarrollan con facilidad. El pH óptimo es neutro. Durante la fermentación sufren cambios en la pared celular y adquieren un color ligeramente rosado. (,10,16).

8.2 Descripción del equipo.

A) Descripción del fermentador.

Microferm Fermentor, New Brunswick Scientific Co. INC. - New Brunswick N. J. US patente Num. 3,445,342; modelo Num. MF-114.

Especificaciones:

Capacidad / 14 l.

Agitación (rpm) 100 - 1000

Volumen de fermentación	2 - 11 l.
Impulsores	Turbinas
Aspersores de aire	Orificios simples removibles
Capacidad de flujo	1,600 - 16,000 (ml de aire/- min).
Límites de temperatura	5° - 60°C ± 0.25°C.
Calentamiento	Cartucho de inmersión de ace ro inoxidable.

Es un fermentador a escala utilizado para cultivos de microorganismos en fermentaciones intermitentes y continuas. La unidad donde se encuentra el medio de cultivo es fácilmente separada para poderla esterilizar; esta unidad consta de dos partes, un vaso de vidrio refractario Pyrex de paredes gruesas y una placa que se acopla herméticamente por medio de un empaque y atornillándola con el vaso. Se cuenta con vasos de 5, 7 y 14 litros y existe una placa para los vasos de 5 y 7 l. y otra para el de 14 l. El mecanismo de acoplamiento de la agitación es magnético, para evitar contaminaciones.

La agitación se realiza por medio de impulsores con tres series de agitadores planos y cuatro baffles verticales, produciendo una agitación radial, logrando una mejor disper---sión de los constituyentes del medio.

La velocidad de agitación se regula por un sistema de retroalimentación electrónica para variaciones de voltaje y

alteraciones en la viscosidad del medio de cultivo; para regular la agitación se cuenta con un tacómetro, el cual posee un botón de regulación y así obtener la velocidad de agitación deseada.

El aire se introduce a través de un regulador de presión que tiene un rotámetro y un filtro de acero inoxidable. El gas estéril se introduce por una tubería que posee un orificio, el que puede ser intercambiado por un anillo o disco - aspersionador. Para disminuir la pérdida del líquido por evaporación, en la salida del gas se encuentra un condensador de aire, que es enfriado por agua y de esta manera los vapores son condensados formando parte del medio de cultivo.

El control de la temperatura se efectúa por medio de dos termistores, que se encuentran sumergidos en dos compartimientos de acero inoxidable, los cuales envían una señal para circular agua caliente o fría y mantener una temperatura estable. En el panel de controles se encuentra el control de temperatura. El Agua fría proviene de la toma de agua del laboratorio, mientras que el agua caliente pasa por un calentador que se encuentra en el fermentador, para así recircular por los baffles.

Un accesorio que posee el microfermentador es el de control automático de pH, el que consiste en introducir dos electrodos, uno de medida y el otro de referencia en sus respectivos orificios de acero inoxidable y que se esterilizan

junto con el medio de cultivo. Por medio de una manguera -- conectada a una bomba peristáltica se van adicionando soluciones reguladoras. Este aparato posee un graficador para -- así ver las variaciones de pH.

Otro accesorio que tiene este microfermentador es un medidor y graficador del oxígeno disuelto del medio de cultivo. Este funciona por medio de un electrodo introducido en un tubo de acero inoxidable, el cual es necesario calibrar antes de efectuar la fermentación.

B) Incubadora con agitación.

Controlle environment. Incubator shaker, New Brunswick. Modelo Núm. G27 US patent No. 3,002,895.

Especificaciones;

Límites de temperatura	0° - 60°C ± 0.5°C
Velocidad (rpm)	40 - 400
Movimiento	Rotatorio, describiendo un círculo de diámetro de 1 pulg.
Plataforma	18 x 30 pulg.
Anaqueles	19.9 x 32.5 pulg.
Motor de mando	1/4 HP.
Corriente	Alterna de 200 voltios.

La incubadora posee controles de temperatura, velocidad de agitación y temperatura de seguridad. Contiene también -- dos tipos de lamparas, unas fluorescentes y otras de tungsteno. En esta incubadora se pueden alternar crecimientos de

cultivos estáticos y con agitación en las mismas condiciones de medio ambiente y temperatura. Cuando la puerta que tiene un cristal refractario es abierta se detiene la agitación e inmediatamente funciona un ventilador y se enciende automáticamente la temperatura de seguridad. Tiene tres plataformas diferentes para tres tamaños de matraces, estas -- plataformas son intercambiables.

C) Potenciómetro.

Sargent - Welch pH meter, modelo SX, Sargent Welch Scientific Co.

Escala de pH de 0 - 14 mv.

Con un electrodo integrado de medida y referencia Sargent - Welch, el cual debe ser calibrado primero con una solución reguladora de pH 7.0 y segundo, con una solución reguladora de pH 4.0. Este electrodo debe permanecer en agua destilada y periódicamente se debe lavar con acetona para eliminar la grasa.

D) Espectrofotómetro de infrarrojo.

El espectro de infrarrojo se obtuvo de un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo 337.

E) Centrifuga manual de dos brazos.

F) Autoclaves.

Una vertical y otra horizontal, ambas con controles de presión y nivel de agua.

G) Bomba de vacío.

De lubricación automática con un motor de 1/2 HP. de corriente alterna.

H) Material de vidrio Pyrex, común en el laboratorio.

8.3 Medio de mantenimiento.

El medio de mantenimiento utilizado es:

Agar	2.0 g
Extracto de carne	0.5 g
H ₂ O dest.	100 ml

Se incuban a 30°C durante tres días en tubos inclinados, conservándose en refrigeración a 3°C durante un mes. Se esterilizan a 121°C durante 15 min.

8.4 Medio de crecimiento.

Glucosa	2.0	%
Extracto de carne	0.5	%
Peptona	1.0	%
Cloruro de sodio	0.25	%
Agua destilada	100	ml

Se ajusta el pH entre 7.0 y 7.2 con hidróxido de amonio.

Se esteriliza a 121°C durante 20 min.

8.5 Medio de inducción.

Se utilizan tres diferentes medios de cultivo para la fase de inducción, que son;

Medio 1) glucosa	10.0	g
hidrolizado de caseína	5.0	g

licor de maceración de maíz	2.5	g
fosfato dibásico de potasio	1.0	g
sulfato de magnesio	0.25	g
biotina	2.5	µg
Agua destilada	1000	ml

Se ajusta el pH a 7.0 con una solución de urea al 8% y se le adiciona antiespumante. (17,19).

Medio 2)	glucosa	10.0	%
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.2	%
	K ₂ HPO ₄	0.1	%
	KH ₂ PO ₄	0.1	%
	MgSO ₄ .7 H ₂ O	0.02	%
	FeSO ₄ . 7 H ₂ O	0.001	%
	MnSO ₄ .4 H ₂ O	0.001	%
	H ₂ O destilada	100	ml
	pH	7.0 - 7.2	
	biotina	2.5	µg/l.
	antiespumante	0.01	%
	inóculo	10.0	%

Se regula el pH con una solución de urea al 10%. Se esteriliza a 121° C durante 15 min.

Medio 3)	glucosa	10.0	%
	* (NH ₄) ₂ SO ₄	0.2	%
	K ₂ HPO ₄	0.1	%
	KH ₂ PO ₄	0.1	%

MgSO ₄ .7 H ₂ O	0.02	%
FeSO ₄ .7 H ₂ O	0.001	%
MnSO ₄ .4 H ₂ O	0.001	%
citrato de sodio	1.0	%
H ₂ O destilada	100	ml
pH	7.0 -7.2	
biotina	2.5	µg/l.
antiespumante	0.01	%
inóculo	10.0	%

Se regula el pH con una solución de urea al 10%. Se esteriliza a 121° C durante 15 min.

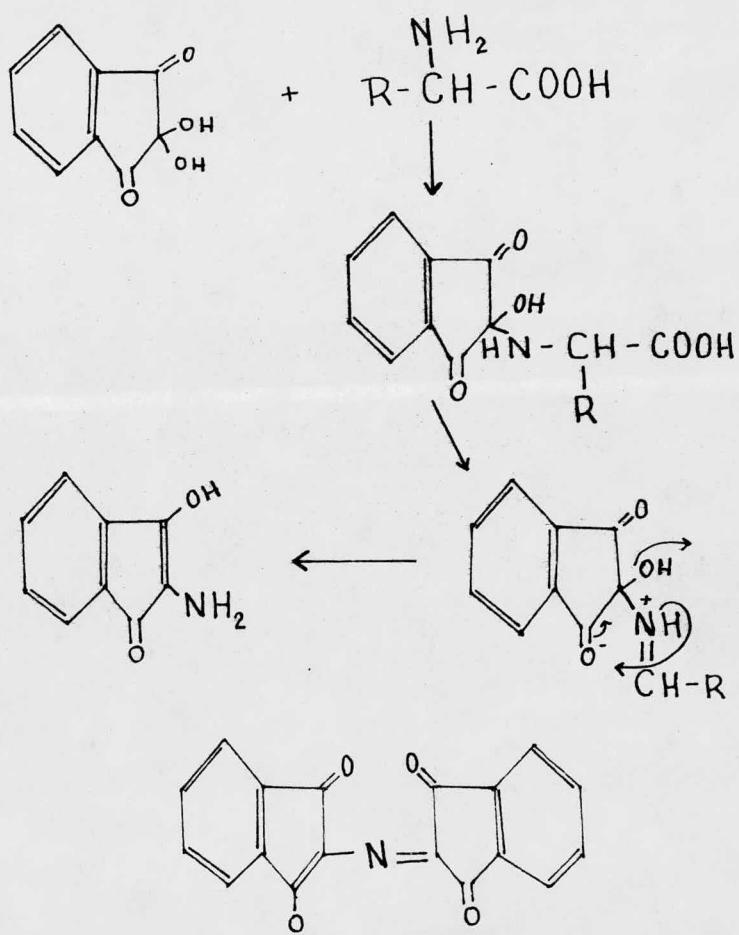
8.6 Técnicas de análisis.

a) Cromatografía en papel.

[Se utiliza como fase estacionaria el papel Whatman # 1, y como fase móvil la mezcla de butanol-ácido acético-agua] (4-2-5). [En la tira de papel Whatman se aplican por medio de una micropipeta dos muestras de la solución problema, que previamente ha sido filtrada, y una muestra de la solución de ácido glutámico estándar. Se dejan secar las muestras a temperatura ambiente, se colocan en un celda con tapa, en donde se separan los compuestos cromatográficamente, se seca a temperatura ambiente y se revela con ninhidrina. La reacción de la ninhidrina con los aminoácidos se presenta] en la figura 11. (5,6,7,15).

a continuación :

Figura 11. Reacción de la ninhidrina con los aminoácidos.



b) Espectro en el infrarrojo.

La sustancia problema se mezcla con bromuro de potasio y se forma una pastilla que se coloca en el espectrofotómetro de infrarrojo, en donde se desarrolla una gráfica que se -- compara con la del ácido glutámico estándar. El espectro en el infrarrojo obtenido se presenta en la figura 12.

c) Curva de crecimiento.

La curva de crecimiento se obtiene directamente al graficar la variación de oxígeno disuelto en el transcurso de la fermentación. Para efectuar estas mediciones se requiere calibrar el registrador, tanto a cero como al 100 %. La grá--fica se presenta en la figura 13.

9.0 Parte experimental.

9.1 Mantenimiento del microorganismo.

[El microorganismo se mantiene en un tubo con medio inclinado, este medio es el indicado en la sección 8.3, incubándose durante tres días a 30°C. Se mantiene posteriormente en refrigeración a 3°C, resemebrándose cada quince días por el método de estria. Se efectúan revigiones microscópicas - utilizando la tinción de Gram, para conocer la pureza de la cepa de Micrococcus glutamicus.]

9.2 Crecimiento del microorganismo.

[Se preparan tres matraces que contienen el medio de crecimiento, se esterilizan, se enfrían a 30°C, y se inocula - cada uno con una asada que se toma del tubo inclinado, se colocan en la estufa con agitación de 300 rpm a la temperatura de 30°C durante 24 h. Después de este tiempo se selecciona el matraz que presente mayor crecimiento; otra serie de tres matraces con el mismo medio se inoculan con un ml. del matraz anterior colocándose en la estufa con agitación de 300 rpm, a la temperatura de 30°C durante 24 h., hasta lograr obtener mayor crecimiento del microorganismo en un lapso menor de tiempo.]

9.3 Inducción del ácido glutámico.

[De los medio de inducción seleccionados e indicados en la sección 8.5, se preparan tres matraces con 100 ml. de medio, se esterilizan, se enfrían a 30°C y se inoculan con --

10 ml. de medio con el microorganismo en fase de crecimiento. Se colocan en una estufa con una agitación de 300 rpm a la temperatura de 30°C durante tres días, en los cuales se ajusta diariamente el pH a 7.0 con solución de urea. Se detiene la fermentación tomándose una muestra que se analiza por cromatografía en papel.]

De cada medio de inducción se selecciona el que haya presentado un mejor resultado, y de éste se toman 10 ml para inocular otros tres matraces con 100 ml. del mismo medio de inducción ya estéril, los que se colocan en la estufa con la misma agitación y temperatura, manteniéndose el pH y deteniéndose a los tres días la fermentación, tomando una muestra que se analiza por cromatografía en papel. De estos se selecciona el mejor resultado, tomándose de este 10 ml. para inocular a tres matraces con el mismo medio de inducción ya estéril, que se colocan, en la estufa con la misma agitación y temperatura, se mantiene el pH, y se detiene el proceso fermentativo a los tres días, tomando una muestra que se analiza por cromatografía en papel. Este procedimiento se sigue para los dos medios de inducción restantes, hasta obtener la mejor inducción del microorganismo, ya que al ir inoculando del medio anterior se parte de un microorganismo con mejores características para la producción de ácido glutámico. La fermentación se detiene a los tres días de

bido a que la biotina en ese tiempo ha sido consumida por los microorganismos.

9.4 Producción de ácido glutámico.

La producción de ácido glutámico se realiza en un fermentador New Brunswick descrito en la sección 8.2. Se utilizan dos tipos de medios de cultivo que son los señalados como 2 y 3 de la sección 8.5, y se tratan de mantener las demás condiciones de fermentación iguales, como el pH, temperatura, aeración, cantidad de inóculo y concentración de antiespumante, ya que en los trabajos reportados estos valores -- son semejantes.

La técnica para preparar la fermentación es siempre la misma. En la jarra de 5 l. del fermentador se ponen 3.5 l. del medio de cultivo a utilizar, se cierra herméticamente, se tapan los orificios de salida y entrada de aire, y los de salida y entrada de medio de cultivo con algodón, se pone a esterilizar en la autoclave a 121°C durante 15 min., - se deja enfriar un poco para adicionar 0.01% de antiespu--- mante y se sigue enfriando hasta que, se alcanza la temperatura de 30°C. A esta temperatura se inocula con el 10% -- del volumen, siendo el medio de cultivo de éste, igual al - que se va a utilizar en la fermentación. Se coloca la jarra en la base del fermentador, se colocan las mangueras de entrada y salida de aire y agua, se colocan los termistos para regular la temperatura, se ajusta la agitación a la requere---

rida y se fija el flujo de aire. Durante el tiempo que dura el proceso se mantiene el pH a neutro con una solución de urea.

a) Primera fermentación.

Esta se efectúa con el medio de cultivo 2 de la sección 8.5. Las condiciones iniciales son; pH de 7.0, temperatura de 30°C y agitación de 700 rpm. Se mantiene el pH a 7.0 con una solución de urea al 10%. Al tercer día se detiene la fermentación tomando muestras para verificar pureza del microorganismo y para la cromatografía en papel.

b) Segunda fermentación.

Se realiza con el mismo medio de cultivo 2, siendo las condiciones iniciales de pH 7.0, temperatura de 30°C, agitación de 700 rpm y oxígeno disuelto de 100%. Se mantiene el pH a 7.0 con una solución de urea al 10%. Al tercer día se detiene la fermentación tomando muestras para verificar pureza del microorganismo y para la cromatografía en papel.

c) Tercera fermentación.

Se lleva a cabo en el medio 3 indicado en la sección 8.5. Las condiciones iniciales son; pH de 7.3, temperatura de 30°C, agitación de 500 rpm, y oxígeno disuelto de 100%. Se mantiene el pH a 7.0 con una solución de urea al 10%. Al tercer día se detiene la fermentación efectuándose pruebas de pureza de microorganismo y producción de ácido glutámico por medio de la cromatografía en papel.

d) Cuarta fermentación.

Se efectúa con el mismo medio de cultivo 3, siendo las condiciones iniciales de pH 7.0, temperatura de 31°C, agitación de 500 rpm., y oxígeno disuelto de 100%. Se mantiene el pH a 7.0 con una solución de urea al 10%. Al tercer día se detiene la fermentación haciéndose las pruebas de pureza de la cepa y la cromatografía en papel.

e) Quinta fermentación.

En esta fermentación se efectúa una variante, que es la adición del extracto concentrado de maíz en una proporción de 0.35% al medio de cultivo 3, y aumentando el tiempo de fermentación. Las condiciones iniciales son; pH de 7.3, temperatura de 30°C, y agitación de 600 rpm. Se ajusta el pH cada 24 h. con una solución de urea al 15%. Al tercer día se agrega agua hasta restituir el volumen inicial conteniendo la concentración de biotina inicial y la concentración adecuada de antiespumante. Se detiene la fermentación al sexto día determinándose por cromatografía en papel la presencia de ácido glutámico y verificándose la pureza de la cepa de Micrococcus glutamicus.

9.5 Extracción del ácido glutámico.

Después de terminada cada fermentación el medio de cultivo se pone en refrigeración a una temperatura de 3°C, para continuar con el método de extracción que se especifica inmediatamente después.

A) Método de extracción del ácido glutámico.

- a) Se toma una alícuota de 100 ml. del líquido resultante de la fermentación.
- b) Se centrifuga.
- c) Al líquido extraído de la centrifuga se le ajusta el pH a 3.2 con HCl.
- d) Se mantiene en refrigeración durante 24 h.
- e) Se somete a una diálisis con papel celofán y agua destilada, dejándose durante siete días y cambiando el agua cada 24 h.
- f) Se suspende la diálisis y se agregan 20 ml. de Na_3PO_4 1 M. dejándose en refrigeración durante 24 h.
- g) Se toma una alícuota de 5 ml. y se filtra en el shoot que previamente se ha puesto a peso constante.
- h) Se calcula el rendimiento.

10.0 Resultados

10.1 Mantenimiento del microorganismo.

Siguiendo la técnica de la sección 9.1 en la siembra y la resiembra del microorganismo, se presenta un crecimiento abundante a las 36 h., siendo colonias blanquecinas de aspecto cremoso.

10.2 Crecimiento del microorganismo.

Al seguir la técnica de la sección 9.2 para el crecimiento del microorganismo, se van efectuando resiembras cada 24 h., observándose en cada resiembra un aumento de la turbiedad del medio de cultivo, al transcurrir el tiempo indicado. Con esto se nota el aumento de la velocidad de crecimiento en función del aumento de la turbiedad del medio de cultivo. Con el aumento en la velocidad de crecimiento se presenta una coloración cafe-rojiza en el microorganismo.

10.3 Inducción del ácido glutámico.

Durante la etapa de inducción se efectúan tres resiembras a las que se analiza por cromatografía en papel, para conocer si se ha producido el ácido glutámico. Los resultados de las cromatografías efectuadas a cada matraz se presentan en el cuadro I.

CUADRO 1

Resultados de las cromatografías durante la etapa de --
inducción del ácido glutámico.

		Medio de cultivo Núm.		
		1	2	3
Serie	matraz			
A	X	-	-	+
	Y	-	+	-
	Z	-	-	+
B	X	+	+	+
	Y	-	-	+
	Z	-	+	+
C	X	+	+	+
	Y	-	+	+
	Z	-	+	+

10.4 Producción de ácido glutámico.

Tomando como base los resultados de la sección 10.3, se seleccionan los dos medios de cultivo que presentan la mejor inducción, y se procede a efectuar el proceso fermentativo, con la extracción y cuantificación del ácido glutámico.

Las condiciones que prevalecen durante el proceso fermentativo, así como la cuantificación del ácido glutámico, se presentan en los cuadros, II, III, IV, V, y VI, y en las gráficas A, B y C.

CUADRO II
Primera fermentación.

Tiempo (días)	0	1	2	3
Temperatura (°C)	30	30	30	30
pH	7.0	7.0	6.9	6.7
Agitación (rpm)	700	700	700	700
Acido glutámico (mg/100 ml)	-	-	-	0

CUADRO III

Segunda fermentación.

Tiempo (días)	0	1	2	3
Temperatura (°C)	30	30	30	30
pH	7.0	7.0	6.8	6.8
Oxígeno disuelto (%)	100	60	40	40
Agitación (rpm)	700	700	700	700
Acido glutámico (mg/100 ml)	-	-	-	0.294

CUADRO IV

Tercera fermentación.

Tiempo (días)	0	1	2	3
Temperatura (°C)	30	27	25	30
pH	7.3	7.0	5.5	7.0
Oxígeno disuelto (%)	100	55	43	42
Agitación (rpm)	500	500	500	500
Acido glutámico (mg/100 ml)	-	-	-	1.462

CUADRO V

Cuarta fermentación.

Tiempo (días)	0	1	2	3
Temperatura (°C)	31	31	30	30
pH	7.0	6.9	6.9	7.0
Oxígeno disuelto (%)	100	60	58	45
Agitación (rpm)	500	500	500	500
Acido glutámico (mg/100 ml)	-	-	-	50.0

CUADRO VI

Quinta fermentación.

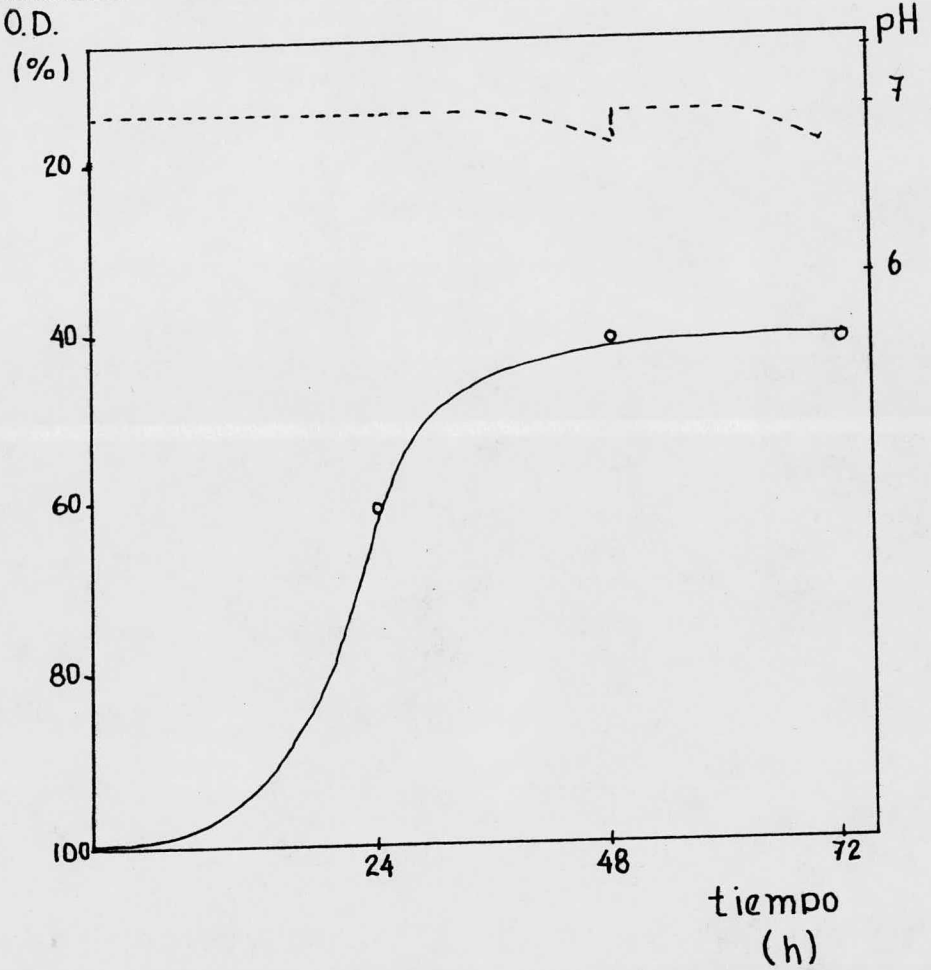
Tiempo (días)	0	1	2	3	4	5	6
Temperatura (°C)	30	30	28	28	28	26	28
pH	7.3	5.8	6.2	6.6	7.0	6.9	6.7
Agitación (rpm)	600	600	600	600	600	600	600
Acido glutámico. (mg/100ml)	-	-	-	-	-	-	49.4

- 59 -

Al tercer dia se adiciona agua con la concentración inicial de biotina y de antiespumante.

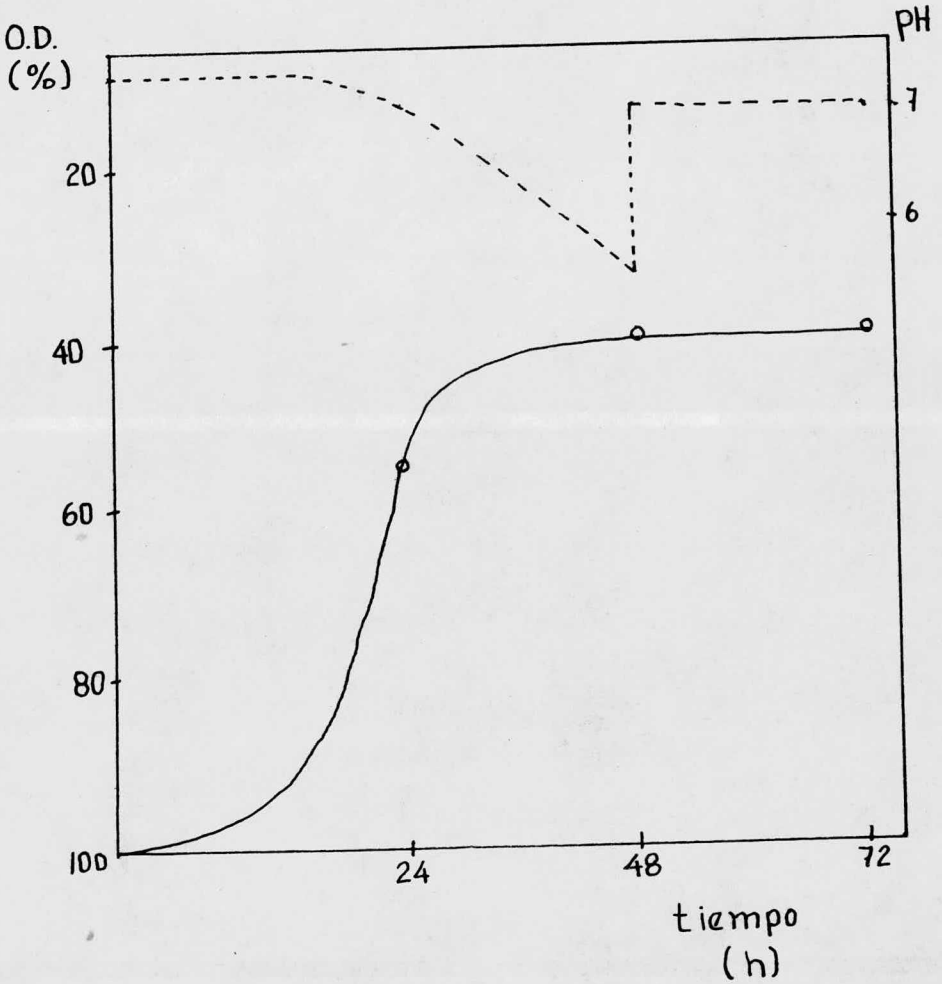
GRAFICA A

Variación de oxígeno disuelto y pH durante la segunda fermentación.



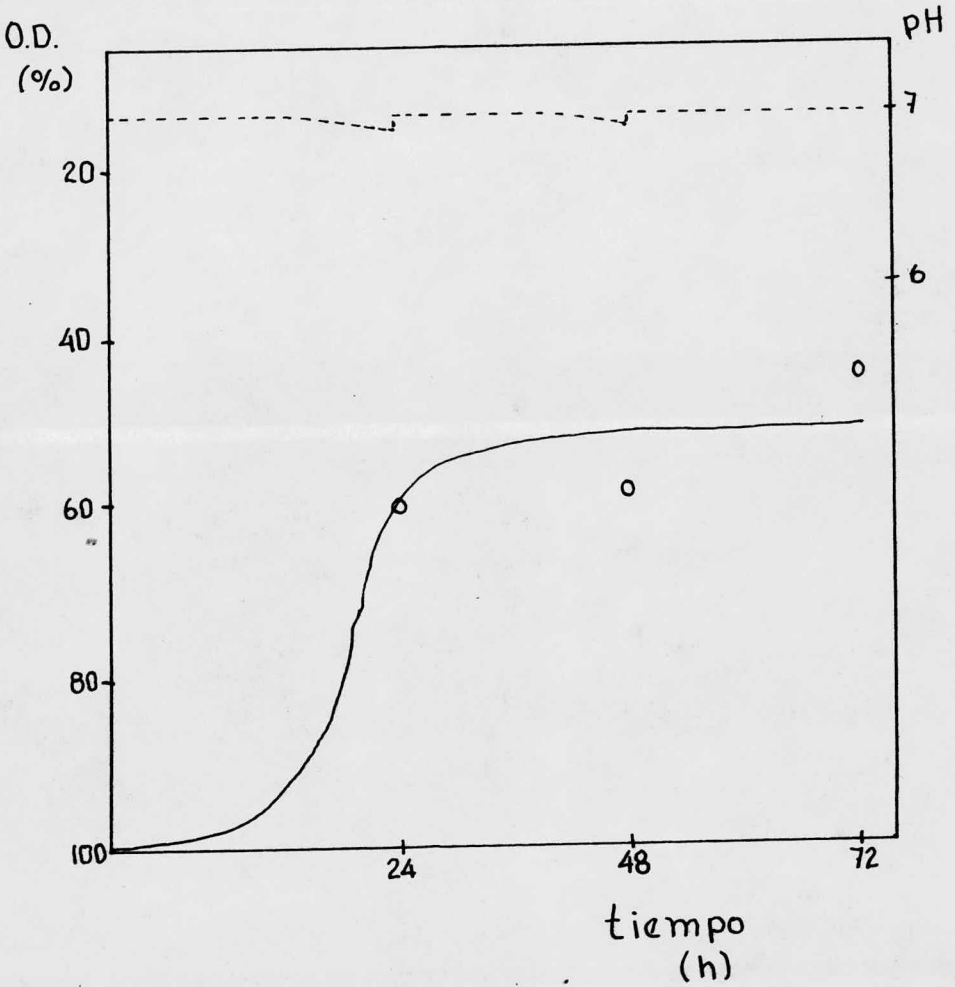
GRAFICA B

Variación de oxígeno disuelto y pH durante la tercera fermentación.



GRAFICA C

Variación de oxígeno disuelto y pH durante la cuarta fermentación.



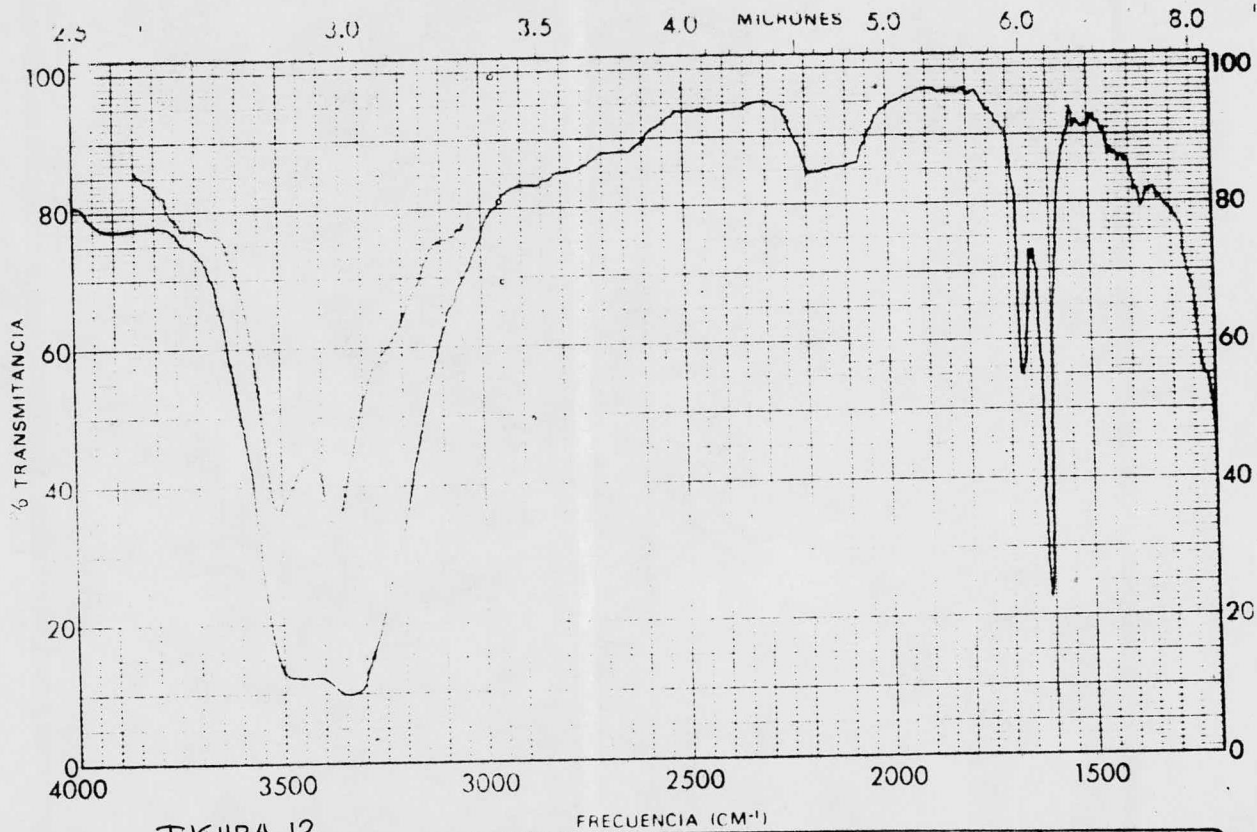
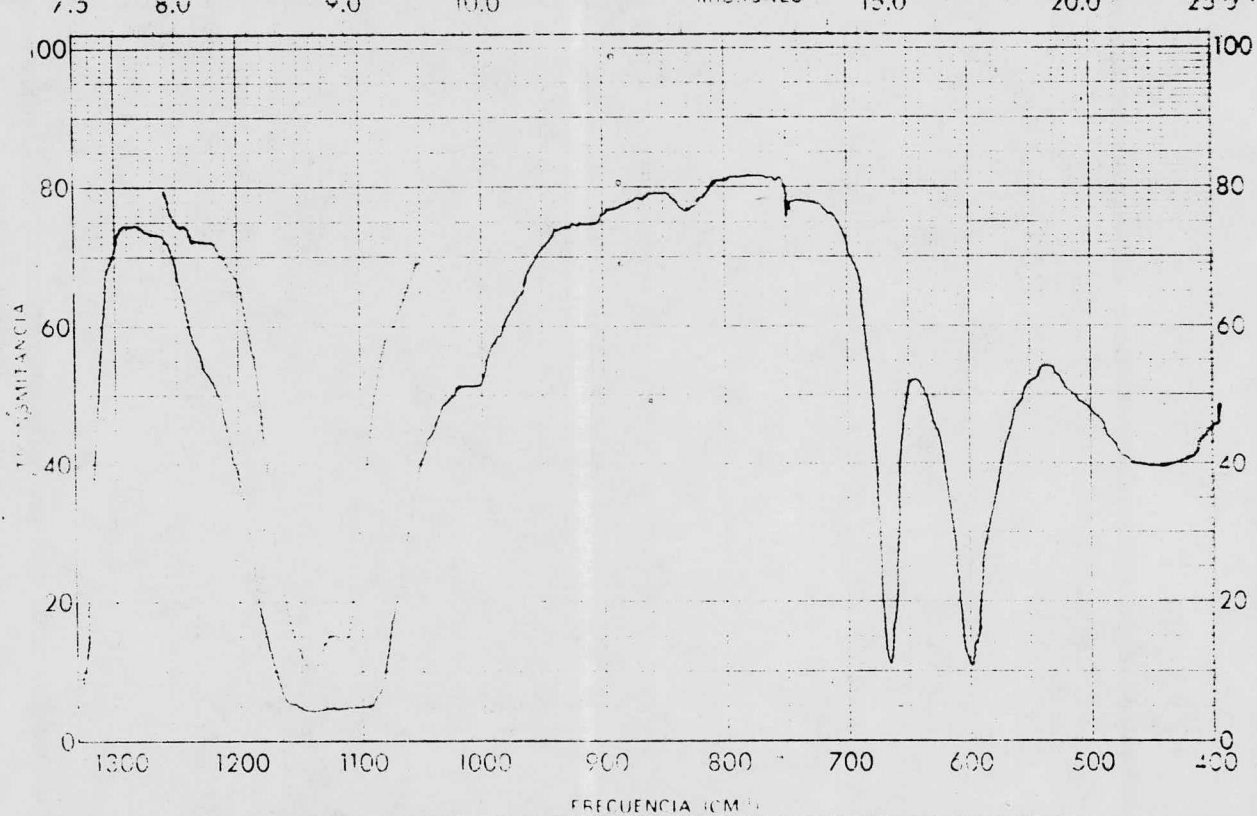


FIGURA 12



MUESTRA _____		TUBA NO _____		VEL DE BARRIDO _____		OPERADOR <u>L. L.</u>	
ORIGEN <u>De Hues</u>		CONCL. _____		BENDIJA <u>1</u>		FECHA <u>3 de 77</u>	
SOLVENTE _____		ESPESOR DE CELDA _____		COMENTARIOS <u>partida</u>			
REFERENCIA _____							



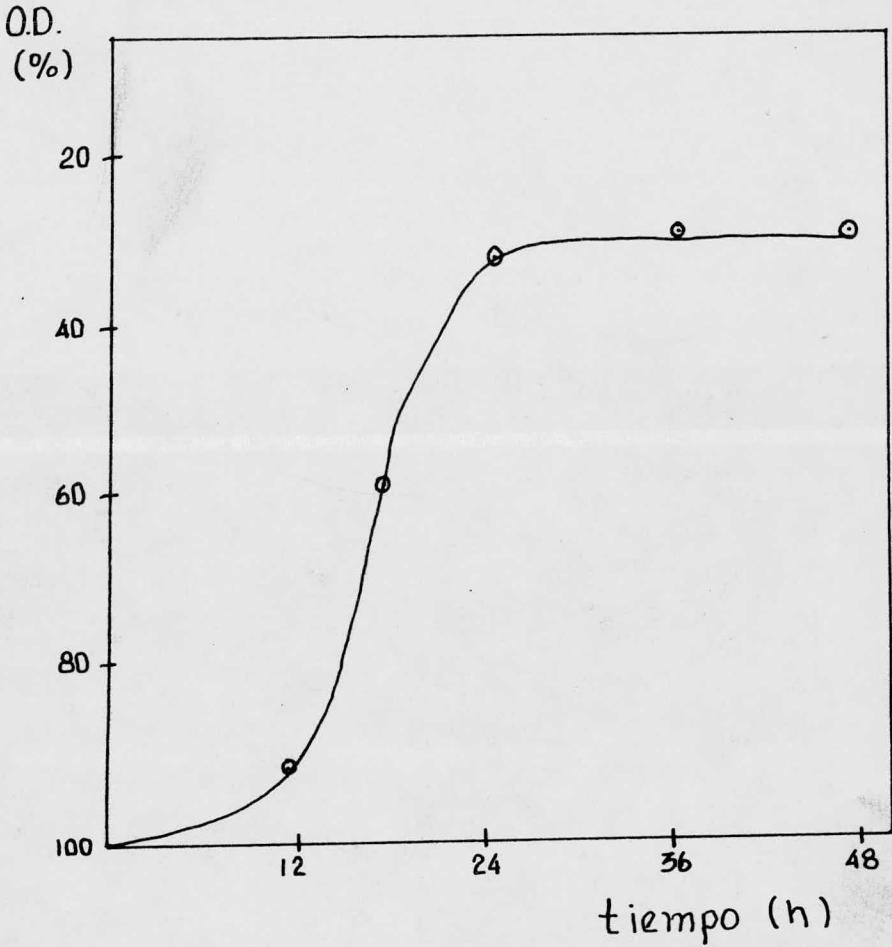
SE

MUESTRA _____ ORIGEN <u>Agua</u> SOLVENTE _____	C. P. N. _____ CONC. _____ ESPESOR DE CELDA _____ REFERENCIA _____	VEL DE BARRIDO <u>16</u> BENDIJA <u>16</u> COMENTARIOS <u>...</u>	OPERADOR _____ FECHA _____
---	---	---	-------------------------------

Curva de crecimiento experimental
de Micrococcus glutamicus.

Tiempo (h)	Oxígeno disuelto (%)
0	100
12	92
18	57
24	33
36	28
48	26

Figura 13. Curva de crecimiento experimental de Micrococcus glutamicus.



11.0 Discusión.

La obtención de ácido glutámico se efectúa principalmente en cuatro etapas que son, crecimiento del microorganismo, inducción, producción y extracción. En la primera etapa se utiliza un medio líquido con glucosa, proteínas y sales minerales, siendo el óptimo para el crecimiento del microorganismo; utilizando como inóculo una asada de la cepa mantenida en tubo inclinado conteniendo gelosa nutritiva. Con sucesivas resiembras se incrementa la velocidad de doblado, obteniéndose mayor crecimiento en un determinado lapso de tiempo, que en este caso es de 24 h. En este medio la concentración de glucosa es baja, debido a que, al no contar con alta velocidad de doblado, cantidades mayores de glucosa inhiben el crecimiento, o provocan desviaciones del metabolismo. En este medio no se agrega biotina, ya que ésta solamente se requiere en la producción de ácido glutámico.

Con el aumento de la biomasa aumenta la turbiedad del medio, que puede ser determinada con el objeto de conocer la curva de crecimiento del microorganismo.

Durante esta fase se obtiene principalmente una adaptación al medio líquido, al adquirir las células capacidad para crecer rápidamente, lográndose mayor número de células por volumen.

En la fase de inducción, se utilizan tres diferentes medios de cultivo con variaciones en los nutrientes. Las características principales de estos medios consisten en:

1°.- La glucosa que es utilizada como fuente de energía y como fuente de carbono por el microorganismo, cuando se utilizan en altas concentraciones se obliga al microorganismo a metabolizarla, manteniéndose predominantemente una -- vía metabólica al beneficiarse en este caso la producción de ácido glutámico.

2°.- Las sales minerales proveen de nutrientes que se incorporan a los diferentes metabolismos intracelulares, -- formando parte de sus constituyentes.

3°.- La biotina es importante, ya que sirve para que el ácido glutámico salga de la célula, y también porque es el factor limitante de la fermentación, siendo consumida la -- cantidad inicial en tres días.

4°.- El hidrolizado de caseína proporciona diversos polipéptidos y péptidos, que son absorbidos por las células para incorporarlos al metabolismo de proteínas.

5°.- El extracto de maíz provee de sales minerales y de diversas vitaminas.

6°.- El citrato de sodio se adiciona con el doble fin -- de evitar la fagocitosis del microorganismo, y como un precursor en la ruta metabólica de obtención del ácido glutá-- mico.

Cada medio de inducción se trabaja por separado, empleán-- dose una cantidad de inóculo constante, que inicialmente es del medio de crecimiento y posteriormente del medio de in-- ducción anterior

ducción anterior. Esto es con el objeto de preservar y fomentar las características de las células que se están mutando.

Los resultados de la etapa de inducción que se presentan en la sección 10.3, indican que en el medio de inducción -- Núm. 1, la producción de ácido glutámico se inicia ligeramente en la serie B, no lográndose definir en la serie C. - Esto puede ser por la alta concentración de péptidos que ejercen una represión con cambio en el metabolismo, aumentando la proporción de metabolismo de proteínas y disminuyendo el metabolismo de la glucosa hacia el ácido glutámico. La característica principal del medio de inducción Núm. 2 es - la alta concentración de glucosa, ya en la serie A se presenta una ligera producción de ácido glutámico, incrementándose en la series B y C.

Esto demuestra lo que sucede con el medio de inducción - Núm. 1, debido a que en este predominan la glucosa y los -- péptidos, llevando con ello un aumento en las dos principales vías metabólicas, a diferencia del medio de inducción - Núm. 2 en el cual sólo existe una concentración alta de glucosa, teniendo la célula que incrementar una vía metabólica, que beneficia a la producción del ácido glutámico.

En em medio de inducción Núm. 3 se presenta la variante, respecto al anterior, de la presencia de un precursor del - ácido glutámico en su ruta biosintética. Al existir un o---

rientador se evita una desviación en el metabolismo de la glucosa hacia el ácido glutámico. Los resultados descritos en la sección 10.3, demuestran para este medio una producción de ácido glutámico desde la serie A.

Se hace notar que se pueden efectuar, durante la etapa de inducción, valoraciones diarias de ácido glutámico mediante métodos bioquímicos, para conocer así la curva de inducción y saber en que momento se tiene el máximo de producción del mismo.

Durante la fase de inducción no se tienen las condiciones óptimas, siendo la principal limitante el flujo de aire y la agitación, teniendo en consecuencia baja concentración de oxígeno disuelto, en esta etapa que se desarrolla en matraces.

Tomando como base los resultados cromatográficos durante la etapa de inducción, se seleccionan a los medios Núms. 2 y 3 para la etapa de producción del ácido glutámico.

Con el medio Núm. 2 se efectúan la primera y segunda fermentaciones, y con el medio Núm. 3 la tercera y cuarta fermentaciones.

La quinta fermentación tiene la variante de añadir al medio Núm. 3 el extracto de maíz y la de duplicar el tiempo de fermentación.

En la primera fermentación se observa una variación de pH en el segundo día de proceso, que puede ser debido al --

aumento de la concentración del ácido glutámico. En esta ** fermentación no se efectúa la medición del oxígeno disuelto. El resultado en la extracción es nulo, aunque en las -- pruebas cromatográficas se muestra la presencia de ácido -- glutámico. Esto se debe a una baja producción del ácido glu-- támico y a mermas que se presentan durante el proceso de -- extracción.

En la segunda fermentación se presenta una baja en el pH al segundo día de proceso, lo que indica el inicio de la -- producción de ácido glutámico, y concuerda con el inicio de la fase estacionaria a las 36 h. (gráfica A), probando -- que la producción de ácido glutámico comienza con la fase -- estacionaria. En esta segunda fermentación se presenta un -- aumento en el rendimiento, aunque la concentración es baja respecto al reportado por la literatura especializada.

En la tercera fermentación se presenta la baja de pH al primer día de proceso, que también concuerda con el inicio de la fase estacionaria a las 24h. (gráfica B), a las -- 48 h. sigue la disminución del pH y con ello la producción de ácido glutámico; a las 72 h. el pH no disminuye dete---- niéndose la producción de ácido glutámico. El rendimiento es mayor que en las anteriores fermentaciones.

En la cuarta fermentación se presenta la baja de pH a ** las 24 h. al mismo tiempo que se inicia la fase estacionaria, (gráfica C), teniendo otra disminución a las 48 h.

y manteniéndose en 7.0. a las 72 h. Se hace notar que durante esta fermentación se adiciona urea desde el tiempo cero en una concentración de 0.03 g/min., además de ajustar el pH cada 24 h. a 7.0. Con ésto se evita una mayor variación de pH, que afecta al microorganismo y a la producción de ácido glutámico. El rendimiento obtenido en esta fermentación es mayor que el reportado en la literatura. (13)

En la quinta fermentación se efectúan dos variantes, que son, la adición del extracto de maíz, y el aumento del tiempo de proceso a seis días; para esto a las 72 h. se agrega agua con la concentración inicial de biotina y de antiespumante. Esto se debe a que la biotina es consumida en tres días, siendo con esto el sustrato limitante de la fermentación, y con su adición se trata de aumentar el rendimiento de ácido glutámico. A las 24 h. se presenta una disminución del pH, que se sigue presentando hasta las 72 h., a las 96 h. se mantiene el pH a 7.0, volviendo a disminuir a las --- 120 h. y 144 h. El rendimiento de la fermentación es semejante a la anterior, no lográndose aumentar la producción de ácido glutámico. Esto puede ser debido, a las deficiencias del equipo, ya que la aeración disminuye a 2.2 l/min., lo que limita al oxígeno disuelto y con ello se efecta la producción de ácido glutámico.

Analizando los rendimientos de cada fermentación, se observa que el medio de cultivo Núm. 3 tiene mejores caracte-

rísticas para mayor producción de ácido glutámico, ya que -- desde la primera fermentación con este medio se presenta un rendimiento mayor que los rendimientos del medio Núm. 2. El gran aumento del rendimiento de la tercera a la cuarta fermentación, puede ser debido a tres factores; un control --- constante del pH, máxima adaptación del microorganismo al - medio, y un mejor dominio de la técnica de extracción.

Se hace notar que de esta cuarta fermentación se toma la muestra para el espectro en el infrarrojo que se presenta - en la figura 12.

No se efectúan las mediciones diarias de cada fermenta-- ción, para conocer la curva de producción de ácido glutámi-- co, debido a que no se dispone de un método de cuantifica-- ción rápido.

La curva de crecimiento que se presenta en la figura 13, se obtiene de un proceso en el que no se pudo completar el tiempo de fermentación. En esta curva la fase de crecimien-- to comienza a las 12 h., terminando a las 24 h.

12.0 CONCLUSIONES.

- 1.- A partir del crecimiento de Micrococcus glutamicus se obtiene un aminoácido no esencial que es el ácido glutámico, extrayéndose del medio de cultivo.
- 2.- Se observa que con el medio de cultivo Núm. 3 indicado en la sección 8.5, se obtienen mejores resultados.
- 3.- Con un mejor control de pH se logra obtener un mayor --rendimiento.
- 4.- Se obtiene un rendimiento mayor que el reportado en la literatura, bajo condiciones semejantes.
- 5.- Los resultados sólo son válidos para las condiciones de fermentación establecidas en este trabajo, sugiriéndose continuar el estudio para mejorar el rendimiento, mejorando el método de extracción, cambiando sustratos y variando las variables del proceso en su fase de inducción y producción.
- 6.- Se recomienda el estudio socio-económico para su pro--ducción industrial, ya que actualmente todo el consumo interno se importa.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Ajinomoto Co., Inc. Aminoacids. No. 3. pp 12-13. Tokyo, Japan. (1973).
- 2.- Akira, F.; M. Misawa; T. Nara; S. Abe; S. Kinoshita. Metabolic controls of acumulation of aminoacids and nucleotids. Fermentations Advances. Academic press. Perlam, D.; New York. (1969).
- 3.- Anderson; Benedeesh; Chase; Gennaro; Gibson; Granberg; Harvey; King; Martin; Swingand. Remington's pharmaceutical sciences. 50a. ed. pp 964. Mack Publishing, Co. (1975).
- 4.- Birnbaum, J.; A. Devain. Reversal by citrato of rodoacetato in production of glutamic acid by Corynebacterium glutamicum. Applied Microbiology. vol. 18 (2). pp 287-288. (1969).
- 5.- Blackburn, S. Aminoacid determination, methods and techniques. pp 69-79. Marcel Dekker Inc., New York. (1968).
- 6.- Block; Durrum; Zweig. A manual of paper cromatography and paper electrophoresis. 2a. ed. pp 56-57. Academic Press, Publishers. New York. (1955).
- 7.- Casida, L. E. Industrial Microbiology. 1a. ed. pp 84-98 327-329. John Wiley. (1968).

- 8.- Davis, B. D.; R. Ducebecco; H. Neissen; H. S. Ginsberg; W. B. Wood; M. McCarthy. *Microbiology*. 2a. ed. pp 34-35. Harper International. (1973).
- 9.- *Farmacos 1973*. Camara Nacional de la Industria Químico-Farmacéutica. pp 157-158. México. (1973).
- 10.- Frazier, W. C. *Microbiología de los alimentos*. 2a. ed. pp 56-57. Acribia, Espana. (1972).
- 11.- Huang H. T. *Progress in industrial microbiology*. vol. 5 (52). pp 57-92. Hockenhull, D.J.D. (1964).
- 12.- *Index Meck*. An encyclopedia of chemical and drugs. 9a. ed. Rahaway, N.J. (1976).
- 13.- Kinoshita, S.; K. Tanaka; S. Udaka; S. Akita. *Glutamic acid fermentation*. vol. 2. (1957).
- 14.- Kiyomoto, V.; Some fundamental problems of continuous L-glutamic acid fermentation. pp 43-45. *Fermentations Advances*. D. Perlam. Academic Press. (1969).
- 15.- Kopple, K. *Peptides and aminoacids*. pp 16-17. W. A. -- Benjamin, Inc. (1966).
- 16.- Pelczar? M.; R. Reid. *Microbiology*. 3a. ed. pp 787-788. McGraw Hill. (1972).
- 17.- Prescott, S. C.; C. G. Dunn. *Industrial microbiology*. 3a. ed. pp. 712-722. McGraw Hill. (1959).
- 18.- Rose, A. H. *Industrial microbiology*. 1a. ed. pp. 85-89 Butterworths, London. (1961).

- 19.- Webb, F. C. Ingeniería Bioquímica. 2a. ed. pp 716-718.
Acribia, España. (1966).



Impresiones Lupita

MEDICINA No. 25

FRACC. COPILCO UNIVERSIDAD
CIUDAD UNIVERSITARIA, D. F.
TEL. 548-49-79