

114 2ej'



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

OBTENCION DE ACIDO GLUCONICO Y
GLUCOSA OXIDASA POR VIA FERMENTATIVA

FALLA DE CRISEN

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A ;
MARICARMEN QUIRASCO BARUCH

1990



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

	Página.
I INTRODUCCION	9
II OBJETIVOS	13
III GENERALIDADES	14
3.1. Generalidades de los procesos fermentativos	14
3.1.1. Importancia de la transferencia de oxígeno	15
3.1.2. Microorganismos utilizados	19
3.2. Características generales de los hongos	22
3.2.1. <i>Aspergillus niger</i>	24
3.3. Glucosa oxidasa	26
3.3.1. Propiedades	27
3.3.2. Mecanismo de acción y cinética	28
3.3.3. Aplicaciones	31
3.3.4. Uso de la glucosa oxidasa inmovilizada	35
3.4. Acido glucónico	39
3.4.1. Características generales	39
3.4.2. Métodos de obtención	41
3.4.2.1. Medios de cultivo	41
3.4.2.2. Condiciones de fermentación	43

3.4.2.3. Algunas consideraciones cinéticas	43
3.4.3. Aplicaciones	46
3.4.4. Derivados y sus aplicaciones	47
3.5. Fructosa	49
3.5.1. Características generales	49
3.5.2. Fuentes de obtención	50
3.5.3. Aplicaciones	51
IV MATERIALES Y METODOS	53
4.1. Cepas utilizadas, su conservación e inóculos	53
4.2. Condiciones y seguimiento de la fermentación	54
4.3. Determinación de carbohidratos y gluconato de sodio	57
4.4. Inmovilización de células	58
4.5. Medición de actividad de glucosa oxidasa	60
4.6. Medición de actividad de invertasa	62
4.7. Medición de actividad de catalasa	63
4.8. Extracción de las enzimas	65
4.9. Recuperación y purificación de gluconato de sodio	66
4.10. Purificación de fructosa	66

V	RESULTADOS Y DISCUSION	67
5.1.	Fermentaciones en matraz	67
5.2.	Experimentos en fermentador de 0.5 l	69
5.2.1.	Glucosa como fuente de carbono	69
5.2.2.	Sacarosa como fuente de carbono	78
5.3.	Experimentos en fermentador de 5 l	84
5.4.	Producción de oligosacáridos de glucosa y fructosa	96
5.5.	Bioconversión utilizando células inmovilizadas	99
5.6.	Reutilización de las células	100
5.7.	Extracción de las enzimas glucosa oxidasa, catalasa e invertasa	103
5.8.	Recuperación y purificación de gluconato de sodio	105
5.9.	Purificación de fructosa	107
5.10.	Resumen del proceso	110
5.11.	Aspectos económicos del proceso	111
VI	CONCLUSIONES	114
VII	BIBLIOGRAFIA	116

I INTRODUCCION

Este trabajo tiene como objetivo la producción de gluconato de sodio, glucosa oxidasa, catalasa, invertasa y fructosa a partir de sacarosa, por medio de una fermentación sumergida, utilizando una cepa de *Aspergillus niger* mejorada genéticamente.

El tema se eligió debido a que existe una gran cantidad de sustancias que son de utilidad en la industria de alimentos y en general en la industria química, que no se producen en México por carecer de la tecnología necesaria, por lo que tienen que ser adquiridas de otros países. Tanto el ácido glucónico, sus derivados, la fructosa y las enzimas glucosa oxidasa y catalasa son productos que actualmente se importan y para los que existe un gran interés por diversas empresas con deseos de incursionar dentro de la biotecnología.

A partir de mediados de este siglo, se observó que la industria química en México dependió cada vez menos de insumos importados. En 1950, éstos representaban el 35% del total de las importaciones, pero en 1975 el porcentaje se redujo casi a la mitad, manteniéndose así hasta 1980. En ese lapso se sustituyeron importaciones por bienes producidos por la industria nacional. Sin embargo, en años recientes la tendencia parece revertirse debido a la apertura comercial y al libre acceso a los mercados

internacionales por parte del consumidor²⁴. Lo anterior, hace importante el desarrollo de tecnologías en el país que resulten competitivas con la del extranjero, evitando así que se destinen recursos para la adquisición de insumos.

La tabla 1 presenta información comparativa de los años 1987y 1988 de las importaciones realizadas por México.

TABLA 1. PRINCIPALES ARTICULOS IMPORTADOS POR SECTOR DE ORIGEN

(ENERO - DICIEMBRE)

CONCEPTO	TON		MILES DOLARES	
	1987	1988	1987	1988
Total			12,222,852	18,903,359
Industria manufacturera:			10,771,293	16,746,997
Alimentos, bebidas y tabaco			460,163	1,232,538
Química:			1,380,090	1,882,371
Acidos y anhídridos orgánicos	29,011	38,172	84,317	100,994
Sales orgánicas y organometálicas	7,903	7,730	32,202	41,505

Banco de México para la Información del Comercio Exterior
S.H.C.P., I.N.E.G.I., S.P.P. 24

Dentro del concepto de alimentos, bebidas y tabaco quedan englobadas las enzimas y la fructosa.

La tabla 2 se refiere específicamente a las importaciones que se hicieron de ácido glucónico y sus derivados, en 1987.

Los productos que se pretenden obtener son de importancia a

nivel de las industrias química en general y de alimentos. El primer caso es el del ácido glucónico y sus sales, que se utilizan principalmente como agentes secuestrantes de iones calcio y fierro, por lo que son usados para el tratamiento de aguas duras y para el lavado de botellas de vidrio, además es acidulante en alimentos y se emplea como anticorrosivo en reactores nucleares entre otras aplicaciones.

TABLA 2. IMPORTACIONES DE ACIDO GLUCONICO Y DERIVADOS

(1987)

COMPUESTO	TON	MILES DE DOLARES
Total	524.33	820.0
Acido glucónico	126.00	102.5
Gluconato de sodio	40.90	466.1
Gluconato de magnesio	3.23	27.2
Gluconato de calcio	66.00	197.6
Gluconato de fierro	6.20	26.6

Las enzimas glucosa oxidasa, catalasa e invertasa tienen uso principalmente en la industria de alimentos. Las dos primeras, por sus características, son muy utilizadas para preservar los atributos fisicoquímicos, organolépticos y funcionales de alimentos, especialmente de aquellos con alto contenido de lípidos.

La fructosa, es un carbohidrato muy utilizado como edulcorante, por ser aproximadamente un 40% más dulce que la sacarosa, además de presentar diversas ventajas en su asimilación

que la hacen el azúcar ideal en dietas para deportistas.

El presente trabajo forma parte de un desarrollo conjunto entre el Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química, el Centro de Investigaciones de Ingeniería Genética y Biotecnología, ambos de la UNAM, y el Instituto de Microbiología de Praga, Checoslovaquia.

En el marco de este proyecto se trabajó con dos cepas de *A. niger*, una de ellas cuenta no sólo con la capacidad de producir altas cantidades de ácido glucónico sino que presenta además una característica original: a diferencia de los microorganismos de esta especie utilizados en los procesos industriales actuales, el microorganismo utilizado es capaz de utilizar sacarosa como materia prima. Este desarrollo ha dado lugar a una patente, actualmente en trámite.

Con esta nueva característica la producción de gluconato de sodio se modifica sustancialmente y presenta una propiedad singular: es posible obtener cinco productos, situación difícilmente encontrada en algún otro proceso biotecnológico o químico. Se trata desde luego del gluconato de sodio, la fructosa (obtenida en forma de jarabe) y de las enzimas glucosa oxidasa, catalasa e invertasa.

En el presente trabajo se plantea el desarrollo del proceso a nivel laboratorio, abarca la producción del gluconato de sodio en fermentadores de hasta cinco litros e incluye las etapas de recuperación y purificación de los productos.

II OBJETIVOS

1. Elegir una cepa de *Aspergillus niger* que sea hiperproductora de ácido glucónico y de glucosa oxidasa.
2. Obtener fructosa e invertasa, para lo cual se utilizará sacarosa como fuente de carbono de la fermentación.
3. Establecer las condiciones óptimas de operación para fermentadores a nivel laboratorio.
4. Definir las operaciones de recuperación de los productos de la fermentación (gluconato de sodio, fructosa, glucosa oxidasa, catalasa e invertasa).
5. Utilizar el micelio producido por la fermentación para:
 - a) una posterior bioconversión de más sustrato, con el fin de hacer un proceso semicontinuo y
 - b) emplearlo como materia prima para la obtención de enzimas.

III GENERALIDADES

3.1. GENERALIDADES DE LOS PROCESOS FERMENTATIVOS

Desde hace miles de años el hombre ha utilizado empíricamente los métodos biológicos para producir y conservar sus alimentos. Así mismo la industria derivada de los procesos biológicos ha contribuido en este siglo a mejorar la salud produciendo antibióticos y vitaminas; a proveer materias primas para la industria alimentaria (al producir saborizantes, aminoácidos, vitaminas, bebidas alcohólicas, etc.) y para la industria química proveyendo de sustancias tales como etanol, acetona, ácido láctico, etc.

Los principios de la microbiología industrial fueron establecidos cuando Pasteur, a mediados del siglo pasado, demostró que la fermentación alcohólica era producida por levaduras. Desde este momento hasta la segunda guerra mundial se desarrollaron muchos procesos industriales de fermentación. Entre los decenios 40 y 50 se lograron grandes avances tecnológicos en el cultivo microbiano y se desarrolló el fermentador agitado con controles automáticos para preservar las condiciones adecuadas de la fermentación. A finales de los años setentas el advenimiento de las técnicas de ingeniería genética vino a dar nuevo impulso a la biotecnología. Sin embargo las técnicas clásicas de

mejoramiento genético siguen siendo una herramienta de gran utilidad en el avance de los procesos biotecnológicos.

Los procesos de microbiología industrial se encargan del aprovechamiento, bajo condiciones controladas, de materiales biológicos tales como microorganismos, tejido celular animal, productos microbianos y enzimas.

Como todos los seres vivos, los microorganismos crecen, se reproducen y además secretan algunos compuestos bioquímicos de importancia para el hombre. Para que una fermentación se realice se necesita tener un microorganismo de características idóneas para el proceso, proveer un medio de cultivo adecuado (que contenga todos los nutrientes esenciales en las proporciones y cantidades óptimas de producción) y finalmente, establecer y controlar las condiciones fisicoquímicas necesarias para el desarrollo de la fermentación. Todas estas variables interaccionan y deben optimizarse para lograr un proceso adecuado ²².

3.1.1. Importancia de la transferencia de oxígeno

En los procesos de fermentación aeróbicos es necesario un suministro idóneo de oxígeno que satisfaga los requerimientos metabólicos de los organismos empleados. Una función adicional de la aireación y agitación es mantener a los microorganismos en suspensión así como homogenizar el medio; aún así, solo una pequeña fracción de la agitación total se requiere para este fin.

En los matraces agitados que se utilizan a nivel laboratorio la aireación y agitación se llevan a cabo por la acción rotativa de la placa que agita al matraz. En los fermentadores de mayor escala el oxígeno se suministra generalmente con una compresora de aire y se cuenta con implementos mecánicos para agitar el medio de cultivo.

La oxidación de la fuente de carbono y su transformación en células, productos y CO_2 establece una demanda de oxígeno que es esencial satisfacer a través de la aireación y mezclado del cultivo. En organismos unicelulares el oxígeno para llevar a cabo una reacción oxidativa dentro de la célula se incorpora generalmente a través de un estado intermediario de la molécula de oxígeno disuelto. En otras palabras, el organismo regula sus actividades metabólicas como respuesta a la concentración de oxígeno disuelto en la fase líquida.

De tal forma que se puede considerar al oxígeno disuelto como un nutriente, análogo a otros nutrientes disueltos como las sales o la glucosa del medio. Pero hay una gran diferencia entre ellos: la solubilidad del oxígeno es extremadamente limitada comparada con la de los otros nutrientes. Por ejemplo, en condiciones normales de operación los nutrientes disueltos, tales como la glucosa, se pueden mantener fácilmente a concentraciones tan altas como 200 g/l o más, mientras que la solubilidad del oxígeno en condiciones normales de fermentación es generalmente menor de 10 mg/l. Aún más, en la mayoría de los casos el oxígeno molecular es incorporado en vez del oxígeno producto de la

reducción de un oxidante químico. Por esta razón es necesario proveer continuamente de oxígeno al medio de cultivo con el fin de cumplir la demanda metabólica del organismo ³².

El mecanismo de transferencia de oxígeno de la fase gaseosa al microorganismo es controlada por la resistencia de la transferencia de masa de la fase líquida. En el caso de absorción de gases en líquidos mediante burbujeo de gas, la resistencia total está representada por la película de líquido. La concentración de líquido en la interface gas-líquido es casi igual a su solubilidad, C_g^* , y C_L es la concentración de oxígeno en el seno de la solución. La velocidad de transferencia de oxígeno se puede expresar así:

$$N_a = k_L a (C_g^* - C_L)$$

Donde: N_a es la velocidad total de transferencia de oxígeno por unidad de volumen (mol O_2 /l h),

y $k_L a$ es el coeficiente de transferencia de oxígeno en la fase líquida (h^{-1}). Siendo a el área específica interfacial para la transferencia de masa.

Es conveniente saber la respuesta exacta del $k_L a$ de un medio de fermentación a cambios de las variables de operación para conocer algunos de los criterios de la fermentación y asegurar que el resultado sea óptimo.

La velocidad de transferencia de oxígeno, N_a , deberá ser siempre mayor que la demanda de oxígeno para que el sistema no esté limitado por éste:

Demanda de oxígeno = $Q_{O_2} X$.

Siendo Q_{O_2} la velocidad específica de consumo de oxígeno (mmO_2/g células-h), y X concentración celular.

$$\text{Además } Q_{O_2} = Q_{O_2 m} \frac{C_L}{K + C_L}$$

Donde: $Q_{O_2 m}$ es la velocidad específica de consumo de oxígeno máxima, C_L la concentración de oxígeno disuelto y K una constante.

La ecuación anterior determina la existencia de un valor crítico de C_L por debajo del cual se presentará un fenómeno de limitación por el oxígeno disuelto, en la velocidad de respiración del microorganismo.

Si la fermentación está limitada por el oxígeno, al aumentar el valor de $k_L a$ aumentará el valor de N_a . Si se desea modificar el $k_L a$ se pueden hacer los siguientes cambios:

- a) diluir el caldo de fermentación,
- b) aumentar la agitación o aireación,
- c) cambiar el diámetro del impulsor,
- d) cambios en los baffles,
- e) disminuir la viscosidad,
- f) aumentar la presión o
- g) enriquecer con oxígeno ²².

Como es evidente sólo unas cuantas de estas alternativas son técnicamente viables.

3.1.2. Microorganismos utilizados

Los microorganismos utilizados en las fermentaciones pueden ser bacterias, levaduras, hongos o algas.

El microorganismo es la clave para el éxito o el fracaso de una fermentación. Un cultivo microbiano de uso industrial debe tener ciertos atributos generales, que según Hesseltine y Haynes son:

- * La cepa debe ser un cultivo puro. Debe estar libre no sólo de otros microorganismos microscópicos visibles, sino también de fagos.
- * La cepa debe tener estabilidad genética.
- * Debe producir fácilmente muchas células vegetativas, esporas u otras unidades reproductoras.
- * Debe crecer vigorosa y rápidamente después de ser inoculada en los tanques de siembra usados para preparar grandes cantidades de inóculo antes de la fermentación industrial.
- * La cepa debe producir el metabolito deseado en un tiempo relativamente corto.
- * Si es posible, la cepa debe ser capaz de protegerse a ella misma contra contaminaciones. Esta protección puede ser por medio de la reducción de pH del medio, del crecimiento a altas temperaturas o de la elaboración rápida de un inhibidor microbiano.
- * De preferencia debe ser fácil de conservar por periodos razonablemente largos.
- * No debe producir compuestos tóxicos para humanos.

- * Deberá ser factible separar el producto deseado.
- * La cepa deberá ser sensible a cambios por ciertos agentes mutagénicos. Un programa de mutagénesis tiene el objeto de desarrollar cepas que tengan un mayor rendimiento del producto deseado.

Los microorganismos de interés industrial pueden ser obtenidos de fuentes naturales o de colecciones de cultivos. En el caso de que se quisiera aislar el microorganismo de la fuente natural se tendría que seguir un proceso como el que se representa en la figura 1.

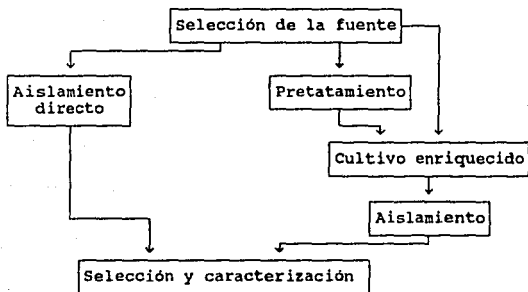


FIGURA 1. DIAGRAMA DE BLOQUES PARA EL AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS A PARTIR DE FUENTES NATURALES.

La selección de las cepas de interés se hace por métodos de *screening* que son procedimientos altamente selectivos que permiten la detección y aislamiento únicamente de los

microorganismos o metabolitos de interés.

Una vez seleccionado el microorganismo idóneo para el proceso fermentativo es necesario tomar en cuenta ciertos aspectos microbiológicos para poder llevar a cabo la fermentación

25
El punto de partida del proceso de fermentación es el cultivo stock. Este es usualmente una preparación de células o esporas del microorganismo deshidratadas (liofilizadas o secadas en arena estéril). El proceso a seguir para propagar el cultivo stock e inocular el fermentador es el que se representa en la figura 2.

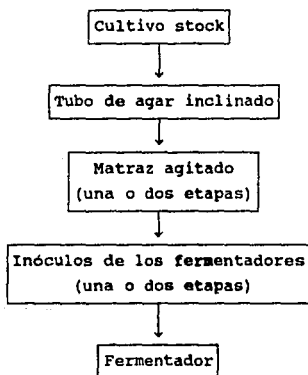


FIGURA 2. ETAPAS DE PROPAGACION DE LA CEPA PARA UN PROCESO FERMENTATIVO.

3.2. CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS HONGOS

Por la naturaleza del trabajo, se describirán brevemente las características de los hongos, en especial de *A. niger*, ya que fué el microorganismo que se utilizó en este proyecto.

Entre los microbiólogos no existe un acuerdo general sobre los límites del grupo de microorganismos denominados hongos. El grupo se define a menudo como comprendiendo aquellos microorganismos eucariotes que tienen paredes celulares rígidas y que carecen de clorofila, aunque por esta definición determinados organismos que son claramente derivados no clorofílicos de algas, deberían ser considerados como hongos. Además, muchos hongos presentan afinidades con los protozoarios.

Todos los hongos son heterótrofos. Comparados con las bacterias los hongos en general tienen requerimientos nutritivos extraordinariamente simples.

La estructura vegetativa de un hongo se llama talo. El talo fúngico más típico está compuesto por filamentos que generalmente están ramificados. Cada filamento individual se denomina hifa y al conjunto de hifas se le llama micelio ².

El examen microscópico de las hifas revela caracteres muy útiles para la identificación de los diferentes géneros de hongos. Estos se dividen en dos grupos: septados, con tabiques transversales que dividen la hifa en varias celdillas y no septados, cuyas hifas cilíndricas carecen de ellos. Los hongos pueden desarrollarse a partir de un trozo de micelio, por medio de esporas asexuales o por esporas sexuales. Las esporas

asexuales se producen en gran cantidad, son pequeñas, ligeras y resistentes a la desecación. Los tipos de esporas asexuales son conidiosporas, artrosporas o esporangiosporas.

Los criterios que se siguen para identificar y clasificar los hongos son los siguientes:

- a) si las hifas son septadas o no,
- b) si el micelio es claro u oscuro,
- c) si el micelio tiene algún color,
- d) si se producen esporas sexuales y de qué tipo,
- e) clase de esporas asexuales,
- f) aspectos microscópicos de las esporas asexuales y
- g) presencia de estructuras especiales ⁹.

Las principales especies que se utilizan en la industria bioquímica son las que pertenecen a los hongos verdaderos.

Los hongos filamentosos a veces tienden a crecer en agregados de hifas llamados pellets.

La acción cortante del propulsor del fermentador juega un papel importante en el cultivo de hongos filamentosos, ya que previene la formación de pellets. Además de reducir la heterogeneidad resultante de la formación de pellets, esta acción cortante puede ser también un requerimiento esencial para el crecimiento exponencial en fermentaciones fúngicas ²⁸.

Existen muchos mecanismos para la formación de pellets: aglomeración de hifas; aglomeración de partículas sólidas e hifas, así como la interacción pellet-pellet.

La estructura de los pellets puede variar considerablemente

desde muy disperso e irregular hasta compacto y esférico. De acuerdo a esto se pueden clasificar en tres clases:

a) pellets dispersos y esponjosos: estos pellets tienen un centro compacto y una zona externa muy difusa.

b) pellets compactos y lisos: este tipo es totalmente compacto y la parte externa del pellets no tiene irregularidades.

c) pellets huecos y lisos: el centro de éstos está vacío debido a autólisis y la parte externa es compacta.

Los factores que influyen en la formación de pellets en las fermentaciones líquidas sumergidas son: la agitación, el medio de cultivo, el pH, la tensión de oxígeno, la adición de polímeros, la presencia de agentes tensoactivos, la velocidad de crecimiento y el inóculo ¹⁶.

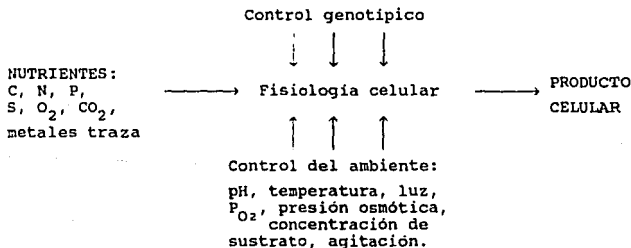


FIGURA 3. PARAMETROS QUE INFLUYEN SOBRE EL COMPORTAMIENTO METABOLICO DE LOS MICROORGANISMOS.

3.2.1. *Aspergillus niger*

A. niger pertenece a la clase de los hongos verdaderos

(eumicetos); a la orden *Moniliales* porque tiene conidióforos libres que surgen del micelio irregularmente; es de la familia *Moniliaceae* y del género *Aspergillus*.

Los *Aspergillus* están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Muchos son responsables de ciertas alteraciones alimenticias en tanto que otros son útiles en la preparación de algunos alimentos y en la obtención de ciertas sustancias como las enzimas. Se ha reportado la existencia de 14 grupos y de cientos de especies.

El grupo de *A. niger*, es la especie más importante. Las cabezuelas en que se encuentran las esporas son grandes, muy apretadas y globulares, de color negro, marrón negrusco o púrpura marrón; los conidios son rugosos con bandas pigmentadas. Los caracteres que distinguen a los *Aspergillus* son: presentan septas, tienen micelio ramificado; sus colonias presentan zonas circulares; el conidióforo surge de una célula podal. El conidióforo, en la porción distal, crece en el interior de una vesícula sirviendo de soporte a los esterigmas de los que se desprenden los conidios. Estos están en cadenas de color generalmente verde, marrón o negro⁹. En la figura 4 se presenta un esquema representativo del género *Aspergillus* donde se aprecian sus características distintivas.

Aspergillus niger es un hongo muy útil para la industria de alimentos, pues es fuente de enzimas como amilasa, glucoamilasa, celulasa, pectinasa, glucosa oxidasa, catalasa e invertasa²⁷. Además de que tiene la gran ventaja de ser considerado como GRAS

(del inglés: Generally Recognized As Safe) por la FDA lo que hace que sus derivados se puedan utilizar con seguridad en alimentos debido a que no presentan peligro para la salud del consumidor.

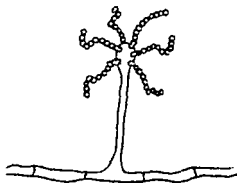


FIGURA 4. ESQUEMA DE UN *Aspergillus*.

3.3 GLUCOSA OXIDASA

La glucosa oxidasa (β - D - glucosa: oxígeno oxidorreductasa) tiene el número de clasificación 1.1.3.4. y se encuentra en algunos hongos incluyendo *Penicillium glaucum*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium amagaskiense*, *Penicillium notatum*, siendo su principal fuente *Aspergillus niger*. También se ha purificado de bacterias como *Pseudomonas*.

Se conoce su existencia desde 1904, cuando se demostró que extractos de *A. niger* tenían la capacidad de oxidar glucosa. En las décadas siguientes esta enzima fue la base para muchas disertaciones doctorales. En los años cuarentas, se pensó que era un tipo de penicilina y se le denominó notatina, penicilina A y posteriormente penicilina B, esto se debió al efecto bactericida del peróxido de hidrógeno que se produce durante la reacción 4,31,12

3.3.1. Propiedades

La glucosa oxidasa cataliza la oxidación de D-glucosa a δ -D-gluconolactona en presencia de oxígeno molecular como se muestra en la figura 5.

Las enzimas de los diferentes hongos que la producen son muy similares en que todas tienen pesos moleculares cercanos a 155,000, contienen dos moles de FAD por mol de enzima y tienen un punto isoelectrónico cercano a 4.2. La reducción con β -mercaptoetanol para romper los puentes disulfuro produce dos subunidades de peso molecular cercano a 80,000. Otros estudios han comprobado que contiene 16% de carbohidratos.

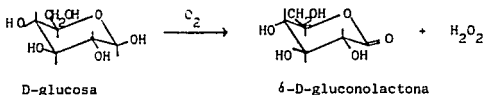


FIGURA 5. REACCION CATALIZADA POR LA GLUCOSA OXIDASA.

Tiene una especificidad muy alta por la β -D-glucopiranososa, ya que la oxida cerca de 160 veces más rápidamente que a la forma α . Se ha demostrado que sólo con la 6-desoxi-D-glucosa y con la 2-desoxi-D-glucosa presenta velocidades mayores del 10% con respecto a las de la D-glucosa.

Su pH óptimo está entre 4.5 y 7.0. La temperatura óptima rara vez se menciona porque la solubilidad del oxígeno disminuye cuando se aumenta la temperatura, lo que tiende a cancelar las ventajas que presentaría un aumento de temperatura. A pesar de

ésto la velocidad de reacción es aproximadamente constante entre 30 y 60 grados centígrados. Esta enzima es relativamente estable en un amplio rango de pH y temperatura. La estabilidad térmica es una propiedad particularmente importante desde el punto de vista práctico. Se ha logrado aumentar la estabilidad térmica utilizando la enzima comercial recubierta, en forma de tableta. De esta forma tanto la glucosa oxidasa como la catalasa soportaron temperaturas de pasteurización (87 grados centígrados de 3 a 6 minutos) en buffers y en una gran variedad de jugos de frutas y vegetales ²⁸.

La glucosa oxidasa se inhibe con iones cobre y por otros agentes reductores comunes de grupos SH. Se presenta inhibición competitiva con arabinosa; y no hay inhibición total por cianuro ni por monóxido de carbono ^{33,23,8}.

3.3.2. Mecanismo de acción y cinética

En 1948 se descubrió que la glucosa oxidasa no oxida a la β -D-glucosa por la combinación directa de oxígeno molecular con la β -D-glucosa. Las siguientes observaciones son evidencia de ésto y del mecanismo de acción.

1. La glucosa oxidasa no es inhibida por HCN y CO, indicando que no contiene un ión metálico esencial. En general, las oxidasas contienen iones metálicos como cofactores esenciales.
2. Otros aceptores de hidrógeno, como la tionina, azul de metileno y quinona pueden reemplazar el requerimiento de oxígeno. La capacidad de usar tales compuestos es característico de

deshidrogenasas y no de oxidasas.

3. Los narcóticos inhiben la capacidad oxidativa de la enzima lo que concuerda con lo observado para otras deshidrogenasas pero no con oxidasas.

4. La alta especificidad de la enzima es una propiedad general de deshidrogenasas y no de oxidasas.

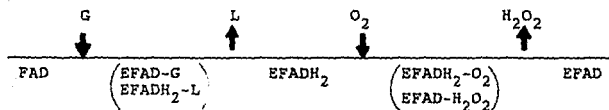
5. Hay una correlación directa entre el contenido de riboflavina y la actividad enzimática. Si se elimina el FAD se pierde completamente la actividad, la que puede ser restituida con la adición de FAD.

6. La glucosa oxidasa en su forma oxidada tiene un máximo de absorbancia a 280 μm , típica de todas las proteínas y otros máximos a 377 y 455 μm debidos al FAD. Si se adiciona glucosa en condiciones anaeróbicas las absorbancias máximas en 377 y 455 μm desaparecen. Cuando se suministra oxígeno al sistema las dos absorbancias máximas reaparecen.

7. La glucosa oxidasa no cataliza la reacción completa bajo condiciones anaerobias y el orden de reacción depende de la concentración de oxígeno. Una evidencia del papel del oxígeno y su fuente se puede obtener con experimentos en donde se usen oxígeno y agua marcadas radiactivamente. Con el H_2O^{18} , el O^{18} se encuentra en el producto final, que es el ácido D-glucónico, pero no en el peróxido de hidrógeno. Con el O_2^{18} , el O^{18} se encuentra solo en el H_2O_2 .

8. Gráficas del inverso de la velocidad contra el inverso de la concentración de oxígeno a diferentes concentraciones de

glucosa dan una serie de líneas paralelas. Estos datos indican no sólo la dependencia de la velocidad en las concentraciones de oxígeno y glucosa, sino también que el mecanismo es de tipo Ping Pong Bi Bi. La figura 6 muestra un esquema de tal mecanismo.



G = β -D-glucosa y L = δ -D-gluconolactona.

FIGURA 6. MECANISMO DE ACCION DE LA GLUCOSA OXIDASA.

Basados en los datos anteriores una reacción mas detallada se puede escribir como se representa en la figura 7.

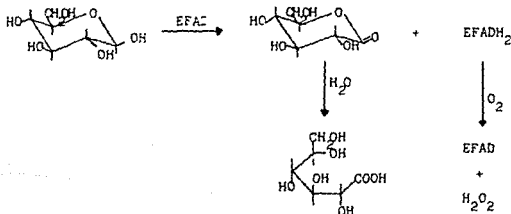


FIGURA 7. REACCION CATALIZADA POR LA GLUCOSA OXIDASA.

La forma oxidada de la enzima, EFAD, funciona como una deshidrogenasa al extraer dos hidrógenos de la β -D-glucosa para

formar la enzima reducida, EPADH_2 , y la δ -D-gluconolactona. En un paso subsecuente la δ -D-gluconolactona se hidroliza, no enzimáticamente, a ácido D-gluconico y la enzima reducida es reoxidada por oxígeno molecular (enzimáticamente) ³³.

La reacción catalizada por esta enzima es de segundo orden, pero comercialmente se usan condiciones en donde uno de los reactivos tiene una concentración en exceso y por lo tanto constante, de tal forma que la reacción se comporta como de pseudo primer orden ²³.

En presencia de catalasa hay una pérdida neta de una molécula de O_2 por dos de D-glucosa oxidadas, a comparación de la relación uno a uno encontrada en ausencia de catalasa ³³.

3.3.3. Aplicaciones

La aplicación más importante de esta enzima es en la eliminación de la glucosa del huevo antes de su secado o deshidratación. Esto es necesario ya que de otra manera el huevo en polvo tiende a presentar reacciones de deterioro, como el oscurecimiento no enzimático ¹.

Hay dos tipos principales de oscurecimiento no enzimático que tienen lugar en el secado del huevo. Uno es debido a la reacción de la glucosa con grupos amino de las proteínas y aminoácidos en la clara, lo que produce el indeseable color café, así como las interferencias con propiedades deseables de horneado y propiedades funcionales como: batido, solubilidad, volumen de esponjado, etc.

El otro tipo de oscurecimiento no enzimático es debido a una reacción entre glucosa y cefalina (3-5n-fosfatidil aminoetanol) presente en la yema, que no sólo tiene productos cafés, sino que también produce sabores desagradables.

Por investigaciones realizadas se comprobó que el único medio práctico de prevenir el oscurecimiento en huevos era el eliminar los azúcares reductores, la mayoría de ellos son glucosa, que se encuentra en niveles de aproximadamente 1%.

La enzima se aplica al huevo entero y a la yema. A aproximadamente 450 kg de huevo se le agrega la enzima en una proporción de cerca de 100,000 unidades Sarrett; se tienen que añadir 600 ml de H_2O_2 al 35%. Una unidad Sarrett es la cantidad de enzima (en presencia de exceso de catalasa) que cataliza la conversión, a 30°C, de 10 ml de O_2 por minuto por mililitro de mezcla de reacción, a pH 5.9 en presencia de glucosa. Se agrega peróxido de hidrógeno con la catalasa para proveer más oxígeno y por lo tanto oxidar más rápidamente a la glucosa que si se hiciera por difusión lenta del oxígeno dentro de la solución. Uno de los problemas de este método es que el peróxido de hidrógeno añadido oxida aparentemente algunos de los lípidos, dando como resultado algunos sabores desagradables.

La catalasa que tienen algunas preparaciones comerciales forma espuma, ésta ayuda a mantener la emulsión y también a excluir bacterias de la emulsión haciéndolas flotar, contribuyendo a mantener la esterilidad. La reacción se lleva a cabo a 13°C. El contenido de glucosa disminuye en huevo entero de

aproximadamente 1% a 0.1% en 4 horas; en la yema se logra el mismo resultado en cerca de 6 horas ²⁷.

Las demás aplicaciones de la glucosa oxidasa tienen relación con muchos atributos de calidad de los alimentos, haciendo difícil tratarlos por separado. Tanto el oxígeno como la glucosa que se eliminan como el peróxido de hidrógeno y el ácido glucónico formados, pueden ser determinantes en la calidad de los alimentos.

Se puede agregar la enzima para eliminar oxígeno y prevenir el oscurecimiento enzimático de frutas y verduras frescas congeladas. También se puede aplicar sobre frutas frescas en forma de una capa protectora con azúcar, dando como resultado la desoxigenación de la capa superficial.

La eliminación de oxígeno con esta enzima durante la fabricación del vino se ha intentado con resultados preliminares prometedores. Algunos problemas potenciales de esta aplicación en particular incluyen: conversión de etanol a acetaldehído, la necesidad de agregar glucosa a vinos muy secos y la inhibición de la glucosa oxidasa por sulfito, que se usa frecuentemente en el procesamiento de vinos blancos.

Otro uso está involucrado en la prevención del oscurecimiento indeseable de la carne. El color café oscuro se debe a la formación de la metamioglobina, ésta depende de la concentración de oxígeno y mioglobina libre, así como del pH y temperatura (la reacción se favorece en pH cercano a 8). La

presencia de un sistema enzimático reductor en la carne, propone que un empaque anaeróbico pueda ser práctico para prevenir la formación de metamioglobina en la superficie de la carne.

Se ha reportado que la glucosa oxidasa ayuda a mantener el color rosado de los camarones. También se ha observado que el uso de películas para envolver carnes tratadas con glucosa oxidasa y catalasa previene la decoloración de rojo a gris. Si no se agrega catalasa, la carne adquiere un color verde después de abrir el empaque, probablemente debido a la producción continua de H_2O_2 ²⁷.

Además de los anteriores, se encuentran los siguientes usos actuales y potenciales:

1. Mejorar y retener la claridad y brillantez de la cerveza.
2. Retener el color y prevenir la corrosión en bebidas de fruta enlatadas. Se ha utilizado glucosa oxidasa con bajo contenido de celulasa para el tratamiento de jugos de naranja con el fin de mantener la frescura y el sabor.
3. Evitar la oxidación deteriorativa de alimentos deshidratados como leches en polvo, harinas preparadas para pastel, sabores encapsulados, etc.
4. Preservar la frescura de aderezos salados y mayonesa.
5. Prevenir el deterioro oxidativo de materiales de empaque.
6. Producción de bebidas dietéticas libres de glucosa.
7. Producción de fructosa.
8. En general, prevenir la oxidación de grasas en alimentos con

alto contenido de lípidos.

También se ha utilizado en forma inmovilizada como reactivo analítico para la determinación de glucosa .

Como agente terapéutico, ayuda a disminuir la formación de la placa dental cuando se incorpora en sustancias de lavado bucal junto con amiloglucosidasa ^{15,6,27}.

3.3.4. Uso de la glucosa oxidasa inmovilizada

Las enzimas de uso industrial pueden ser inmovilizadas sobre diferentes soportes sin que pierdan sus propiedades de catalizador biológico. Estas enzimas pueden ser utilizadas repetidamente en sistemas de reacciones continuas o discontinuas ¹.

Los métodos de inmovilización más comunes, que se representan en la figura 8, son:

Atrapamiento. Consiste en envolver a la enzima entre varias moléculas de polímero, el más empleado es la poliacrilamida.

Microencapsulación. En el que la enzima se rodea de una membrana del polímero, formando una cápsula. Estas cápsulas tienen tamaños que varían de una a varias micras. La membrana evita que la enzima se pierda y a su vez permite que pequeñas cantidades de sustrato alcancen la enzima.

Intercambio iónico. Por interacciones electrostáticas se pueden adherir a resinas intercambiadoras, siendo este método sencillo y barato.

Entrecruzamiento. Se han polimerizado enzimas por entrecruzamiento con agentes bifuncionales tales como benzidina, disotiocianatos, glutaraldehído, etc. En general, el producto es gelatinoso y no se puede manejar con facilidad.

Adsorción. Es el método más antiguo. Se han utilizado como adsorbentes polímeros orgánicos, vidrio, sales minerales, óxidos de metal y varios compuestos de silicio como bentonita y sílice coloidal.

Adsorción y entrecruzamiento. Este método aumenta en muchos casos la estabilidad de las enzimas a comparación del uso de cada uno de ellos por separado.

Copolimerización. La enzima se encuentra formando parte del polímero. Generalmente se usa la copolimerización entre anhídrido maleico y etileno, al que se ha hecho reaccionar previamente con etilendiamina.

Unión covalente. Se realiza entre la enzima y el soporte, como tal se han usado gran variedad de polímeros orgánicos.

Las enzimas se inmovilizan en materiales insolubles en agua. De tal forma que pueden ser añadidos o extraídos de la mezcla de reacción sin mayor dificultad, lo que permite un mejor control de la reacción, su automatización y la reutilización de la enzima inmovilizada ²².

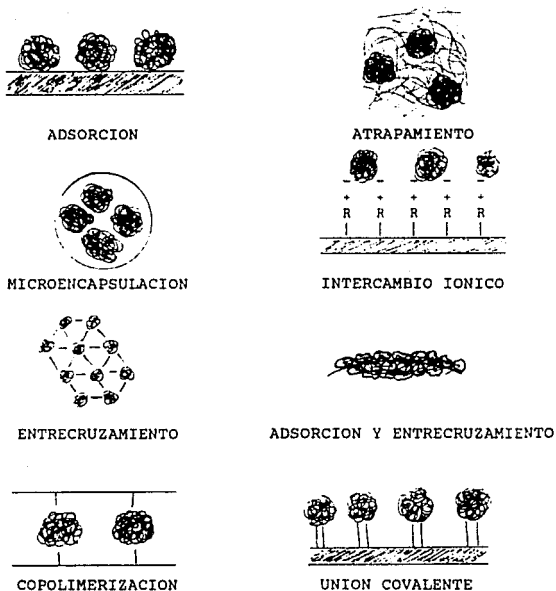


FIGURA 8. REPRESENTACION ESQUEMATICA DE
LOS METODOS DE INMOVILIZACION DE ENZIMAS.

Se han utilizado como soportes para la glucosa oxidasa: ácido alginico, vidrio, celita, quitina, colágeno, arcilla. Otros soportes donde se ha inmovilizado por adsorción son: DEAE-celulosa, dialdehido de celulosa y dialdehido Epidex. También se ha atrapado en, poliacrilamida, glutaraldehido,

γ -aminopropil-tri-etoxil-silano, 2-hidroximetacrilato, sílica, óxido de níquel y vanacril.

Se ha visto que la glucosa oxidasa se inactiva cuando se inmoviliza, debido a que el peróxido de hidrógeno formado no difunde al exterior de la enzima, permaneciendo en el soporte. Esto se puede prevenir inmovilizando catalasa en el mismo soporte, aunque ultimamente se demostró que la catalasa también pierde actividad. Para resolver este problema se ha experimentado la inmovilización de glucosa oxidasa y catalasa con óxido de manganeso o con carbón activado ya que se ha demostrado que estos compuestos catalizan la descomposición del peróxido de hidrógeno ^{6,5,3}.

Uno de los avances más recientes es la producción de *Aspergillus* en forma de pellets, los que se inmovilizan utilizando albúmina y glutaraldehído. Con este procedimiento se retiene la actividad de catalasa. Los pellets de glucosa oxidasa mostraron un pH óptimo menor que el de la enzima nativa (pH = 5), una estabilidad más amplia de pH y una estabilidad mayor de temperatura. No se encontraron restricciones difusionales para el acceso del oxígeno a la enzima, pero si había restricciones difusionales significantes para el paso del peróxido de hidrógeno del sitio enzimático al medio externo, por lo que se presentó desactivación. Para solucionar este problema se probó la inmovilización de las células con sílica coloidal y alginatos ^{8,10}.

3.4. ACIDO GLUCONICO

El ácido glucónico se aisló por primera vez en 1878 por Bourtroux al hacer investigaciones sobre fermentaciones lácticas. No obstante, no fue disponible comercialmente hasta 1930. Desde entonces, este ácido y sus derivados han sido importantes en la industria farmacéutica, de alimentos y en general en el campo químico.

3.4.1. Características generales

El ácido glucónico, ac. pentahidroxicapróico, es un polvo cristalino blanco e inodoro, no es tóxico. Algunas de sus propiedades físicas son:

peso molecular 196.16,

punto de fusión a 131 °C,

rotación específica $[\alpha]_D^{20} = -6.7$

$K_a = 2.5 \times 10^{-4}$

Es muy soluble en agua, pero poco soluble en alcohol y casi insoluble en otros disolventes orgánicos.

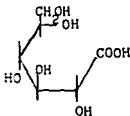


FIGURA 9. ACIDO GLUCONICO.

En soluciones acuosas está en equilibrio con la delta y gama lactonas.

El ácido glucónico se puede comercializar en forma sólida o en solución acuosa al 50%, la cual es de color ambarino y gravedad específica de 1.24 a 25 °C.

La D-glucono- δ -lactona también es de interés comercial. Se puede preparar por cristalización de soluciones acuosas de ácido glucónico. Es un polvo blanco, inodoro y de sabor dulzón. Sus propiedades físicas son:

peso molecular de 178.14

punto de fusión a 153 °C,

rotación específica $[\alpha]_D^{20} = + 61.7^\circ$

Es soluble a razón de 59 g en 100 ml y 1 g en 100 ml en agua y alcohol respectivamente a 20°C, y es prácticamente insoluble en los demás disolventes orgánicos. Al adicionarle agua, la glucono- δ -lactona se hidroliza parcialmente a ácido glucónico, siendo el producto final una mezcla en equilibrio de las dos lactonas y el ácido.

El ácido glucónico es capaz de formar complejos solubles en agua con ciertos iones metálicos. Esta conversión de iones di y trivalentes, como el Ca y Fe, a formas desionizadas solubles en agua, se denomina capacidad secuestrante.

Una propiedad particularmente importante del ácido glucónico es su acción corrosiva extremadamente baja sobre los metales.

A pesar de su multifuncionalidad, se han encontrado aplicaciones muy limitadas del ácido glucónico en síntesis orgánicas, debido a que los derivados que forma son muy inestables.

3.4.2. Métodos de obtención

Los métodos de obtención del ácido glucónico se pueden clasificar en métodos químicos y métodos biológicos.

Los métodos químicos se basan en la oxidación de la glucosa. Esta oxidación se puede llevar a cabo en una solución acuosa amortiguada con bromo (hipobromito) ^{7,29}. También se puede hacer por oxidación directa de la glucosa con oxígeno en presencia de un catalizador de paladio ¹⁴. El método químico más utilizado es la oxidación electrolítica de soluciones alcalinas de glucosa, usando un ánodo insoluble en la presencia de yoduros o de bromuros ^{21,17}.

Los métodos biológicos, consisten en la fermentación de la glucosa utilizando hongos como *Penicillium citrinum*, *P. divaricatum*, *P. luteum purpurogenum*, *Aspergillus niger* y *P. luteum*. Otros métodos utilizan bacterias del grupo de acetobacter como *Bacterium industrium*, *Bacterium oxydans* y *Bacterium pasteurianum* ²¹. Otros géneros de hongos que producen este ácido son: *Gliocladium*, *Scopulariopsis*, *Gonatobotrys* y *Endomycopsis* ¹⁹.

3.4.2.1. Medios de cultivo

Para el cultivo sumergido las materias primas son D-glucosa y oxígeno. La glucosa se puede obtener de una solución de glucosa cristalina, como jarabe obtenida de almidón hidrolizado, o de materiales almidonosos crudos tratados con α -amilasa seguida de amiloglucosidasa, la que deberá estar libre de transglucosidasa, ya que contaminaría al gluconato con gentobiosa e isomaltosa,

diminuyendo, por lo tanto, el rendimiento del producto principal.

El oxígeno se suministra pasando aire por el caldo de fermentación. La baja solubilidad del oxígeno en medios acuosos y la rapidez con la que es consumida biológicamente, hace que el suministro de O_2 sea un factor limitante en la producción del ácido glucónico. Por esta razón se necesita que las condiciones de operación mantengan la concentración de oxígeno disuelto al máximo posible ²⁸.

Todos los medios de cultivo reportados en la literatura, tienen como fuente de carbono glucosa, no se encuentra ninguno que mencione sacarosa. Se ha experimentado con concentraciones de glucosa que van desde 80 hasta 350 g/l, aunque las concentraciones más utilizadas han sido de 220 a 250 g/l ^{8,17,18,19,20,26}.

Las fuentes de nitrógeno, utilizadas han sido muy variadas: sales de amonio, urea, líquido de cocimiento de maíz y peptona. Es importante hacer notar que la concentración de nitrógeno debe ser baja, ya que demasiado nitrógeno en el medio, daría como resultado un crecimiento excesivo y una disminución en el rendimiento de gluconato ^{8,17,19}. Más adelante se explicará con detalle el mecanismo debido al cual una alta concentración de nitrógeno disminuye la producción de gluconato.

El fosfato monobásico de potasio y el sulfato de magnesio, se encuentran reportados como fuentes de fósforo, azufre y elementos traza. Las concentraciones mencionadas van de 0.188 a 0.3 g/l en el caso del KH_2PO_4 , y de 0.156 a 0.2 para el $MgSO_4$ ^{8,19}.

3.4.2.2. Condiciones de fermentación

Los parámetros de fermentación reportados son los siguientes:

Temperatura. Las fermentaciones mencionadas en la literatura se han llevado a cabo con un control de temperatura de 30 a 34°C.

Aireación. De 1.0 a 1.5 vvm (volumen de aire por volumen de medio por minuto).

Agitación. de 350 a 700 rpm.

Presión. Algunos de los experimentos reportados se han realizado en tanques a presión, siendo ésta de 30 a 35 lb/in².

pH. El pH se puede regular agregando carbonato de calcio o hidróxido de sodio para obtener gluconato de calcio o de sodio respectivamente. El pH al que se regulan las fermentaciones reportadas varía de 6.0 a 6.5. Cuando se utiliza carbonato de calcio para neutralizar el ácido glucónico formado, se debe añadir poco a poco una vez que se ha formado una cantidad suficiente de glucono- δ -lactona. La lactona tiene una acción amortiguadora por lo que el aumento tan brusco de pH no afecta al micelio. La ventaja de usar NaOH es que como es mucho más soluble que el CaCO₃ es un medio preciso para neutralizar el ácido mientras éste se va formando. La adición de hidróxido de sodio se controla automáticamente ¹⁹.

3.4.2.3. Algunas consideraciones cinéticas

En las fermentaciones donde se han utilizado tanques a presión, se reportan tiempos de fermentación de 18 y 19 horas y consumo de glucosa de 97% ^{8,17}

En las fermentaciones realizadas en tanques comunes la duración del proceso ha sido de 36 horas ^{19,25}.

Una observación importante es que el micelio se puede reutilizar con el fin de realizar varias bioconversiones en sistemas semicontínuos. Algunos autores mencionan que se pueden hacer 13 bioconversiones consecutivas, sin un decremento significativo de la actividad. La pequeña pérdida de actividad que se produce, se compensa por la eliminación de la fase lag en la producción de gluconato ⁸.

En el caso que se quiera reutilizar el micelio hay que dejarlo sedimentar durante 30 min. aproximadamente una vez suspendidas la agitación y la aireación del medio. Se decanta el líquido y el micelio se transfiere en condiciones estériles a un fermentador con una solución de glucosa (C = 160 g/l).

Un método que se reporta para aumentar el rendimiento de la fermentación es que el medio contenga inicialmente 270 g/l de glucosa para adicionar subsecuentemente 300, 80 y 90 g/l ^{17,20}.

Es importante aclarar la razón por la que *A. niger* cuando crece en medios con alto contenido de nitrógeno no presenta rendimientos altos de ácido glucónico: *A. niger* en presencia de exceso de nitrógeno en el medio, incrementa su consumo de gluconato como fuente de carbono.

Este comportamiento se debe a que hay un alto contenido de la enzima gluconoquinasa en el micelio del microorganismo. Esta enzima es la encargada de transformar el ácido glucónico en

6-fosfogluconato para metabolizarlo por las vías de pentosa-fosfato y de Embden-Meyerhof. De tal forma que si hay carencia de nitrógeno en el medio, el consumo de gluconato se ve limitado por el bajo contenido de gluconoquinasa en el micelio. La biosíntesis de la gluconoquinasa se induce por la presencia de altas concentraciones de gluconato ^{26,18}.

Se han utilizado fermentaciones sumergidas por muchos años, aunque un productor de Estados Unidos lo ha hecho por un proceso de cultivo sobre una superficie líquida. Los procesos fermentativos han demostrado ser competitivos con los químicos, ya que los agentes químicos oxidantes débiles son muy costosos, a pesar de que se tenga que hacer una inversión inicial menor ¹⁹.

La tabla 3 presenta la producción mundial y precios de ácidos orgánicos. Se puede observar que el método más utilizado para la producción del ácido glucónico es el fermentativo.

El mercado del ácido glucónico ha estado creciendo durante 40 años, y hay evidencias que sugieren que sigue creciendo en algunas áreas de uso. Por esta razón se han seguido mejorando las condiciones de manufactura: se han mejorado cepas; se ha probado la reutilización del micelio, ya que se reduce la fase lag y hay un mínimo de productos secundarios. Un posible desarrollo puede ser el uso de células inmovilizadas o glucosa oxidasa inmovilizada.

TABLA 3. PRODUCCION MUNDIAL DE ACIDOS ORGANICOS EN 1987

ACIDOS	TOTAL	OBTENIDOS	PRECIO
	miles ton/año	POR FERMENTACION	(Francos/kg)
Acético	2500	(¿vinagre?)	4
Adípico	600	-	8
Ascórbico	70	mixto (quím.y fern.)	-
Cítrico	400	300	10-12
Fumárico	60	10	10
Glucónico	40	40	10
Glutámico	350	350	30
Itacónico	20	20	17-22
Láctico	30	15	12-13
Propiónico	100	-	5

Biofutur. Febrero 1987.

3.4.3. Aplicaciones

Usos en alimentos:

La inclusión de pequeñas cantidades de ácido glucónico en grasas y aceites de origen animal y vegetal como: lardo, carne con alto contenido de grasa, aceite de algodón hidrogenado, etc., evita que se arrancien, estabilizándolos.

La glucono- δ -lactona, es un agente leudante muy efectivo, ya que tiene una liberación gradual de CO_2 mayor que la obtenida utilizando ácido tartárico y sus sales. Al ser un mejor agente leudante, se obtienen productos de miga más uniforme.

Otros usos:

Se han utilizado ácido glucónico y glucono- δ -lactona como catalizadores en la industria textil, ya que no son tóxicos ni

suavizantes, además porque tienen baja capacidad corrosiva.

La capacidad secuestrante del ácido glucónico y la glucono lactona ha sido de utilidad en las siguientes industrias: del cuero, especialmente para la producción de cuero blanco; en la industria fotográfica; en la de pintura litográfica; en la fabricación de pinturas solubles en agua ²¹.

3.4.4. Derivados y sus aplicaciones

Se han estudiado y preparado muchas sales metálicas del ácido glucónico: gluconatos de cobre, magnesio, manganeso, y potasio; pero comercialmente las sales más importantes son los gluconatos de sodio, calcio y fierro.

Gluconato de calcio. $\text{Ca}(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_7)_2$. Se presenta en forma de cristales finos en forma de agujas, inodoras e insípidas. Se cristaliza de soluciones acuosas concentradas de ácido glucónico cuando éste se neutraliza con carbonato de calcio. El gluconato de calcio es poco soluble en agua e insoluble en alcohol y éter.

Este gluconato es muy usado en el tratamiento de enfermedades causadas por la deficiencia de calcio en el organismo. Para esta aplicación, se agregan pequeñas cantidades de lactato, sacarato o heptonato al gluconato, para aumentar su solubilidad y poder obtener una solución con alto contenido de calcio que es estable, incristalizable y esterilizable.

El gluconato de calcio, junto con el de magnesio han demostrado ser ingredientes útiles en la formulación de dentífricos ¹⁷.

Otro uso, es en la prevención de un oscurecimiento excesivo en los productos fritos de papa. También puede darse un tratamiento a gallinas para aumentar la calidad del cascarón del huevo ²¹.

Gluconato de fierro. $\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_7)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Es un polvo cristalino de color verde amarillento, con un ligero olor a azúcar quemada. Es estable al aire, pero las soluciones de gluconato de fierro se reducen con la luz debido a una reacción fotoquímica.

Se usa frecuentemente para proveer fierro en casos de anemia. También se utiliza, junto con otros metales traza en formulaciones para horticultura. El fosfogluconato de fierro también se ha utilizado con éxito para el tratamiento de anemia secundaria ^{17,21}.

Gluconato de sodio. $\text{NaC}_6\text{H}_{11}\text{O}_7$. Se encuentra en forma de cristales irregulares, inodoros e incoloros. Soluble en agua a razón de 59 g en 100 ml a 25 °C, pero insoluble en disolventes orgánicos. Las soluciones acuosas son neutras y estables aún a 100 °C. Está disponible en forma sólida o como solución acuosa.

Se utiliza principalmente como agente secuestrante de calcio y fierro. La acción secuestrante de calcio es baja aún a pH 14, pero en presencia de hidróxido de sodio libre, se hace evidente. Esta mejora se atribuye a la ionización de los grupos hidroxilos que permiten la formación de anillos quelantes. Esta propiedad permite el uso del gluconato de sodio en el lavado de botellas de vidrio, proceso en el cual se utiliza hidróxido de sodio al 5%

caliente. En localidades donde hay agua dura, los hidróxidos de calcio y magnesio forman costras difíciles de eliminar; para eliminar este problema, se agrega gluconato de sodio a razón de una parte de gluconato por diez de NaOH, para secuestrar a los metales alcalinotérreos.

El gluconato de sodio tiene una alta capacidad secuestrante de iones Fe en un rango muy amplio de pH. Esta propiedad se aprovecha para eliminar la herrumbre de partes metálicas, cuando se usa con NaOH al 4%. También se usa muy comunmente como aditivo en mezclas de cemento, ya que mejora el fraguado y otras propiedades importantes de la mezcla ^{17,21}.

3.5. FRUCTOSA

3.5.1. Características generales

La fructosa, D-fructosa, tiene un peso molecular de 180.16, es un monosacárido reductor (cetohehexosa) que se encuentra libre en algunas frutas o formando parte de la sacarosa y la inulina. Es un polvo cristalino blanco, inodoro, higroscópico, se descompone a 104°C, tiene un ángulo de rotación de $[\alpha]_D^{20} = -92^\circ$, presenta mutarrotación por el equilibrio de las formas furanosa y piranosa. Es muy soluble en agua y en etanol. A 20 °C es 79% soluble en agua, a comparación de la glucosa (47%) y la sacarosa (67%). Es el azúcar más dulce que existe en la naturaleza ya que tiene un poder edulcorante de 1.3 a 1.5 veces el de la sacarosa. Su dulzura máxima se obtiene a temperaturas bajas y a un pH neutro o ligeramente ácido ¹

Es una sustancia muy reactiva. Cuando se almacena a temperatura ambiente se oscurece rápidamente, y se polimeriza formando dianhidros. También reacciona muy rápidamente con aminas y proteínas en reacciones de oscurecimiento de Maillard.

3.5.2. Fuentes de obtención

Se produce por varios metodos:

1. Por hidrólisis ácida de sacarosa se obtiene lo que se denomina azúcar invertido, que es una mezcla 50:50 de D-glucosa y D-fructosa. El inconveniente es que se producen jarabes de baja calidad debido a la presencia de hidroximetil furfural (HMF).

2. Isomerización de D-glucosa con glucosa-isomerasa. Este proceso resulta en una mezcla de 58% de D-glucosa y 42% de D-fructosa. La mezcla es casi equivalente en dulzura al azúcar invertido. A esta mezcla se le conoce comercialmente como jarabe con alto contenido de fructosa (HFCS). Por su precio bajo ha ocupado una parte significativa del mercado de edulcorantes, que usualmente encabeza la sacarosa. En E.U.A., por ejemplo, los HFCS de segunda generación (52% de fructosa) han sustituido a la sacarosa en más de un 35% de sus aplicaciones, destaca el desplazamiento que ha sufrido la sacarosa como materia prima en la elaboración de bebidas carbonatadas.

En la producción de jarabe alto en fructosa se parte de almidón de maíz, el cual se trata con vapor y α amilasa termoresistente. La pasta obtenida (licuada) es enfriada y el pH se ajusta para adicionar glucoamilasa, con el fin de producir

D-glucosa. El jarabe obtenido, es clarificado y desionizado para ser posteriormente alimentado a una columna con glucosa-isomerasa inmovilizada, obteniéndose la mezcla de glucosa (58%) y fructosa (42%).

Usando columnas de intercambio iónico de calcio, la D-fructosa se puede concentrar a niveles más altos (92% de fructosa o jarabes de tercera generación) o incluso se puede obtener pura ¹⁴.

La fructosa pura cristalina tiene un precio tan alto que la hace no competitiva con los otros edulcorantes comerciales como la sacarosa y los jarabes de maíz. Aún así, se utiliza como edulcorante para propósitos dietéticos especiales.

Los métodos de cristalización son muy complicados pudiéndose o no utilizar etanol absoluto. En el caso de usarlo la cristalización dura varios días y se lleva a cabo a temperaturas de 0-2 °C ³⁴.

Si no se quiere utilizar etanol se debe partir de una solución saturada de fructosa que se siembra con cristales de fructosa anhidra. La mezcla se debe enfriar de 55 a 47 °C en 25 horas a una velocidad de 0.336 grados por hora. Así se obtiene un rendimiento de 46% de fructosa anhidra 100% pura ³⁴.

3.5.3. APLICACIONES

Se utiliza en forma de jarabe fructosado como edulcorante en la formulación de mermeladas, gelatinas, alimentos horneados, mezclas preparadas para pasteles, pudines, polvos para hacer

bebidas, helados, dulces y yogurt.

Las características y propiedades funcionales más importantes de los jarabes fructosados son: tienen alta capacidad de retención de agua, que evita que muchos productos de confitería se deshidraten o sequen. La presencia de fructosa controla la cristalización de los productos que la contienen. Las mezclas de fructosa y glucosa son rápidamente fermentables por las levaduras utilizadas en la panificación, y además se combinan con aminoácidos durante las reacciones de Maillard, para formar los pigmentos característicos de los productos horneados ¹.

Se usa con propósitos dietéticos porque al ser más dulce que la sacarosa o glucosa, se necesita consumir menos para llegar a un determinado grado de dulzura, por lo que hay un consumo menor de calorías. Otra aplicación muy importante es en alimentos para diabéticos, ya que no eleva el contenido de azúcar en la sangre ¹³. Otra de las características importantes por las que se utiliza para la elaboración de alimentos especiales es porque no induce caries dental.

IV MATERIALES Y METODOS

4.1. CEPAS UTILIZADAS, SU CONSERVACION E INOCULOS

Se utilizaron dos cepas de *Aspergillus niger*. La primera fue obtenida en el laboratorio del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química, por mutación con nitroso guanidina. Esta es la cepa referida como 4201.

La segunda es una cepa de colección obtenida por un convenio de investigación con el Instituto de Microbiología de Praga, Checoslovaquia. Al hacer referencia a esta cepa, se hará como a la AN166.

Ambas cepas se conservaron en tubos inclinados con medio de Czapek dox, cuya composición es la siguiente:

Componente	Concentración (g/l)
Sacarosa	30.0
NaNO ₃	3.0
K ₂ HPO ₄	1.0
MgSO ₄	0.5
KCl	0.5
FeSO ₄	0.01
Agar	15.0

pH final = \pm 7.3

Los tubos se incubaron a 28°C durante 15 días. Posteriormente se mantuvieron en refrigeración (4°C). Se hicieron resiembras cada 3 meses aproximadamente.

Los inóculos se obtuvieron extrayendo las esporas con una solución tensoactiva, aproximadamente 7 días después de comenzada la esporulación. Las suspensiones de esporas se obtuvieron por agitación vigorosa del cultivo inclinado, con 10 ml de una solución compuesta por 0.1% de tween 80 y 15% de glicerol. Esta suspensión de esporas se dividió en porciones de 2 y 4 ml, en tubos con tapón de rosca, y luego, se procedió a almacenarlos a -4 °C con el propósito de obtener un stock para sembrar los inóculos o pies de cuba con una proporción de 2 ml de suspensión de esporas por 50 ml de medio. La concentración obtenida en la suspensión de esporas varió de 1×10^7 a 4×10^7 esporas por mililitro aproximadamente. Para la cuenta de esporas se utilizó una cámara de Neubauer.

4.2. CONDICIONES Y SEGUIMIENTO DE LA FERMENTACION

Los medios de cultivo que se mencionan fueron utilizados tanto para la preparación de inóculos así como para las fermentaciones:

Medio 1

Componente	Concentración (g/l)
Glucosa	150.00
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2.00
KH_2PO_4	0.25

Componente	Concentración (g/l)
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.25
KCl	0.25
FeCl ₃	0.01
Antiespumante	1% del volumen total

Se ajustó el pH a 6.0 después de esterilizar.

Medio 2

Componente	Concentración (g/l)
Sacarosa	400.00
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	2.00
KH ₂ PO ₄	0.25
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.25
KCl	0.25
FeCl ₃	0.01
Antiespumante	1% del volumen total

Se ajustó el pH a 6.0 después de esterilizar.

Los medios 1 y 2 son el resultado de un proceso de optimización realizado previo a este trabajo.

Las jarras de fermentación junto con los medios fueron esterilizados en autoclave a 15 lb/in² de presión por 20 min.

El medio 1 se utilizó en las fermentaciones de 0.5 l con ambas cepas. Mientras que el medio 2 sólo se usó con la cepa AN166, primero en un volumen de 0.5 l, y posteriormente en todas

las fermentaciones de 4 l.

Los inóculos fueron en todos los casos de un volumen igual al 10% del volumen final de fermentación. Así, en el caso de las fermentaciones de 0.5 l, el inóculo fué de 50 ml y para las de 4 l, el inóculo fué de 400 ml.

Los inóculos ya sembrados con la suspensión de esporas se incubaron a 30° C con una agitación de 100 rpm, durante 24 horas. La incubadora utilizada en estos casos fue una G24 New Brunswick. Una vez transcurrido este tiempo se inoculó el medio de cultivo bajo condiciones estériles.

Para las fermentaciones de 0.5 l se utilizó un fermentador Bioflo, New Brunswick, modelo C 30, unido a un controlador de pH automático de la misma marca, modelo pH-22.

Las fermentaciones de 4 l se hicieron en un fermentador Lh 2000.

Las condiciones de fermentación en el caso de 0.5 l fueron: temperatura = 30°C, pH = 6.0, agitación = 550 rpm, aireación = 1 vvm. La regulación de pH se hizo con NaOH 6 N estéril.

Las condiciones para las fermentaciones de 4 l fueron: temperatura = 30° C, pH = 6.0, se probaron agitaciones de 800 y 1000 rpm, y aireaciones de 1 y 1.2 vvm. La regulación de pH se realizó con NaOH 6 N estéril.

Para seguir la evolución de las fermentaciones se determinaron las concentraciones de sacarosa o glucosa, según el caso, la de gluconato de sodio y la de fructosa. Más adelante se

describe cómo se realizaron tales determinaciones. Además se determinó la actividad de glucosa oxidasa de cada muestra de micelio, que se se secó previamente en una estufa de vacío a 25°C.

La cantidad de biomasa final se determinó por medio del peso seco del micelio, mismo que se separó del medio de fermentación por filtrado al vacío. El secado del micelio se llevó a cabo en estufa de vacío durante 12 horas a 25°C.

4.3. DETERMINACION DE CARBOHIDRATOS Y GLUCONATO DE SODIO

Para determinar la concentración de sacarosa, glucosa, fructosa y gluconato de sodio en las muestras, se emplearon dos cromatógrafos de líquidos de alta presión Beckman, modelos 110A y 421A. Se utilizó una columna Altex Ultrasphere-ODS, cuyas características son: \bar{d}_p 5 μ , 4.6 mm ID X 25 cm. Cuando se utilizó esta columna, la glucosa y la fructosa fueron eluidas juntas en un solo pico, por lo que cuando fue necesario cuantificarlas por separado se utilizó una columna, específica para carbohidratos, Altex μ -spherogel carbohydrate X 7.5 de 7.5 mm ID X 30 cm. Esta columna se opera a 80° C en un baño termoregulado.

Para la realización de las determinaciones primero se inyectaron estándares con concentraciones crecientes de cada carbohidrato y de gluconato de sodio, se trabajó con concentraciones de 0, 0.125, 0.25, 0.5 y 1.0%. Posteriormente se hicieron curvas patrón para relacionar las concentraciones con

las alturas de los picos obtenidos en el cromatograma.

Las muestras se diluyeron antes de inyectar al cromatógrafo, ya que se encontraban muy concentradas. Generalmente bastó con hacer diluciones 1:25.

En la figura 10 se muestra un ejemplo de un diagrama de elución en el que se observan los tiempos de retención en la columna característicos de cada sustancia. Así, los compuestos aparecen en el siguiente orden: gluconato de sodio, glucosa y fructosa y por último sacarosa, en el caso de la columna Altex Ultrasphere - CDS.

En la figura 11 se muestra un diagrama de elución de la columna Altex μ -spherogel, donde se observa que el orden de elución es: sacarosa, glucosa y fructosa.

4.4. INMOVILIZACION DE CELULAS

Se llevó a cabo con las células obtenidas de una fermentación de 0.5 l, que se filtraron y se resuspendieron en 100 ml de una solución que contenía 1.5% de alginatos y 10% de SiO_2 . Esta solución fue extrudida en forma de pequeñas gotas dentro de otra con CaCl_2 (50 g l) que se encontraba en agitación constante. El complejo formado se dejó reposar en esa solución durante 1 hora, posteriormente se filtró y se guardaron las células inmovilizadas en buffer de fosfatos 0.1 M pH = 5.6.

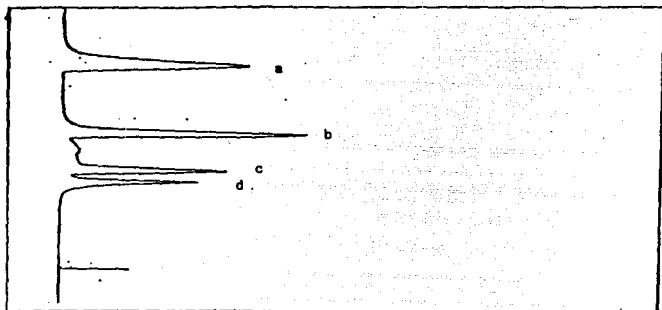


Fig. 10. Diagrama de elución utilizando la columna Altex
Ultrasphere-ODS.

- a. Dímero (desconocido).
- b. Sacarosa.
- c. Fructosa + glucosa (no resueltas).
- d. Gluconato de sodio.

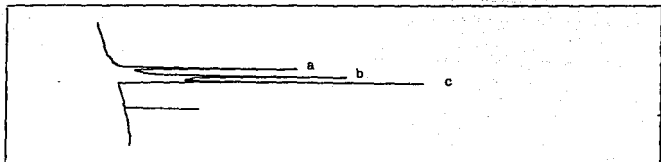


Fig. 11. Diagrama de elución utilizando la columna Altex

μ -spherogel.

- a. Fructosa.
- b. Glucosa.
- c. Sacarosa.

4.5. MEDICION DE ACTIVIDAD DE GLUCOSA OXIDASA

Reactivos necesarios: Glucosa 1.6 M, buffer de fosfatos 0.1 M pH = 5.6 y oxígeno.

Las mediciones de oxígeno disuelto se realizaron con un electrodo de oxígeno conectado a un medidor New Brunswick.

Procedimiento. Se coloca en un vaso de precipitados de 30 ml un volumen de 14.4 ml de buffer de fosfatos 0.1 M, en donde se resuspende previamente una cantidad conocida de micelio seco. La mezcla de reacción se mantiene en todo momento con agitación baja, para evitar que se formen burbujas que puedan interferir. Se burbujea O_2 por 10 minutos y se ajusta la lectura del registrados a 100% de oxígeno disuelto, entonces se suspende el burbujeo y se dejan transcurrir por lo menos 5 min, con la finalidad de observar que la lectura sea estable.

Una vez comprobado que no existe alguna interferencia en la medición, se agregan 1.6 ml de la solución de glucosa 1.6 M, de tal forma que la concentración final de ésta sea 0.16 M. En ese momento, se advierte una disminución del O_2 disuelto, el cual se va registrando automáticamente en la carta del medidor, cuya velocidad es de 1 pulgada por hora (0.4233 mm por minuto). Se deja transcurrir la reacción hasta tener de 30 a 40% de O_2 disuelto.

Para medir la actividad de extracto de enzima, se sigue el mismo procedimiento, utilizando volúmenes pequeños de extracto, debido a la alta concentración de la enzima. Se utilizaron 0.1 y

0.2 ml, medidos con pipeta automática. En estos casos, se reduce el volumen de buffer para que queden 16 ml de volumen final.

El graficador del medidor traza una línea recta en la zona de velocidad inicial cuya pendiente proporciona la variación del porcentaje de oxígeno disuelto por milímetro de carta, que se correlaciona con el tiempo transcurrido, conociendo la velocidad de la carta.

Para relacionar el porcentaje de O_2 disuelto con una concentración en g/l, se toma en cuenta que una solución saturada con oxígeno (100% de oxígeno disuelto), corresponde a una concentración de 7 mg de O_2 por litro, a 25 °C, de acuerdo con la ley de Henry.

Definición de unidad de glucosa oxidasa. Una unidad de actividad de glucosa oxidasa es la cantidad de enzima que transforma 1 μ l de O_2 por hora a temperatura de 20 °C y presión de 586 mm Hg, con una concentración de D-glucosa de 0.16 M en buffer de fosofatos 0.1 M, pH = 5.6, en presencia de exceso de O_2 y catalasa.

Cuando hay presencia de catalasa, el peróxido de hidrógeno producido por la reacción enzimática de la glucosa oxidasa, se descompone en una mol de agua y una mol de oxígeno; este oxígeno extra producido, hace que la relación entre glucosa y oxígeno consumidos sea una mol de oxígeno por dos de glucosa, por lo que la actividad obtenida debe duplicarse, cuando la actividad se mide por la disminución de oxígeno disuelto.

Tomando en cuenta las consideraciones anteriores se hacen los siguientes cálculos para obtener los valores de actividad enzimática:

$$\frac{\Delta\%}{\text{mm}} \times \frac{0.423\text{mm}}{\text{min}} \times \frac{100 \Delta\text{mg}}{7\Delta\% \text{ l}} \times \frac{1\text{mmol}}{32 \text{ mg}} \times \frac{10^3 \mu\text{mol}}{1 \text{ mmol}} \times \frac{22.4\mu\text{l}}{\mu\text{mol}} \times \frac{60\text{min}}{1 \text{ h}} \times 0.016 \text{ l} \times 2$$

A B C D E F G H I

Donde:

El término A es la pendiente de la gráfica = $\Delta\% \text{ O}_2$ consumido/mm,

B es la velocidad de la carta,

C es el factor de conversión de % de O_2 a mg/l de O_2 disuelto,

D representa el peso molecular del oxígeno,

E y G son factores de conversión,

F es el volúmen molar de los gases a TPS,

H el volumen de reacción e

I el factor de corrección por la presencia de catalasa en la reacción.

$$\text{Así, } 1 \text{ U} = \frac{1 \mu\text{l O}_2}{\text{h}}.$$

4.6. MEDICION DE ACTIVIDAD DE INVERTASA

Reactivos necesarios: Solución de sacarosa al 10% en buffer de acetatos 0.05 M pH = 5.4; y ácido dinitrosalisílico preparado como reactivo para medir azúcares reductores.

Procedimiento. Se utilizó el método de Sumner y Howell³⁰.

El espectrofotómetro utilizado fue Shimadzu UV-120-02.

Definición de unidad internacional de invertasa. Una unidad de actividad de invertasa es la cantidad de enzima que transforma 1 μmol de sacarosa por minuto, a temperatura de 30 °C y presión de 586 mm Hg en buffer de acetatos 0.05 M y pH = 5.4.

Los cálculos utilizados para determinar el valor de la actividad de invertasa, fueron los siguientes:

$$\frac{\Delta A}{\text{min}} \times \frac{1 \frac{\text{mg red}}{\text{ml}}}{0.51 \Delta A} \times \frac{342 \text{mg sac}}{360 \text{mg red}} \times \frac{1 \text{ mmol}}{342 \text{mg sac}} \times \frac{10^3 \mu\text{mol}}{\text{mmol}} \times 10 \text{ ml}$$

A B C D E F

Donde:

A representa el aumento de absorbancia de la reacción enzimática por minuto (pendiente de la gráfica de absorbancia contra tiempo en minutos).

B es la pendiente de la curva patrón de absorbancia contra concentración de reductores (glucosa y fructosa) en mg/ml.

C es el factor que relaciona el peso molecular de la sacarosa con el de sus productos de hidrólisis: glucosa + fructosa.

D es el peso molecular de la sacarosa.

E es un factor de conversión y

F es el volumen de reacción.

$$\text{Así, } 1 \text{ U} = \frac{1 \mu\text{mol sacarosa}}{\text{min}}$$

4.7. MEDICION DE ACTIVIDAD DE CATALASA

Reactivos necesarios: Peróxido de hidrógeno 0.1 M y buffer de acetatos 0.05 M pH = 5.4.

Procedimiento. Se utiliza el electrodo de oxígeno disuelto y el mismo equipo que se usó para la medición de la actividad de la glucosa oxidasa.

A un volumen de 13.5 ml de buffer de acetatos, en donde se resuspendió previamente un peso conocido de células secas, se le agregan 0.5 ml del peróxido de hidrógeno. La mezcla de reacción se mantiene con una agitación baja. En el momento de agregar el sustrato se observa un aumento de oxígeno disuelto que se registra en una gráfica, cuya pendiente en la zona inicial equivale al aumento de oxígeno disuelto por milímetro de carta, es decir a la velocidad inicial de reacción.

En el caso de la medición de la actividad en el extracto enzimático, se disminuye el volumen de buffer de acetatos, de tal forma que el volumen final sea de 14 ml.

Definición de unidad internacional de catalasa. Una unidad de actividad de catalasa es la cantidad de enzima que transforma un μmol de peróxido de hidrógeno por minuto, a temperatura de 20 °C y presión de 586 mm Hg en buffer de acetatos 0.05 M y pH = 5.4.

Los cálculos realizados para determinar el valor de la actividad de catalasa, fueron los siguientes:

$$\frac{\Delta \% \text{O}_2}{\text{mm}} \times \frac{0.423 \text{ mm}}{\text{min}} \times \frac{100 \Delta \text{mgO}_2}{7 \Delta \% \text{O}_2 \text{ l}} \times \frac{1 \text{ mmol O}_2}{32 \text{ mg O}_2} \times \frac{10^3 \mu\text{mol O}_2}{1 \text{ mmol O}_2} \times \frac{2 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2}{\mu\text{mol O}_2} \times 0.014 \text{ l}$$

A B C D E F G

Donde:

El término λ es la pendiente de la gráfica = $\Delta\%$ O₂ producido/mm

B es la velocidad de la carta,

C es el factor de conversión de % de O₂ a mg/l de O₂ disuelto,

D representa el peso molecular del oxígeno,

E es un factor de conversión,

F relación de las μ moles de oxígeno producidas por cada μ mol de peróxido de hidrógeno y

G es el volumen de reacción.

$$\text{Así, } 1 \text{ U} = \frac{1 \mu\text{l H}_2\text{O}_2}{\text{min}}$$

4.8. EXTRACCION DE LAS ENZIMAS

La extracción de las enzimas intracelulares de la cepa AN166 de *A. niger* se hizo a partir de la biomasa fresca obtenida de una fermentación de 4 l, que tuvo sacarosa como fuente de carbono.

Se muele en mortero una cantidad de micelio de peso húmedo conocido con arena de mar grado reactivo, Merck. La cantidad de arena agregada es igual a la del peso húmedo del micelio. La molienda se hace en forma continua durante 25 min.

Posteriormente se agregan 400 ml de buffer de fosfatos 0.1M, pH = 5.6 para extraer las enzimas. Se agregó 15% de glicerol a 200 ml del extracto de enzimas. Ambas muestras se guardaron en refrigeración (4 °C).

4.9. RECUPERACION Y PURIFICACION DE GLUCONATO DE SODIO

Una vez terminado el proceso fermentativo, se separa la biomasa por filtración del caldo de fermentación. El filtrado se concentra por evaporación al vacío hasta una densidad aproximada de 1.43 g/ml. El concentrado se diluye aproximadamente a la mitad con etanol. La mezcla se deja agitando en frío por 6 horas, hasta que se formen los cristales de gluconato de sodio, los cuales se filtran al vacío y se lavan con etanol. Las aguas de lavado se agregan a las aguas madres.

Posteriormente se recrystaliza el gluconato con etanol, para purificar el producto.

4.10. PURIFICACION DE FRUCTOSA

A las aguas madres se les elimina el etanol por destilación al vacío. El líquido obtenido se diluye al doble con agua destilada y desionizada y se le mide la conductividad.

El líquido obtenido se trata con una resina intercambiadora de cationes. La resina aniónica que se usó fue amberlita IR - 120 plus. Posteriormente el líquido se trata con una resina intercambiadora de aniones. Se usó amberlita IRA - 93. Se mide la conductividad final. El ciclo de purificación por ambas resinas se repite hasta obtener una conductividad final menor de 132 μ siemens/cm. Esta operación es crítica para la obtención de un jarabe de fructosa altamente puro.

Finalmente la solución se concentra al vacío hasta una densidad de 1.4 g/ml aproximadamente.

V RESULTADOS Y DISCUSION

5.1. FERMENTACIONES EN MATRAZ

Se probó el comportamiento del inóculo, dependiendo si las esporas se obtenían con glicerol - tween 80 o con glicerol - solución salina, ya que se tenían dudas del efecto que pudiera tener el agente tensoactivo.

Se siguió el transcurso de la fermentación midiendo el pH, debido a que se consideró como parámetro representativo del comportamiento en matraces. Desde este experimento resultó evidente que la medición de biomasa constituía un problema, debido a que los muestreos son poco representativos en el caso de que se utilicen hongos filamentosos, ya que como se forman pellets, la biomasa no está distribuida uniformemente en el medio de cultivo. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 4.

Como se puede apreciar, el comportamiento es muy similar entre los dos inóculos. No se presentan diferencias significativas. Es importante señalar que al pasar aproximadamente 24 horas la fermentación se detiene. Este efecto se debe principalmente al descenso del pH, lo que ocasiona una inhibición del crecimiento del microorganismo, así como la inhibición de la actividad enzimática. Por esta razón es importante que el tiempo de fermentación al elaborar el inóculo

no exceda de 24 horas.

TABLA 4. CRECIMIENTO COMPARATIVO DE ESPORAS DE *A. niger*

TIEMPO (h)	pH	
	Glicerol-tween 80	Glicerol-sol.salina
0	6.03	5.92
2	6.01	5.91
4	5.96	5.88
6	5.94	5.88
9	5.84	5.77
20	3.74	3.57
22	3.62	3.52
24	3.52	3.47
26	3.51	3.46
28	3.51	3.46

Debido a la formación tan acelerada de ácido, se consideró que para efectos del estudio de la producción de ácido glucónico resultaba imperioso seguir el transcurso de una fermentación regulando el pH. Los reportes bibliográficos señalan que la fermentación dura aproximadamente 30 horas, de tal forma que no tenía caso hacerlo en matraces, si se presentaba inhibición a las 24 horas, deteniendo la fermentación. Además la caída constante de pH a lo largo de la fermentación disminuye tanto la velocidad de crecimiento como la velocidad de producción de gluconato.

5.2. EXPERIMENTOS EN FERMENTADOR DE 0.5 l

5.2.1. Glucosa como fuente de carbono

En la tabla 5 y la figura 12 se presentan los resultados de una fermentación donde se empleó la cepa 4201 en el medio A. Dicha fermentación se efectuó en un fermentador de 0.5 l con 550 rpm, 1 vvm, a 30°C y con regulación de pH. En la figura 13 se presentan diagramas de elución de algunas muestras tomadas en diferentes etapas de la fermentación.

TABLA 5. RESULTADOS DE LA FERMENTACION DE 0.5 L CON LA CEPAS 4201, UTILIZANDO GLUCOSA COMO FUENTE DE CARBONO.

TIEMPO (h)	[GLUCOSA] (g/l)	[GLUCONATO] (g/l)	GLUCOSA OXIDASA (U/mg cél.)
1	257.4	5.1	75.6
27	238.6	12.9	164.9
47	123.1	87.4	185.5
55	49.5	119.4	237.1
69	4.8	225.3	295.9

De este experimento se desprenden los siguientes resultados:

La fermentación duró 69 horas, la cantidad de gluconato producida fue 225.3 g/l, la cantidad de sustrato consumida fue de 252.6 g/l, y se obtuvieron 15.3965 g/l de biomasa al final de la fermentación.

Si definimos:

Pr = productividad.

$$Y_{P/S} = \text{rendimiento producto-sustrato} = \frac{\Delta P}{\Delta S} .$$

Cepa 4201 0.5 l.

Sustrato: glucoso.

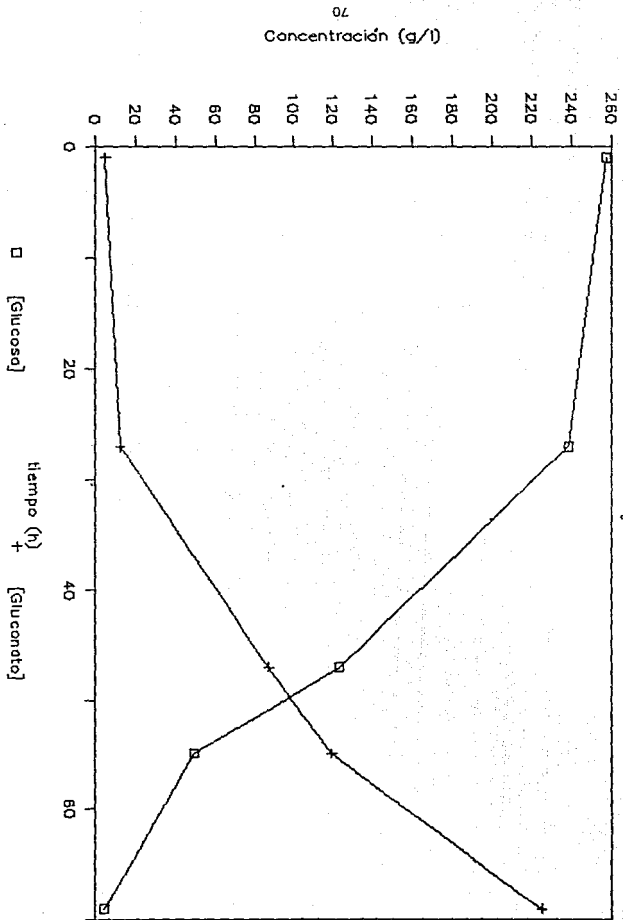


FIGURA 12.

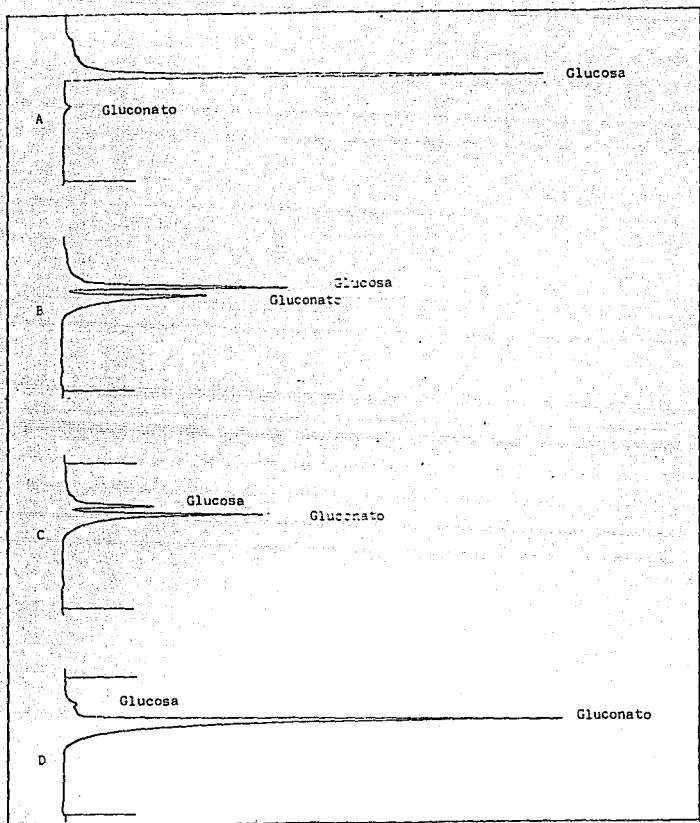


Fig. 13. Fermentación de 0.5 l con la cepa 4201. Utilizando como sustrato glucosa. Diagramas de elución de muestras tomadas a:

A. t = 1 h	dil. 1.45:10
B. t = 47 h	dil. 1.45:10
C. t = 55 h	dil. 1.45:10
D. t = 69 h	dil. 1.75:10

$$Y_{x/s} = \text{rendimiento de biomasa-sustrato} = \frac{\Delta X}{\Delta S} .$$

$$Y_{p/x} = \text{rendimiento producto-biomasa} = \frac{\Delta P}{\Delta X} .$$

Entonces en el proceso se obtuvieron los siguientes resultados:

$$Pr = \frac{\Delta P}{t} = 3.2652 \frac{\text{g gluconato}}{1 \text{ h}}$$

$$Y_{p/s} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = 0.8919 \frac{\text{g gluconato}}{\text{g glucosa}}$$

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta x}{\Delta S} = 0.0610 \frac{\text{g cél.}}{\text{g glucosa}}$$

$$Y_{p/x} = \frac{\Delta P}{\Delta X} = 14.6332 \frac{\text{g gluconato}}{\text{g cél.}}$$

Por otra parte, se realizó el mismo experimento en condiciones similares que la anterior, pero ahora con la cepa AN166. En la tabla 6 y la figura 14 se muestran estos resultados.

TABLA 6. RESULTADOS DE LA FERMENTACION DE 0.5 L CON LA CEPA AN166 UTILIZANDO GLUCOSA COMO FUENTE DE CARBONO.

TIEMPO (h)	[GLUCOSA] (g/l)	[GLUCONATO] (g/l)	GLUCOSA OXIDASA (U/mg cél.)
1	273.1	1.6	195.4
24	219.1	43.4	198.9
40	124.7	109.2	225.9
44	116.6	121.3	350.1
48	108.8	135.1	453.3
63	43.0	197.5	882.2
72	9.7	223.6	895.1

Cepa AN166 0.5 l.

Sustrato: glucosa.

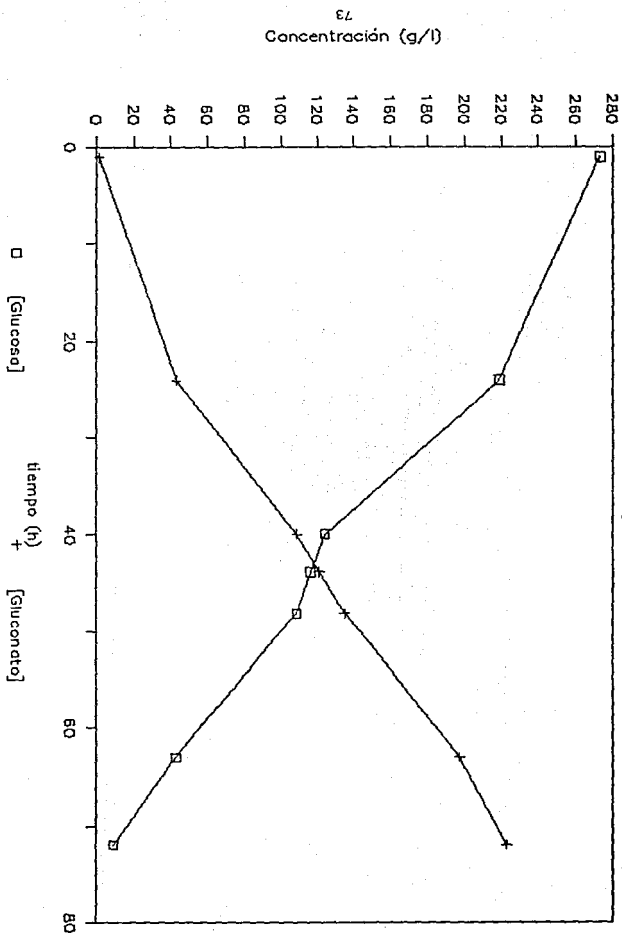


FIGURA 14.

En la figura 15 se presentan diagramas de elución de muestras tomadas en diferentes etapas de esta fermentación.

A partir de estos resultados se observa que la fermentación duró 72 horas, se consumieron 263.4 g/l de glucosa, se produjeron 223.6 g/l de gluconato y otro dato es que se obtuvieron 8.5454 g/l de biomasa final.

Por lo que se tienen los siguientes rendimientos:

$$Pr = \frac{\Delta P}{t} = 3.1055 \frac{\text{g gluconato}}{\text{l h}}$$

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = 0.8489 \frac{\text{g gluconato}}{\text{g glucosa}}$$

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta x}{\Delta S} = 0.0324 \frac{\text{g cél.}}{\text{g glucosa}}$$

$$Y_{P/x} = \frac{\Delta P}{\Delta x} = 26.1661 \frac{\text{g gluconato}}{\text{g cél.}}$$

De estos resultados es evidente que la duración de ambas fermentaciones fué mayor a la esperada. Si consideramos la producción de ácido y el consumo de glucosa como parámetros proporcionales al crecimiento microbiano, ésto se pudo deber a una fase muy larga de adaptación del microorganismo (fase lag). Incluso a las 24 horas no hubieron cambios importantes en el consumo de sustrato ni en la producción de gluconato.

Por otra parte se observa que la cepa AN166 tiene una actividad enzimática mucho mayor que la 4201, lo que constituyó un elemento importante en la selección de la mejor cepa para el

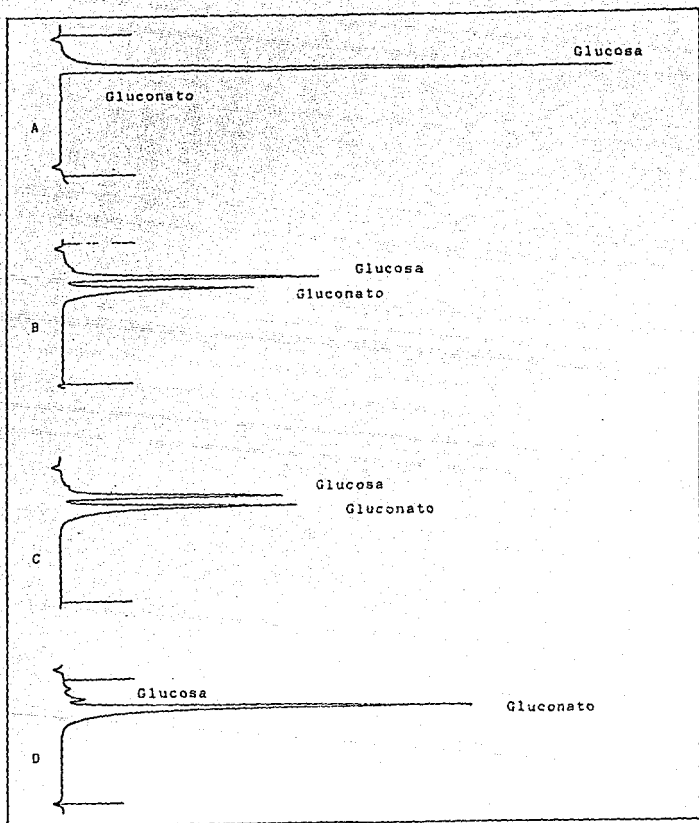


Fig. 15. Fermentación de 0.5 l con la cepa AN166. Utilizando como sustrato glucosa. Diagramas de elución de muestras tomadas a:

A. t = 1 h	dil. 0.3:10
B. t = 40 h	dil. 0.3:10
C. t = 48 h	dil. 0.3:10
D. t = 72 h	dil. 0.3:10

desarrollo del proceso. En la figura 16 se puede observar claramente la diferencia entre las actividades de ambos microorganismos: mientras que la cepa 4201 alcanzó una actividad máxima de 300 unidades aproximadamente, la cepa AN166 llegó casi a las 900 unidades.

Otros factores que fueron considerados para la comparación entre las dos cepas son: el rendimiento producto-sustrato, el de biomasa, el de producto-biomasa y la productividad. La tabla 7 resume los resultados de estos factores para las dos cepas.

TABLA 7. RENDIMIENTOS COMPARATIVOS ENTRA LAS CEPAS 4201 Y AN166 DE FERMENTACIONES DE 0.5 L UTILIZANDO COMO FUENTE DE CARBONO GLUCOSA.

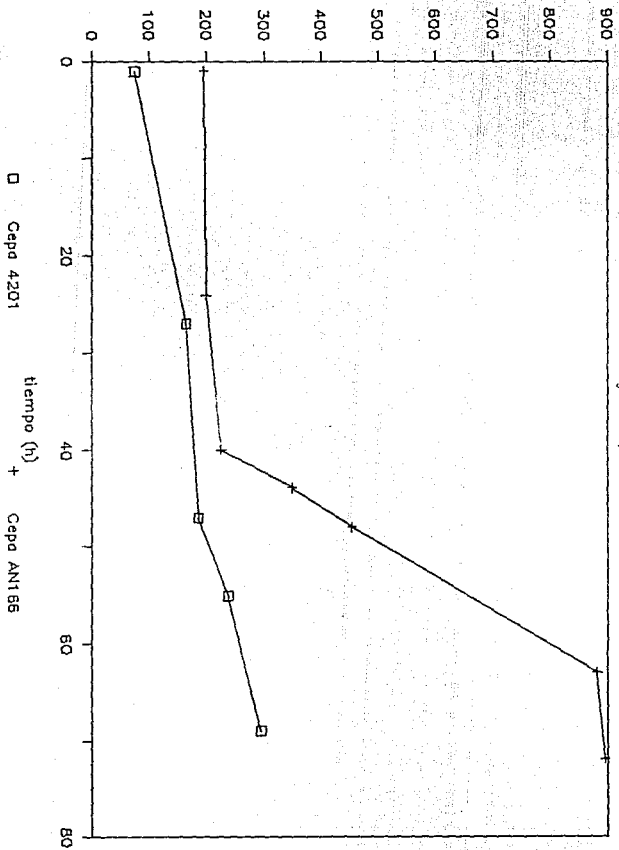
PARAMETRO	C E P A	
	4201	AN166
Pr (g gluconato/l h)	3.2652	3.1055
$Y_{P/S}$ (g gluconato/g glucosa)	0.8919	0.8489
$Y_{X/S}$ (g cél./g glucosa)	0.0610	0.0324
$Y_{P/X}$ (g gluconato/ g _{cél})	14.6332	26.1661
Actividad máx. (U/mg cél.)	295.9	895.1
C final gluconato (g/l)	225.3	223.6

De los datos anteriores se puede colegir que es de esperar que la cepa AN166, al tener una mayor actividad enzimática, tenga mejores resultados en lo que se refiere a rendimiento de producto-biomasa.

Actividad (U/mg cél)

Actividad comparada

Sustrato: glucosa, V = 0.5 l.



□ Cepa 4201

tiempo (h)

+ Cepa AN185

FIGURA 16.

En lo que respecta al rendimiento de biomasa, el hecho de que la cepa AN166 presente valores bajos significa que en el medio habrá una cantidad limitada de sustrato destinado a la síntesis de biomasa y al haber una concentración baja de biomasa se reduce la demanda de oxígeno en el medio y se hace más eficiente el proceso.

Los valores de productividad resultaron muy semejantes debido a que ambas fermentaciones duraron casi el mismo tiempo y a que produjeron cantidades similares de gluconato.

La diferencia en el rendimiento en producto $Y_{P/S}$ no es significativa.

De los resultados anteriores, se puede concluir que las cepas presentan un comportamiento muy similar. Sin embargo la cepa AN166 al presentar una mayor actividad enzimática resulta ser la más apropiada para el proceso.

5.2.2. Sacarosa como fuente de carbono

Un aspecto importante a tomar en cuenta es el costo de la materia prima. En efecto, la glucosa en México es sustancialmente más cara que la sacarosa. Sin embargo hasta la fecha los procesos industriales de producción de ácido glucónico emplean glucosa como sustrato. La cepa AN166, de acuerdo con los investigadores del Instituto de Microbiología de Praga, tiene la capacidad de producir ácido glucónico a partir de sacarosa.

Otra opción fue utilizar jarabe de glucosa, pero ésta presenta desventajas por su dificultad de manejo dadas sus

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

características reológicas. Además de la ventaja económica al emplear sacarosa como fuente de carbono, se tiene la posibilidad de obtener como subproducto fructosa, azúcar de alto interés comercial.

Por las consideraciones anteriores se decidió probar sacarosa como fuente de carbono. Se corroboró que el microorganismo utilizado (*A. niger*), es una fuente muy rica de enzimas incluida la invertasa, por lo que no hubo necesidad de dar un tratamiento químico hidrolítico, o con enzimas comerciales, a la sacarosa antes de realizar la fermentación.

Se efectuó una fermentación de 0.5 l utilizando como sustrato sacarosa, con el fin de demostrar la eficiencia en la fermentación, antes de poder pasar a un fermentador de mayor escala. Los resultados de la fermentación se presentan en la tabla 8 y figura 17. Las condiciones de operación fueron las mismas que las utilizadas anteriormente.

En la figura 18 se presentan diagramas de elución de muestras tomadas en diferentes etapas de esta fermentación.

A partir de estos resultados se observa lo siguiente: a) la fermentación duró 74 horas, b) se consumieron 326.0 g/l de sacarosa, c) se produjeron 233.0 g/l de gluconato y d) se obtuvieron 5.9670g/l de biomasa final.

Cepa AN166 0.5 I.

Sustrato: sacarosa.

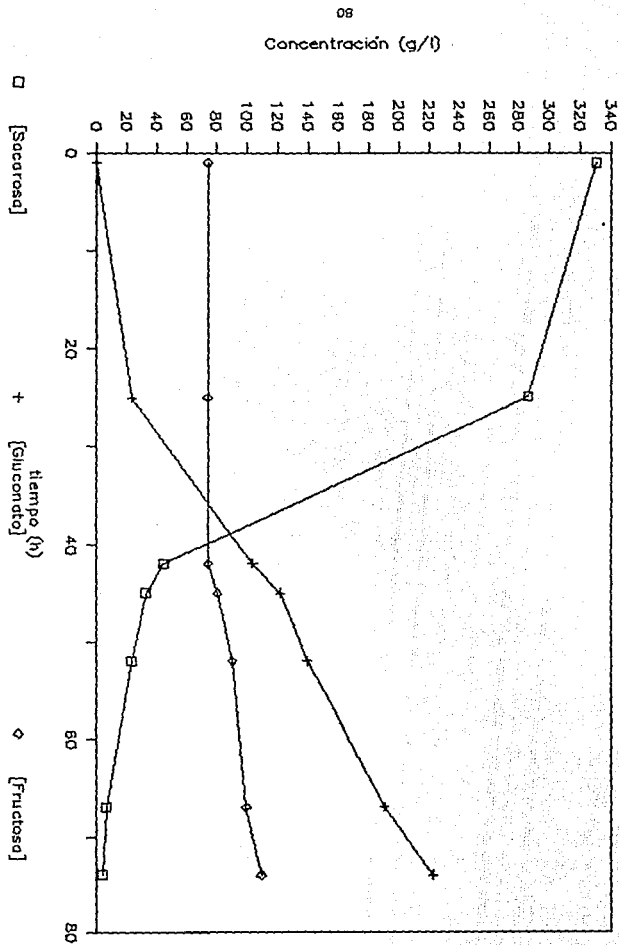


FIGURA 17.

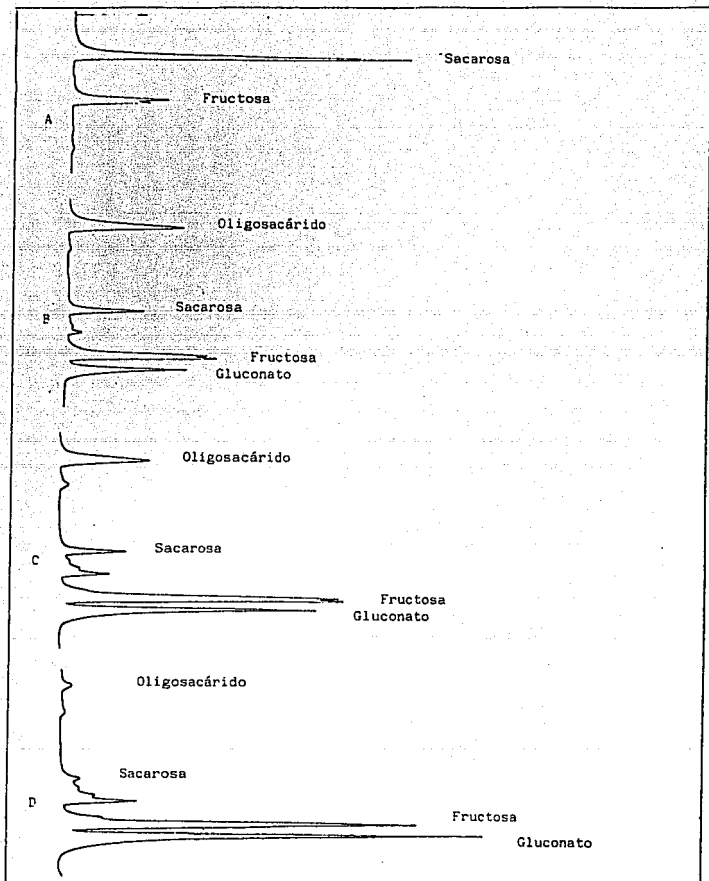


Fig. 18. Fermentación de 0.5 l con la cepa AN166. Utilizando como sustrato sacarosa. Diagramas de elución de muestras tomadas a:

A. $t = 1$ h dil. 0.2:10 C. $t = 42$ h dil. 0.3:10
 B. $t = 48$ h dil. 0.5:10 D. $t = 74$ h dil. 0.5:10

TABLA 8. RESULTADOS DE LA FERMENTACION DE 0.5 L CON LA CEPA AN166 UTILIZANDO SACAROSA COMO FUENTE DE CARBONO.

TIEMPO (h)	[SACAROSA] (g/l)	[GLUCONATO] (g/l)	[FRUCTOSA] (g/l)	GLUCOSA OXIDASA (U/mg cél.)
1	330.4	0.5	74.3	n.d
25	285.7	24.1	74.3	112.3
42	45.3	103.8	74.7	143.7
45	33.3	121.7	80.7	191.5
52	23.4	139.1	90.3	202.8
67	7.1	190.9	99.3	255.2
74	4.4	223.0	109.3	163.8

n.d.- no se dispuso de biomasa suficiente para la medición.

Presentando los siguientes rendimientos:

$$Pr = \frac{\Delta P}{t} = 3.1486 \frac{\text{g gluconato}}{\text{l h}}$$

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = 0.7147 \frac{\text{g gluconato}}{\text{g glucosa}}$$

$$Y_{x/S} = \frac{\Delta x}{\Delta S} = 0.0183 \frac{\text{g cél.}}{\text{g glucosa}}$$

$$Y_{P/x} = \frac{\Delta P}{\Delta x} = 39.0481 \frac{\text{g gluconato}}{\text{g cél.}}$$

Al igual que en el caso de la glucosa, la duración de la fermentación fue más del doble de lo esperado, probablemente por la causa planteada anteriormente.

Es importante hacer notar que la actividad enzimática

intracelular (glucosa oxidasa) disminuyó más del 50% con respecto a la obtenida al utilizar glucosa como fuente de carbono. Aún así, se obtuvieron mayores rendimientos que en la fermentación con glucosa.

Por otra parte, también se observa que la actividad tiene un máximo aproximadamente a las 65 horas, previo a una disminución del 35%. Esto se puede deber a que por efecto de lisis celular se liberen proteasas que ataquen a la enzima, o a que la enzima presente baja estabilidad.

En la tabla 9 se presentan los resultados de los rendimientos de las fermentaciones con la cepa AN166, con las diferentes fuentes de carbono.

TABLA 9. RENDIMIENTOS COMPARATIVOS ENTRE LAS DIFERENTES FUENTES DE CARBONO UTILIZANDO LA CEPA AN166.

PARAMETRO	SUSTRATO	
	Glucosa	Sacarosa
Pr (g gluconato/l h)	3.1055	3.1486
$Y_{P/S}$ (g gluconato/g sustrato)	0.8489	0.7147
$Y_{X/S}$ (g cél./g sustrato)	0.0324	0.0183
$Y_{P/X}$ (g gluconato/l $g_{cél}$)	26.1661	39.0481
Actividad máx. (U/mg cél.)	895.1	255.0
C final gluconato (g/l)	223.6	223.0

Se observa que la productividad es muy semejante ya que ambas fermentaciones duraron casi el mismo tiempo y en este tiempo se produjo una cantidad muy semejante de gluconato.

En la fermentación con sacarosa se produjo muy poca biomasa en comparación con la obtenida en la fermentación con glucosa, por esta razón el rendimiento de producto-biomasa resultó mayor con sacarosa que con glucosa. El rendimiento producto-sustrato fue menor con sacarosa probablemente debido a que no toda la sacarosa consumida haya sido hidrolizada a glucosa, y por lo tanto no se haya convertido a gluconato.

Debido al éxito obtenido en la producción de gluconato de sodio en el fermentador de 0.5 l utilizando como fuente de carbono sacarosa, se procedió a escalar en un fermentador de 5 l.

5.3. EXPERIMENTOS EN FERMENTADOR DE 5 l

Una de las metas principales de estas fermentaciones fue la de reducir el tiempo de fermentación, así como probar el comportamiento a una mayor escala. Específicamente en relación con la demanda de oxígeno.

Los resultados se presentan en la tabla 10 y en la figura 19. Las condiciones iniciales empleadas fueron: agitación de 800 rpm y 1 vvm de aireación, temperatura de 30°C y control automático de pH a 6.0.

En la figura 20 se presentan diagramas de elución de muestras tomadas en diferentes etapas de esta fermentación.

Cepa AN166 41

1 vvm, 800 rpm

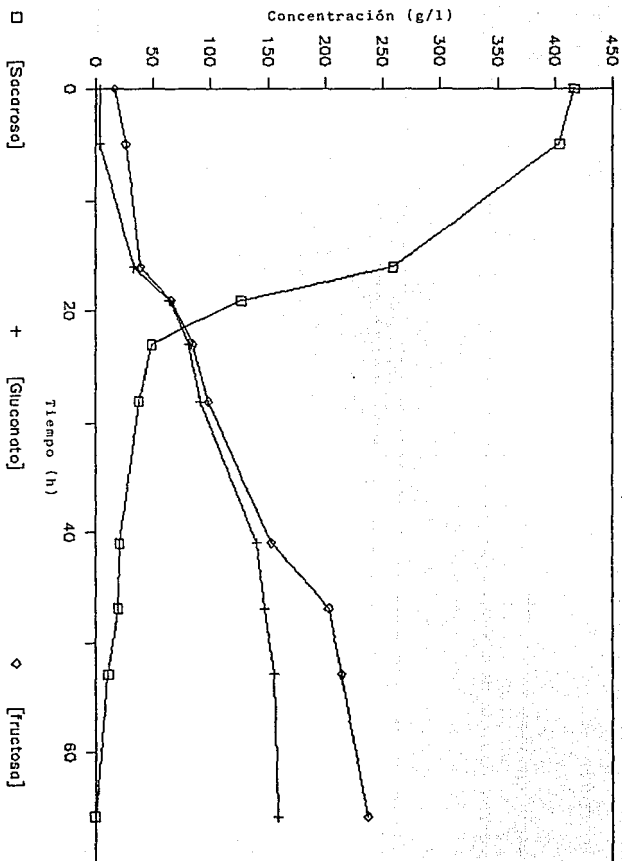


FIGURA 19.

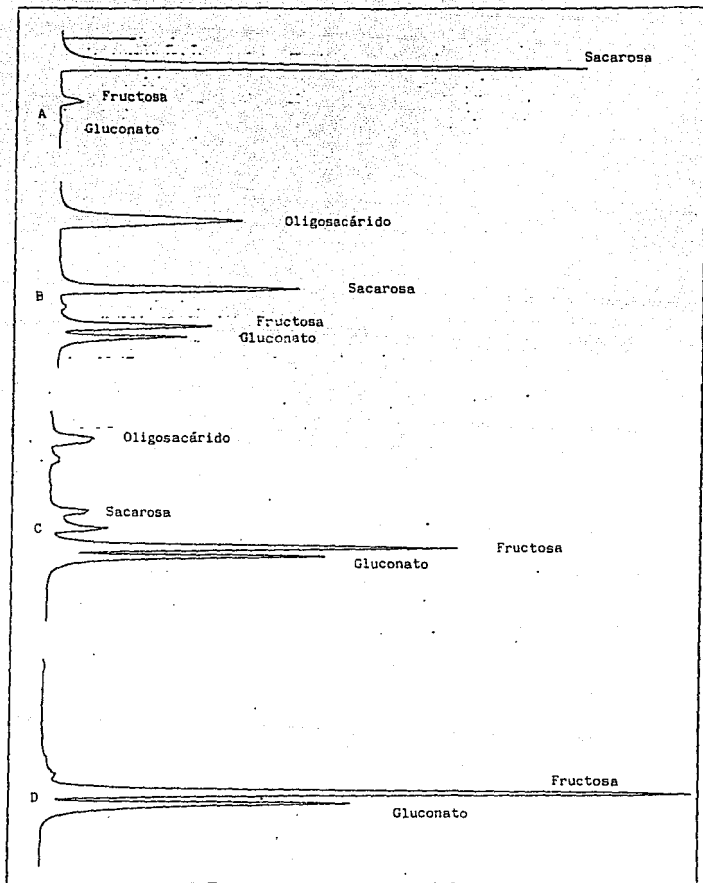


Fig. 20. Fermentación de 4 l con la cepa AN16G. Utilizando:
 Aereación = 800 rpm aireación = 1 vvm
 A. t = 0 h dil. 0.2:10 C. t = 48 h dil. 0.5:10
 B. t = 42 h dil. 0.3:10 D. t = 74 h dil. 0.5:10

TABLA 10. RESULTADOS DE LA FERMENTACION DE 5 L CON LA CEPA
 AN166 UTILIZANDO SACAROSA COMO FUENTE DE CARBONO.
 CONDICIONES: 1VVM Y 800 RPM.

TIEMPO (h)	[SACAROSA] (g/l)	[GLUCONATO] (g/l)	[FRUCTOSA] (g/l)	GLUCOSA OXIDASA (U/mg cél.)
0	416.9	4.1	16.8	n.d.
5	404.3	4.1	26.6	n.d.
16	259.5	33.9	39.7	211.8
19	127.2	64.8	66.3	276.5
23	49.1	81.2	84.9	303.5
28	38.5	91.9	98.5	416.2
41	21.2	140.0	153.1	337.1
47	20.3	147.2	203.6	266.2
53	11.2	155.4	214.3	249.6
66	0.0	158.5	237.1	231.4

n.d. - no se dispuso de biomasa suficiente para la medición.

Se obtuvieron 4.2244 g/l de biomasa final. El consumo de sacarosa fue de 416.9 g/l para obtener 158.5 g/l de gluconato de sodio.

Con base en los datos anteriores se calculan los siguientes rendimientos:

$$Pr = \frac{\Delta P}{t} = 2.4015 \frac{\text{g gluconato}}{\text{l h}}$$

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = 0.3802 \frac{\text{g gluconato}}{\text{g glucosa}}$$

$$Y_{x/S} = \frac{\Delta x}{\Delta S} = 0.0101 \frac{\text{g cél.}}{\text{g glucosa}}$$

$$Y_{P/x} = \frac{\Delta P}{\Delta x} = 37.5200 \frac{\text{g gluconato}}{\text{g cel.}}$$

Esta fermentación resultó muy interesante debido a que aproximadamente a las 40 horas se detiene la producción de gluconato, mientras que la hidrólisis de sacarosa se mantiene. Esto indica que la invertasa sigue actuando, pero la glucosa oxidasa ya no lo hace como se esperaría. Al igual que en la fermentación anterior, se observa que la actividad de glucosa oxidasa es baja y que tiene un punto máximo.

Es probable que la causa de que la producción de gluconato se haya detenido se deba a que la disminución del oxígeno disuelto en el medio sea un factor limitante para el funcionamiento óptimo de la glucosa oxidasa.

Pensando en esta razón, se probó utilizando una mayor agitación y aireación con el fin de aumentar el valor de $k_L a$ y que el oxígeno no fuera limitante para la reacción.

En las mismas condiciones que la fermentación anterior, pero utilizando 1000 rpm y 1.2 vvm se obtuvieron los resultados que se presentan en la tabla 11 y figura 21.

Se presentan algunos diagramas de elución correspondientes a diferentes etapas de esta fermentación en la figura 22.

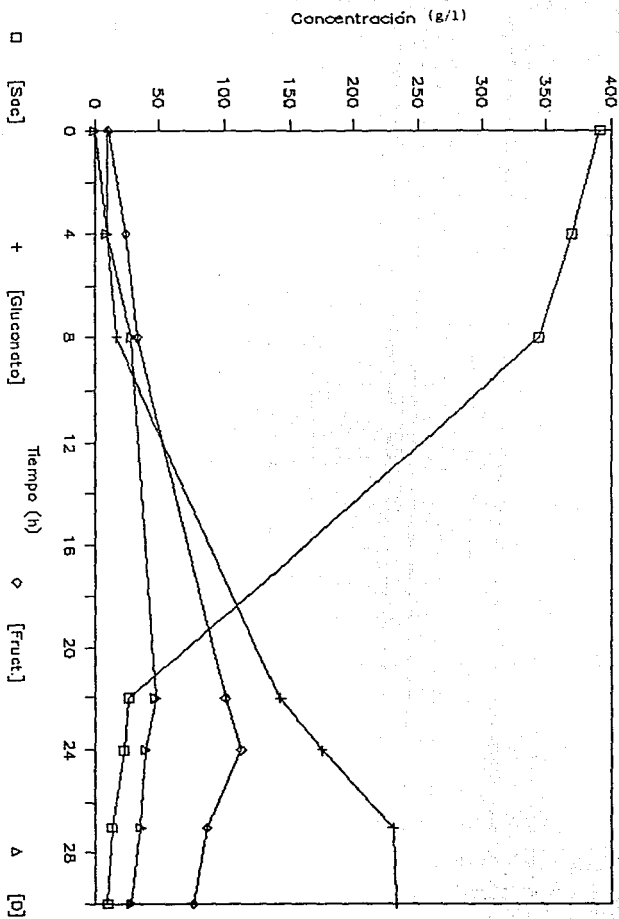


FIGURA 21.

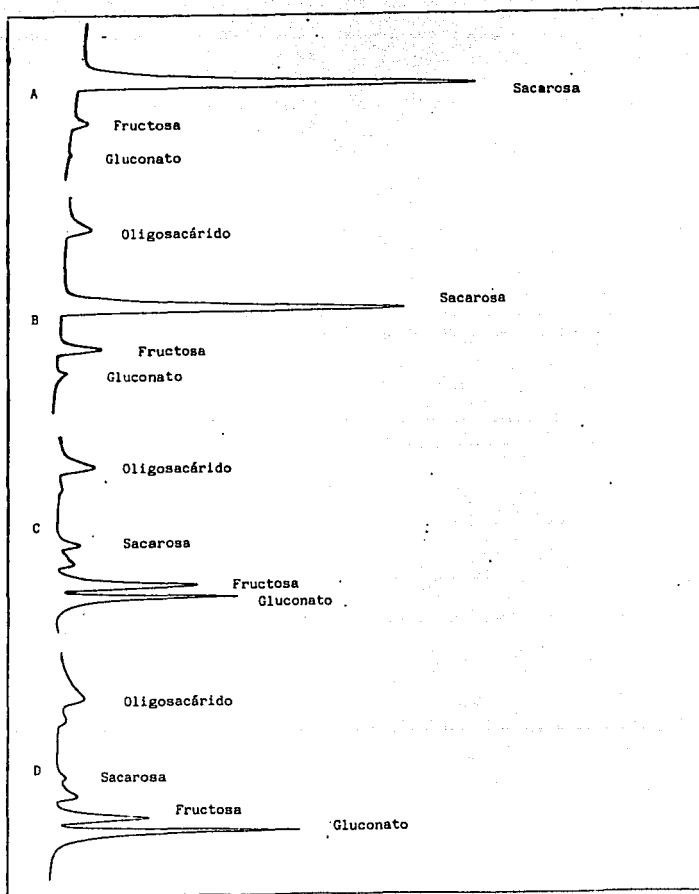


Fig. 22. Fermentación de 4 l con la cepa AN166. Utilizando:

Agitación = 1000 rpm

aireación = 1.2 vvm

A. t = 0 h dil. 0.4:10

C. t = 24 h dil. 0.4:10

B. t = 8 h dil. 0.4:10

D. t = 30 h dil. 0.4:10

TABLA 11. RESULTADOS DE LA FERMENTACION DE 5 L CON LA CEPA AN166 UTILIZANDO SACAROSA COMO FUENTE DE CARBONO.
CONDICIONES: 1.2 VVM Y 1000 RPM.

TIEMPO (h)	[SACAROSA] (g/l)	[GLUCONATO] (g/l)	[FRUCTOSA] (g/l)	GLUCOSA OXIDASA (U/mg cél.)
0	391.3	9.2	10.3	n.d.
4	369.8	9.2	24.1	n.d.
8	344.2	16.8	33.1	131
22	26.5	142.5	100.6	274
24	22.5	174.9	112.8	486
27	13.2	230.2	86.8	642
30	10.2	232.1	76.2	728

n.d.- no se dispuso de biomasa suficiente para la medición.

Se obtuvieron 4.5720 g/l de biomasa final. El consumo de sacarosa fue de 381.1 g/l para obtener 232.1 g/l de gluconato de sodio.

Tomando en cuenta los resultados anteriores se pudieron calcular los siguientes rendimientos:

$$Pr = \frac{\Delta P}{t} = 7.7366 \frac{\text{g gluconato}}{\text{l h}}$$

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = 0.6090 \frac{\text{g gluconato}}{\text{g glucosa}}$$

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta x}{\Delta S} = 0.0120 \frac{\text{g cél.}}{\text{g glucosa}}$$

$$Y_{P/X} = \frac{\Delta P}{\Delta x} = 50.7655 \frac{\text{g gluconato}}{\text{g cél.}}$$

Los resultados de esta fermentación son muy atractivos ya que se comprueba que, en efecto, el oxígeno puede ser el factor limitante. Además de que se logró disminuir la duración de la fermentación al reducir la fase lag de crecimiento del microorganismo, por el aumento en la agitación y aireación.

En esta fermentación se observa un aumento de la actividad de la glucosa oxidasa en comparación con la fermentación anterior, en la figura 23 se observa claramente la diferencia entre las actividades a las que se hace referencia.

Tal comportamiento puede deberse a que como el oxígeno ya no era un parámetro limitante no se inhibió la actividad enzimática. Aún así, el valor es menor que el obtenido cuando se utilizó como sustrato glucosa.

En la tabla 12 se comparan los rendimientos correspondientes a las diferentes condiciones de aireación y agitación.

Como puede observarse, todos los parámetros mejoraron sustancialmente. La productividad aumentó al disminuir la duración de la fermentación. Al aumentar la cantidad de gluconato obtenida, aumentaron tanto $Y_{P/S}$ como $Y_{P/X}$. El rendimiento de biomasa aumentó, probablemente debido a que al haber más oxígeno disuelto se favoreció también la reproducción del microorganismo.

En las figuras 24 y 25 se compara la producción de fructosa y gluconato en las diferentes condiciones de fermentación. Se pone de manifiesto la importancia de detener la fermentación al llegar al máximo de producción de ácido glucónico, ya que el microorganismo empieza a utilizar la fructosa como fuente de

Actividad (U/mg cél)

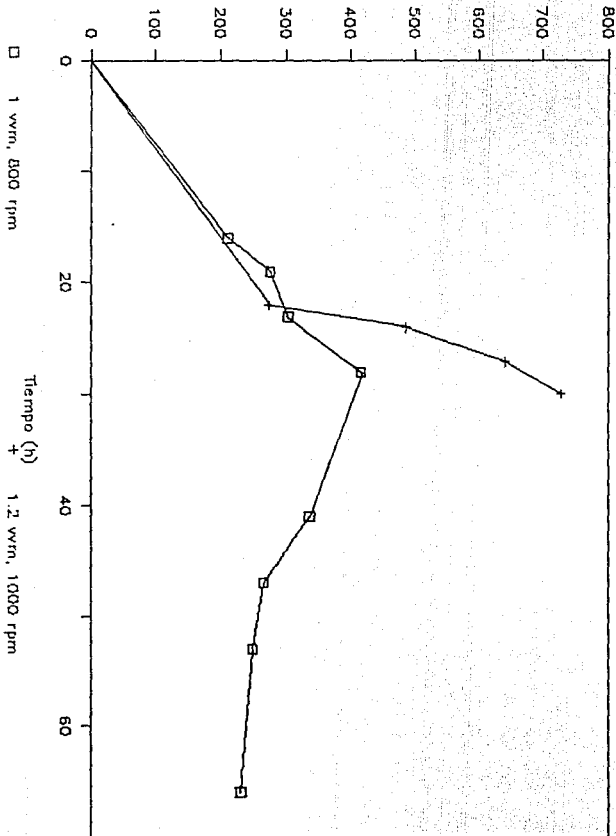


FIGURA 23.

Concentración (g/l)

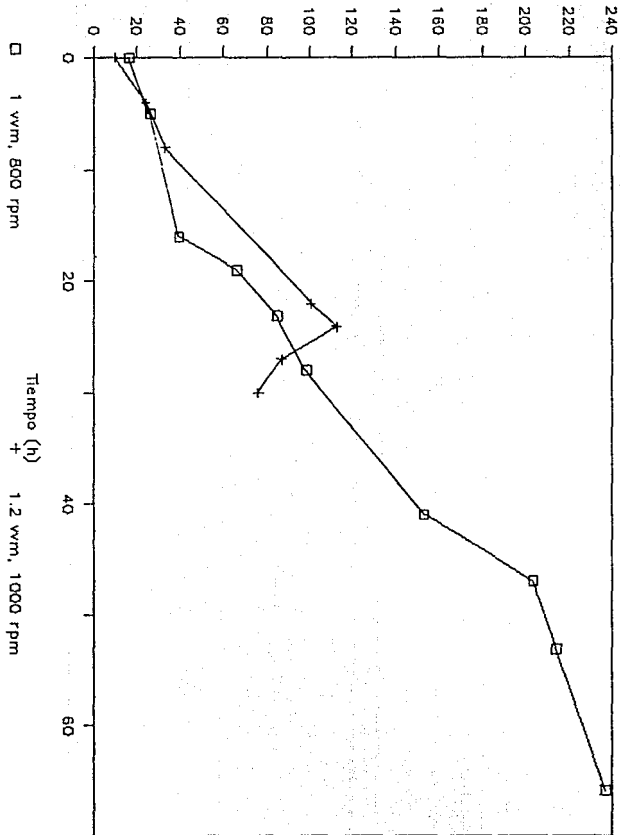


FIGURA 24.

Concentración (g/l)

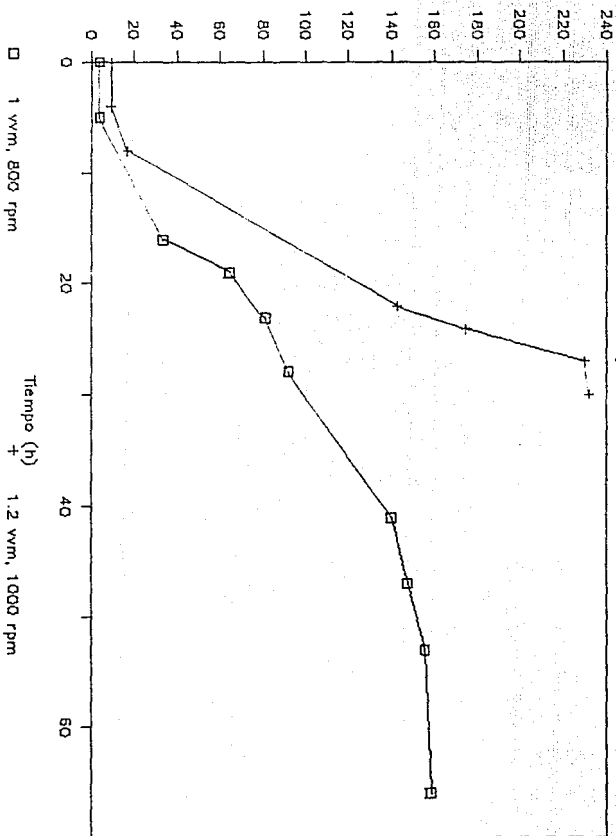


FIGURA 25.

carbono.

TABLA 12. RENDIMIENTOS DE LAS FERMENTACIONES DE 5 L CON LA CEPA AN166, UTILIZANDO COMO SUSTRATO SACAROSA.

PARAMETRO	CONDICIONES	
	1vvm, 800 rpm	1.2vvm, 1000rpm
Pr (g gluconato/l h)	2.4015	7.7366
$Y_{P/S}$ (g gluconato/g sustrato)	0.3802	0.6090
$Y_{X/S}$ (g cél./g sustrato)	0.0101	0.0120
$Y_{P/X}$ (g gluconato/l g _{cél})	37.52	50.7655
Actividad máx. (U/mg cél)	337.0	728.0
C final de gluconato (g/l)	158.5	232.1

Con base en los resultados anteriores, se infiere que las condiciones óptimas de operación para un fermentador de 5 l, en el caso de la fermentación de sacarosa por *A. niger* para obtener ácido glucónico son: 1.2 vvm de aireación, 1000 rpm de agitación, control de temperatura a 30°C, y control de pH a 6.0.

5.4. PRODUCCION DE OLIGOSACARIDOS DE GLUCOSA Y FRUCTOSA

Como se puede observar en las figuras 18, 20 y 22, que corresponden a las fermentaciones donde se utilizó sacarosa, se encuentra un compuesto cuyo tiempo de retención es mayor que el de todas las sustancias analizadas (fructosa, glucosa, gluconato y sacarosa). Se supuso que por ser eluidas al final de la corrida, esta sustancia debía tener un peso molecular mayor al de

la sacarosa. En la figura 21 se marcó con D el seguimiento de la cinética de esta sustancia.

Otra opción era que este compuesto fuera otro carbohidrato que se produjera como subproducto, incluso se pensó que era sorbitol, ya que se encontró reportado en la literatura que podía ser un subproducto de la reacción enzimática de obtención de ácido glucónico. Sin embargo, esta última posibilidad se desechó debido a que el sorbitol puro presentó un tiempo de retención similar al de la glucosa.

Por otra parte se sabe que la invertasa cuando se encuentra en concentraciones bajas y en presencia de altas concentraciones de sacarosa y fructosa, presenta una tendencia a formar oligosacáridos por reacciones de transglucosidación. Los más frecuentes son: O- β -D-fructosil-(2 \rightarrow 6)-D-glucosa, O- β -D-fructosil-(2 \rightarrow 1)-D-fructosa (inulobiosa) y O- β -D-fructosil-(2 \rightarrow 6)-D-fructosa (levanobiosa) ²³.

Por esta razón se procedió a tratar una muestra de esta sustancia con invertasa comercial en altas concentraciones con el fin de observar si había alguna acción sobre estos productos. Se incubó por 6 horas a 40°C junto con un control al que no se le agregó enzima. Los resultados se presentan en la figura 26, donde se observa que el compuesto desconocido (D) se hidroliza formando fructosa y glucosa (G+F), que aparecen juntos en un solo pico. Por lo que se concluye que en las fermentaciones donde se utilizó como sustrato sacarosa se presentan reacciones de transglucosidación con la subsecuente formación los

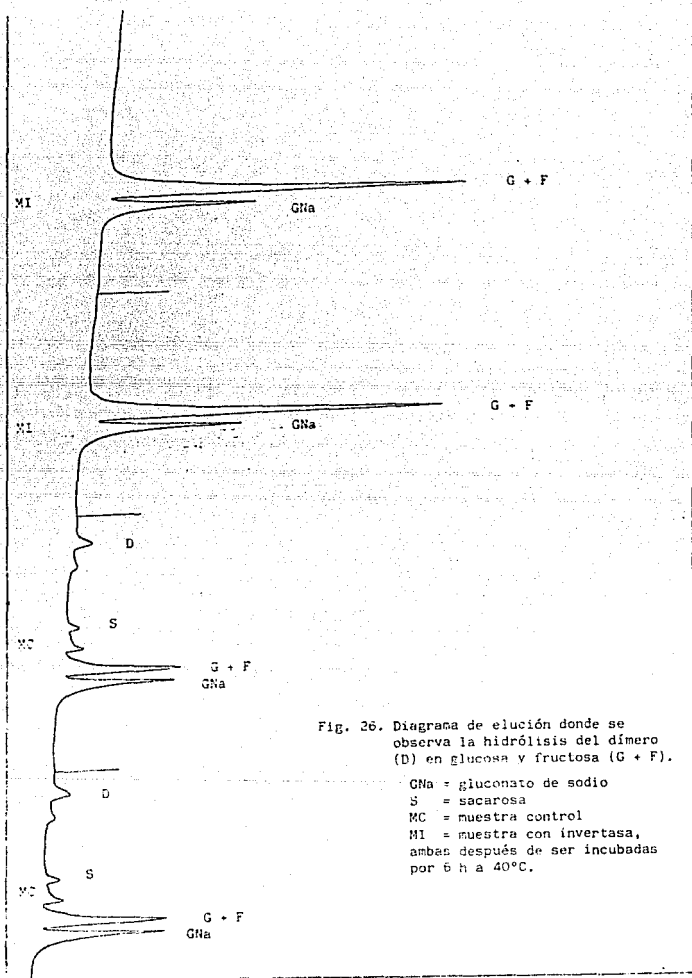


Fig. 26. Diagrama de elución donde se observa la hidrólisis del dímero (D) en glucosa y fructosa (G + F).

GNa = gluconato de sodio
 S = sacarosa
 MC = muestra control
 MI = muestra con invertasa,
 ambas después de ser incubadas
 por 6 h a 40°C.

oligosacáridos antes mencionados.

5.5. BIOCONVERSION UTILIZANDO CELULAS INMOVILIZADAS

Las células utilizadas para este proceso se obtuvieron de una fermentación de 0.5 l. Se filtraron y se resuspendieron en una solución de alginatos y SiO_2 , posteriormente se formaron pequeñas cápsulas al coagular las redes de alginatos con CaCl_2 (remitirse a materiales y métodos).

Después de inmovilizar las células, se observó una pérdida total de la actividad de glucosa oxidasa.

Las posibles causas que originaron tal comportamiento son:

- a) Que la concentración de cloruro de calcio utilizada para la formación de las redes de alginatos, haya sido muy alta, y haya inhibido a la enzima. El inconveniente es que si no se utiliza tal concentración de la sal, el alginato no coagula.
- b) Que haya una fuerte limitante difusional de los sustratos al interior de las células.
- c) Que el peróxido de hidrógeno formado durante la reacción enzimática, no difunda hacia el exterior de la cápsula de alginatos o que no sea degradado por la catalasa con la rapidez suficiente, produciéndose la desactivación de la glucosa oxidasa.

En el caso de que el problema fuera el último que se planteó, la solución pudo haber sido el encapsular junto con el micelio y la sílica, carbón activado para catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno o agregar catalasa

comercial. Sin embargo se planteó intentar la reutilización del micelio tal cual se obtenía de la fermentación ya que era más factible.

5.6. REUTILIZACION DE CELULAS

Se tomó el micelio contenido en un litro de la última fermentación realizada cuando la muestra se encontraba en condiciones de actividad máxima (30 h). A este litro de medio se le agregó más sacarosa (200g) y se siguió el transcurso de la bioconversión. Los controles de la bioconversión fueron los mismos utilizados anteriormente, incluyendo la agitación de 1000 rpm y la aireación de 1.2 vvm. La tabla 13 y la figura 27 presentan los resultados obtenidos de este experimento. Así mismo, en la figura 28 se muestran los diagramas de elucidación correspondientes a las diferentes etapas de este proceso.

Es evidente que la bioconversión no resultó exitosa, ya que teóricamente se esperaba obtener más gluconato (aproximadamente 300 g/l) en un menor tiempo.

La razón por la que no funcionó es difícil de determinar, ya que la enzima se encontraba en condiciones óptimas de temperatura, pH, concentración de sustratos y actividad: la actividad fue disminuyendo conforme pasó el tiempo. Puede ser que se presente autólisis celular y que se liberen proteasas que hidrolicen a la enzima o bien que se pierda o se inhiba la actividad de glucosa oxidasa.

Cepa AN166 11

reutilizando células.

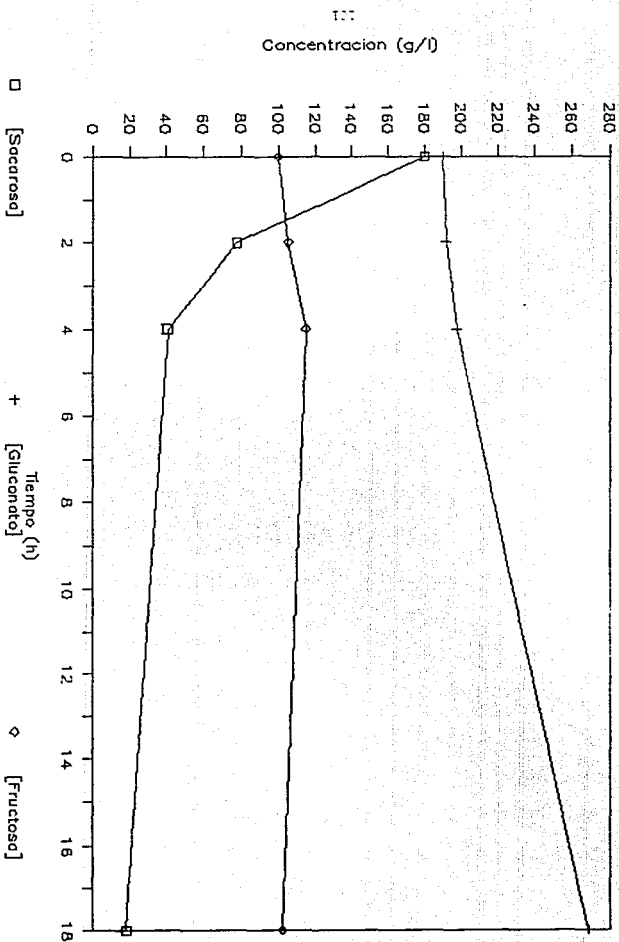


FIGURA 27.

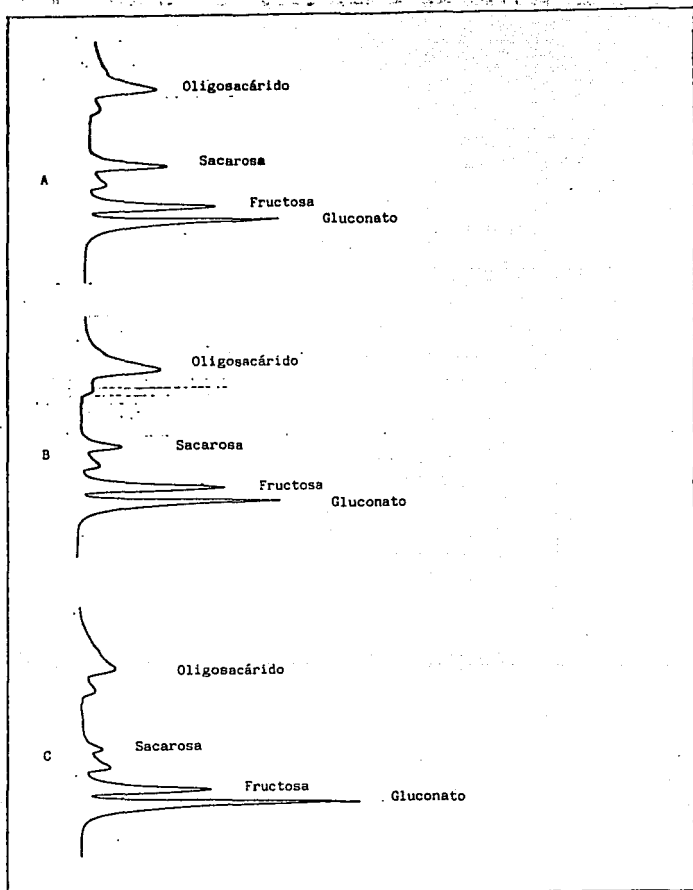


Fig. 28. Proceso de bioconversión. Diagramas de elución de muestras tomadas a:

A. t = 2 h dil. 0.4:10 C. t = 18 h dil. 0.4:10
 B. t = 4 h dil. 0.4:10

TABLA 13. RESULTADOS DE LA BIOCONVERSION CON CELULAS
INMOVILIZADAS DE *A. niger*.

TIEMPO (h)	[SACAROSA] (g/l)	[GLUCONATO] (g/l)	[FRUCTOSA] (g/l)	GLUCOSA OXIDASA (U/mg cél.)
0	180.0	190.0	100.0	728
2	77.8	192.1	105.5	644
4	40.9	197.8	115.2	561
18	18.4	268.3	102.2	332

5.7. EXTRACCION DE LAS ENZIMAS GLUCOSA OXIDASA, CATALASA E INVERTASA

Paralelamente a los estudios de las fermentaciones se experimentó la extracción de las enzimas glucosa oxidasa, catalasa e invertasa. Debido a que las enzimas son intracelulares se tuvo que romper el micelio por medios mecánicos (molienda en mortero con arena de mar), para posteriormente poder extraer las enzimas con buffer de fosfatos 0.1 M pH= 5.6.

La tabla 14 muestra los resultados de la extracción de las enzimas glucosa oxidasa, catalasa e invertasa. La actividad del extracto se reporta por g de células tomando en cuenta que la extracción se hizo a partir de 13.3068 g de células con 400 ml de buffer.

Como se puede observar, la eficiencia en la extracción de la glucosa oxidasa resultó ser muy alta en comparación con las otras dos enzimas.

TABLA 14. EFICIENCIA DE LA EXTRACCION DE ENZIMAS
 A PARTIR DE MICELIO DE *A. niger*.

ENZIMA	$A_{cél}$ (U/g cél)	A_{ext} (U/g cél)	% recuperación
Glucosa oxidasa	231,400	217,000	93.77
Catalasa	512.31	132.9	25.94
Invertasa	792.5	212.8	26.85

En realidad no se cuenta con información sobre la estabilidad de las enzimas, pero resulta sorprendente la baja eficiencia con la que se extraen la catalasa y la invertasa. Si se quisiera comercializar solo glucosa oxidasa como extracto líquido, este sería un buen método de obtención, ya que el rendimiento de recuperación fue alto y se inhiben otras enzimas que podrían considerarse como impurezas. Habría que probar otras condiciones de extracción para obtener una mayor recuperación de los otras dos enzimas.

Sin embargo, en un sistema de degradación de glucosa o de oxígeno en el que fuesen a emplearse glucosa oxidasa y catalasa conjuntamente, se requeriría para que la velocidad de ambas enzimas fuese igual que existiera una relación de 672 unidades de glucosa oxidasa por 1 unidad de catalasa, unidades definidas anteriormente.

Así, para una actividad de 217,000 U de glucosa oxidasa, como la obtenida en el extracto, se necesitan aproximadamente 322 unidades de catalasa. La actividad de catalasa en este es inferior a lo requerido por lo que el extracto obtenido no

funcionaria en un sistema de degradación donde fuera necesario eliminar el peróxido de hidrógeno formado durante la reacción enzimática, a la misma velocidad de degradación de la glucosa o el oxígeno.

5.8. RECUPERACION Y PURIFICACION DE GLUCONATO DE SODIO

Una vez terminado el proceso fermentativo, la biomasa se separa del caldo de fermentación por filtración y el sobrenadante se concentra hasta una densidad aproximada a 1.43 g/ml, se diluye aproximadamente a la mitad con etanol y se deja cristalizar en frío.

Los cristales obtenidos tienen como impureza fructosa, como se puede apreciar en la tabla 15, por lo que es necesario hacer una recrystalización con etanol. Los resultados de este proceso de purificación se presentan en la tabla anteriormente mencionada. En la figura 29 se presenta el diagrama de elución de una muestra de gluconato de sodio recrystalizado, donde se puede apreciar el grado de pureza del producto obtenido.

TABLA 15. COMPOSICION DEL GLUCONATO DE SODIO OBTENIDO EN LAS DIFERENTES ETAPAS DE CRISTALIZACION.

Compuesto	Primera cristalización	Segunda cristalización
Gluconato de sodio	59.2%	93.98%
Fructosa	40.8%	6.01%

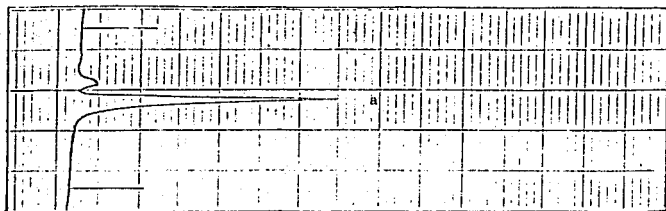


Fig. 29. Diagrama de elución del gluconato de sodio recristalizado.

Concentración 1 %.

a. Gluconato de sodio.

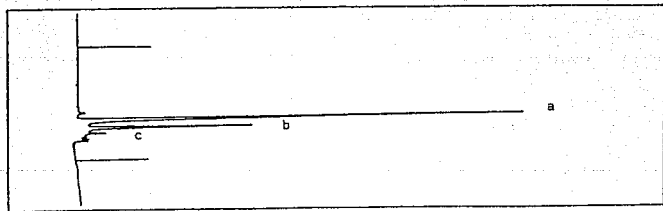


Fig. 30. Diagrama de elución de una muestra de jarabe fructosado.
Se utilizó la columna Altex -spherogel.

- a. Fructosa.
- b. Glucosa.
- c. Sacarosa.

Se considera que un paso de recristalización es suficiente para obtener un alto grado de pureza en el producto, que presenta las características físicas propias del gluconato de sodio: polvo blanco de cristales irregulares, inodoro y con un ligero sabor ácido.

El rendimiento de la recristalización fue de 98.66%.

5.9. PURIFICACION DE FRUCTOSA

A continuación se presentan las características del jarabe de fructosa obtenido en las diferentes etapas del proceso de purificación.

Etapas I.

Cuando el gluconato de sodio se cristaliza, el líquido sobrenadante es rico en fructosa. A estas aguas madres, se les agrega el líquido sobrenadante de los lavados y de la recristalización del gluconato, pues este líquido contiene cantidades importantes de fructosa. Se determina la conductividad del líquido, ya que es un parámetro representativo del grado de pureza del jarabe, en lo que se refiere al contenido de sales.

Composición de las aguas de cristalización del gluconato:

Conductividad = 366 $\mu\text{S}/\text{cm}$

Composición (g/l): [fructosa]^{*} = 87.29

[gluconato] = 49.26

Composición porcentual de sólidos disueltos:

fructosa^{*} = 63.93%

gluconato = 36.07%

Etapa II.

A las aguas madres de cristalización y recristalización se les elimina el etanol presente por evaporación al vacío. Una vez eliminado el etanol, el líquido se trata con resinas intercambiadoras de cationes. La composición del jarabe después de pasar por este tratamiento es la siguiente:

Conductividad = 126 $\mu\text{s}/\text{cm}$

Composición (g/l): [fructosa]^{*} = 109.43

[gluconato] = 24.87

Composición porcentual de sólidos disueltos:

fructosa^{*} = 81.89%

gluconato = 18.11%

Como se puede observar, la conductividad disminuyó considerablemente al eliminarse los cationes presentes en el líquido inicial. Su presencia se debe a que son los restos de lo que el microorganismo no utilizó del medio de fermentación.

Etapa III.

Posteriormente, el jarabe se trata con resinas intercambiadoras de aniones. Esta etapa es muy importante pues aquí es donde se elimina el principal contaminante del jarabe: los iones gluconato. La muestra del jarabe final se analizó con una columna específica para carbohidratos, gracias a esto se pudo detectar la presencia de sacarosa y se diferenció la glucosa de

* concentración de fructosa + glucosa (no se eluyen separadamente en la columna utilizada para la determinación)

la fructosa. Las características del jarabe final son las siguientes:

Conductividad = 55 $\mu\text{s}/\text{cm}$

Composición (g/l): [fructosa] = 508.5

[glucosa] = 169.2

[sacarosa] = 21.4

[gluconato] = 0

Composición porcentual de sólidos disueltos:

fructosa = 72.73%

glucosa = 24.20%

sacarosa = 3.06%

Los resultados anteriores muestran que del producto final se ha eliminado por completo el gluconato de sodio y la mayoría de los iones residuales de la fermentación, en la figura 30 se presenta el diagrama de elución de una muestra del jarabe final.

Inicialmente se había planeado hacer la cristalización de la fructosa. Se intentó sin obtener resultados, debido a que las condiciones de cristalización son muy especiales (remitirse a generalidades) y no se pudieron reproducir en el laboratorio. Además se pensó que la cristalización aumentaría considerablemente el costo de producción. Por esta razón se decidió presentar como producto final el jarabe fructosado.

Sus características organolépticas fueron las esperadas: color ligeramente ámbar, inodoro y de sabor dulce.

5.10. RESUMEN DEL PROCESO

En la figura 31 se muestra un diagrama de bloques que resume el proceso general, en donde se obtienen como productos finales gluconato de sodio, jarabe de fructosa, y un extracto de glucosa oxidasa, catalasa e invertasa.

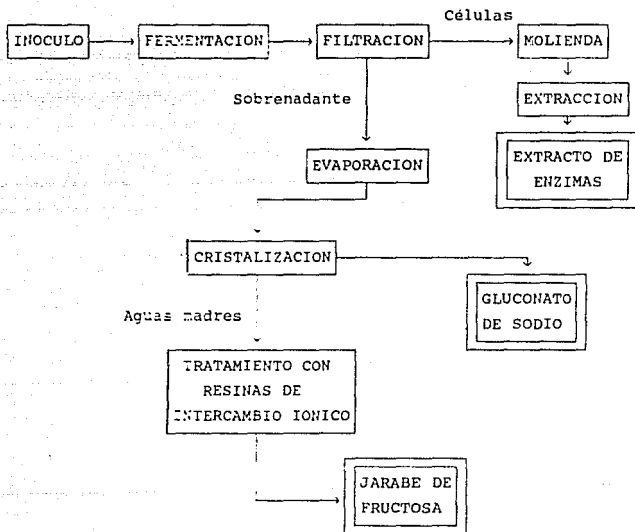


FIG. 31. DIAGRAMA DE BLOQUES DEL PROCESO.

5.11. ASPECTOS ECONOMICOS DEL PROCESO

En esta sección se presentan los costos de producción del gluconato de sodio y subproductos.

Se tomaron sólo en cuenta los precios de las materias primas, que se presentan en la tabla 16, para hacer un cálculo general del costo de producción del gluconato de sodio obtenido en el laboratorio y poderlo comparar con el precio comercial, que es de \$5,210/kg (Amconal Química Mexicana, S.A.)

TABLA 16. RELACION DEL PRECIO DE LAS MATERIAS PRIMAS
CON EL COSTO PARA LA PREPARACION DE 1 L DE MEDIO.

Materia prima	\$/kg	Composición (g/l)	\$/l
Sacarosa estándar	724	400.0	289.6
Sacarosa refinada	947	400.0	378.8
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	79,896	2.0	159.8
KH_2PO_4	45,500	0.25	11.4
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	52,558	0.25	13.1
KCl	46,082	0.25	11.5
FeCl_3	132,116	0.01	1.3

Fuente: Instituto Nacional del Consumidor y Proveedor Científico
Precios actualizados a octubre de 1989.

Con base en los datos de la tabla 16 se calcula que el costo por litro con azúcar estándar es de aproximadamente \$487. Y que el costo por litro con azúcar refinada es de aproximadamente \$576.

Para calcular el costo de producción del gluconato hay que tomar en cuenta que se produjeron 232.2 g/l de gluconato, y que

el rendimiento de cristalización fue de 98.66%, por lo que se tiene un rendimiento total de:

$$232.1 \text{ g/l} * 0.9866 = 228.98 \text{ g gluconato/l}$$

Partiendo de azúcar estándar:

$$\frac{\$487}{1} * \frac{1}{228.98 \text{ g}} * \frac{1000 \text{ g}}{\text{kg}} = \$2,127/\text{kg de gluconato.}$$

Partiendo de azúcar refinada:

$$\frac{\$576}{1} * \frac{1}{228.98 \text{ g}} * \frac{1000 \text{ g}}{\text{kg}} = \$2,516/\text{kg de gluconato.}$$

Estos costos representan un 40.8% y 48.3% con respecto al precio de venta, por lo que incluso se podría utilizar como materia prima azúcar refinada, de esta manera se trabajaría con menos impurezas desde el principio; porque como se sabe, la calidad del producto final, depende principalmente de la calidad de la materia prima.

A este costo, habría que añadirle el de el etanol utilizado, tomando en cuenta que se puede reutilizar, así como el de las resinas de intercambio iónico que también cuentan con un tiempo de vida media en que su funcionamiento es óptimo.

Además hay que tomar en cuenta que se obtiene como subproducto fructosa lo que hace más atractivo el proceso, ya que el precio comercial de la fructosa es muy alto. Cien gramos de fructosa pura cristalina cuestan \$54,200 (Proveedor Científico).

Por otra parte los precios comerciales de las enzimas son los que se mencionan a continuación (Sigma Reagents.1989):

CATALASA de *A. niger*. Suspensión en solución 3.2 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH = 6.0. De actividad aproximada 5,000 U/mg de proteína, cuesta 77.2 dólares.

GLUCOSA OXIDASA de *A. niger*. Solución en buffer de acetatos 0.1 M pH = 4. Con 5,000 U/ml cuesta 294.9 dólares.

INVERTASA de levadura para panificación. 500 g con una actividad de 30 a 50 U/mg, cuestan 19.95 dólares.

Finalmente habría que tomar en cuenta todos los costos fijos como servicios, rentas , impuestos, etc. para poder calcular el precio final del producto. Pero como estos factores son muy difíciles de estimar al nivel en que se trabajó se considera que al menos en lo que a materias primas se refiere, nuestro producto es comercialmente viable.

VI CONCLUSIONES

Se seleccionó una cepa de *Aspergillus niger* con la capacidad de producir altas cantidades de ácido glucónico por medio de un proceso fermentativo.

A diferencia de los procesos industriales actuales, este microorganismo es capaz de utilizar sacarosa como materia prima, lo que reduce sensiblemente el costo de producción. Además de que al utilizar como fuente de carbono sacarosa, se obtiene como subproducto fructosa, que por su precio en el mercado resulta ser un producto sumamente atractivo que podría influir sensiblemente en las perspectivas económicas del proyecto.

Por otra parte, se definieron las condiciones de fermentación a nivel laboratorio para llevar a cabo el proceso: temperatura de 30°C, regulación de pH con NaOH a 6.0, 1.2 vvm y 1000 rpm. Se encontró un efecto sumamente importante de la aireación y agitación en la producción del ácido glucónico. Si el oxígeno está limitado en la fermentación, se favorece la hidrólisis de sacarosa, obteniéndose altos rendimientos de fructosa; pero si se suministra suficiente oxígeno para cubrir el requerimiento (1.2 vvm y 1000 rpm) se obtienen altos rendimientos de gluconato.

Se definieron las condiciones de recuperación y purificación

de los productos. Basta con someter al sobrenadante de la fermentación a un proceso de doble cristalización con etanol, para obtener gluconato de sodio de alta pureza, con rendimientos altos. Al jarabe de fructosa se le debe someter a un tratamiento con resinas de intercambio iónico para purificarla.

Se obtuvieron además de la glucosa oxidasa, catalasa e invertasa. El proceso de extracción no resultó ser eficiente para la catalasa e invertasa, pero en cambio fue muy bueno para la glucosa oxidasa, por lo que puede ser un método para obtener extractos cuya enzima principal sea la glucosa oxidasa.

Las condiciones para el proceso de bioconversión deben ser estudiadas cuidadosamente, ya que para que este proceso sea eficiente se deben dar las condiciones óptimas para la enzima. En este caso hay que prestar atención especial a los agentes que pudieran inhibir o desestabilizar a la glucosa oxidasa.

En el caso de que se quisiera inmovilizar las células, se deberá tener en cuenta el efecto inhibitor del peróxido de hidrógeno, por lo que se deberá incluir dentro de las cápsulas algún agente catalizador de la reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno.

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

- 1 Badui Dergal, Salvador, *Química de los alimentos*. 1a. ed., Editorial Alhambra Mexicana. México, D.F. , S.A. 1981.
- 2 Brock, Thomas D. *Biología de los microorganismos*. 2a. ed. Ediciones Omega. Barcelona, España. 1978.
- 3 Cho, Y.K. & Bailey, J.E. "Enzyme Immobilization on Activated Carbon: Alleviation of Enzyme Deactivation by Hydrogen Peroxide", *Biotechnology and Bioengineering*, 19, 769 (1977).
- 4 Coulthard, C.E., Michaelis, R., et al. "Notatin: an Anti-bacterial Glucose-aerodehydrogenase from *Penicillium notatum*", *Nature*, 150, Nov. (1942).
- 5 Duvnjak, Z., Lilly, M.D. "The Immobilization of Glucose Oxidase to Manganese Oxide", *Biotechnology and Bioengineering*, 18, 737 (1976).
- 6 Fennema, O.R. *Food Chemistry*. 2a. ed. Marcel Dekker, Inc. New York, U.S.A. 1985.
- 7 Fessenden, R.J., Fessenden, J.S. *Química Orgánica*, Grupo Editorial Iberoamérica. México, D.F. 1983.

- 8 Fogerty, W.M. *Microbial Enzymes and Biotechnology*. Appl. Sc. Pub. s.l. 1983.
- 9 Frazier, W.C. *Microbiología de los Alimentos*. Ed. Acribia. Zaragoza, España. 1962.
- 10 Fukushima, Y., Katsutoshi, O. et al. "A New Immobilization Technique of Whole Cells and Enzymes with Colloidal Silica and Alginate", *Biotechnology and Bioengineering*, 32, 584 (1988)
- 11 Holstein A.G., (1962) United States Patent 3,050,444
- 12 Keilin D., Hartree E.F. "Properties of Glucose Oxidase (Notatin)", *Nature*, 42, 221 (1947)
- 13 Kirk - Othmer, *Encyclopedia of Chemical Technology*, 3a. ed. New York, U.S.A., John Wiley & Sons. 1978. V. 4
- 14 Op. Cit. 13 V 9.
- 15 Op. Cit. 13 V 21.
- 16 Metz, B., Kossen N.W., "The Growth of Molds in the Form of Pellets - A Literature Review", *Biotechnology and Bioengineering*, 19, 781 (1977).
- 17 Milsom, P.E., Meers J.L. En: *Comprehensive Biotechnology: Current Commodity Products*. 1a. ed. Pergamon Press.Oxford, U.K. 1985.

- 18 Müller, H.-M., "Gluconate accumulation and enzyme activities with extremely nitrogen - limited surface cultures of *Aspergillus niger*", *Archives of Microbiology*, 144, 151 (1986).
- 19 Pepler, H.J., Perlman, D. *Microbial Technology*, 2a.ed. Academic Press. New York, U.S.A. 1979.
- 20 Porges, N., Clark, T.F. et al. "Gluconic Acid Production. Repeated Recovery and Re-use of Submerged *Aspergillus niger* by Filtration", *Industrial and Engineering Chemistry*, 33, 1065 (1941).
- 21 Prescott, F.J, et al. "Gluconic Acid and Its Derivatives", *Industrial and Engineering Chemistry*, 45, 338 (1953).
- 22 Quintero, R. *Ingeniería bioquímica*. 1a. ed. Ed. Alhambra Mexicana S.A. México, D.F., 1981.
- 23 Reed, G. *Enzymes in Food Processing*. 2a ed. Academic Press, Inc. New York, U.S.A. 1975.
- 24 *Revista de Comercio Exterior*. Banco Nacional de Comercio Exterior, S.N.C. 39, Abril (1989).
- 25 Rhem, H.J., Reed, G. *Biotechnology*. Vol 1: Microbial Fundamentals. VCH Publishers. R.F.A. 1980.

- 26 Rogalski, J. et al. "Optimization of glucose oxidase synthesis in submerged cultures of *Aspergillus niger* G-13 mutant", *Enzyme Microb. Technol.*, 10, 508 (1988).
- 27 Schwimmer, S., *Source book of food enzymology*. The AVI Publishing, Inc. U.S.A. 1981.
- 28 Smith J.E., *Fungal biotechnology*. Academic Press, Inc. New York, U.S.A. 1980.
- 29 Solomons, T.W.G., *Organic Chemistry*. 2a. ed. John Wiley & Sons. New York, U.S.A. 1980.
- 30 Sumner, J.B., Howell, A., "Method for Determination of Saccharase Activity", *J. Biol. Chem.*, 108, 51 (1935).
- 31 Van Bruggen J.T. et al. "Penicillin B: preparation, purification and mode of action", *Nature*, 34, (1943).
- 32 Wang, Cooney et al. *Fermentation & Enzyme Technology*. John Wiley & Sons. U.S.A. 1979.
- 33 Whitaker, R.J. *Principles of enzymology for the Food Science*. Marcel Dekker, Inc. New York, U.S.A. 1972.
- 34 Yamauch, T. (1975) U.S. Patent 3,928,062.