

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

OBTENCION DE ACIDO GLUCONICO A PARTIR
DE ALMIDON POR METODOS MICROBIOLOGICOS

91

T E S I S
QUE PARA OBTENER
EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A :
LAURA ISABEL ESCOBAR MENDOZA

1 9 7 4



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CLAS. Tesis

ADQ. 1974

FECHA

PROC. MTZ-88

96



QUILICURA

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA:

PRESIDENTE

ENRIQUE GARCIA GALEANO

VOCAL

ALFREDO ECHEGARAY ALEMAN

SECRETARIO

JORGE SOTO SORIA

1er. SUPLENTE

RUBEN BERRA GARCIA COSS

2º SUPLENTE

OSCAR H. GALVAN FELIX

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA: Departamento de Microbiología. Facultad de Química.

NOMBRE DE LA SUSTENTANTE: LAURA ISABEL ESCOBAR MENDOZA.

NOMBRE DEL ASESOR DEL TEMA: Q.B.P. JORGE SOTO SORIA.

A M I M A D R E

A LA MEMORIA DE MI PADRE

A Teté

con reconocimiento y gran cariño.

A Pablo y mi familia

por el apoyo que siempre me han brindado.

Con profundo y sincero
agradecimiento al Q.B.P. Jorge Soto Soria
sin cuya dirección y
valiosa ayuda no
hubiera sido posible
la realización de esta Tesis

Al Q.B.P. Alfredo Echegaray
con agradecimiento,
por haber logrado una mejor
exposición de este Trabajo

- -
CONTENIDO

	Página
INTRODUCCIÓN	1
GENERALIDADES	2
MATERIAL Y METODOS	20
RESULTADOS	39
DISCUSION	62
CONCLUSIONES	70
RESUMEN	72
BIBLIOGRAFIA	73

INTRODUCCION

INTRODUCCION.

Uno de los mayores problemas que se presenta en nuestro país, para el avance acelerado de su tecnología, y que en los últimos años se ha hecho más notorio, ha sido la falta de materias primas para la industria de transformación. Industrias importantes como la farmacéutica y la de alimentos, actualmente importan gran cantidad de esta materia prima, lo que trae como consecuencia un aumento en el costo de los productos ya procesados.

El presente trabajo, tiene como objetivo primordial, obtener ácido glucónico en forma de su sal de calcio (gluconato), ácido que actualmente se importa al país y que tiene amplio uso en varias industrias como la farmacéutica, de alimentos, textil y otras.

Otro de los objetivos es emplear en esta fermentación como materia prima más barata el almidón, en sustitución de la clásicamente utilizada glucosa

La metodología usada consistió en una fermentación por cultivo sumergido y a nivel de laboratorio empleando como inóculo, una mezcla de dos microorganismos, uno de ellos es el hongo Aspergillus niger muy utilizado en la producción de ácido glucónico y además por su poder de hidrólisis sobre el almidón, el otro, una bacteria (Acetobacter suboxydans), con alto poder oxidante y específico para la formación de este ácido; con el propósito de obtener en primer lugar la hidrólisis del almidón a glucosa y en segundo con la acción combinada de los dos microorganismos, acortar el tiempo clásico que dura el proceso de obtención del ácido glucónico.

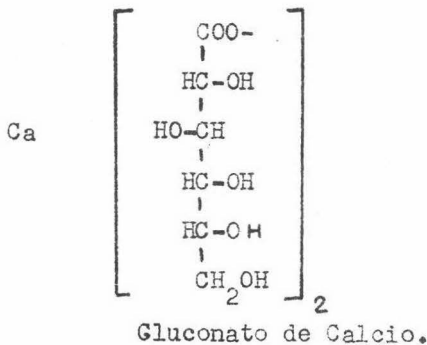
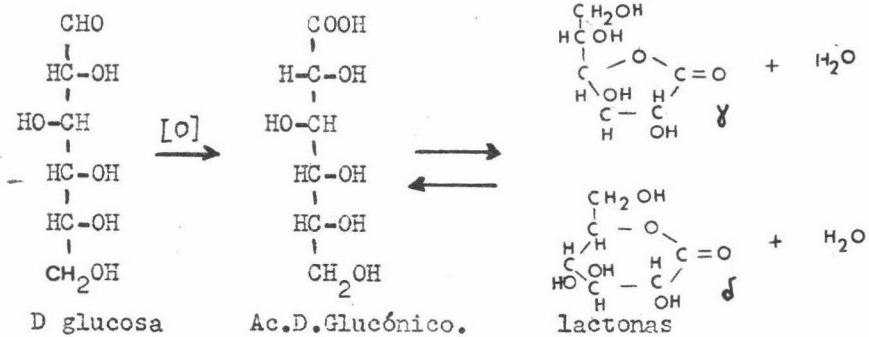
GENERALIDADES

GENERALIDADES.

El ácido glucónico es un polvo blanco, inodoro, cristalino, con un peso molecular de 196.16, un punto de fusión de 131°C. y una rotación específica de $[\alpha]^{20} = -6.7$. (24)

Es muy soluble en agua, poco soluble en alcohol e insoluble en la mayoría de otros solventes orgánicos. En solución acuosa, existe un equilibrio entre el ácido glucónico y sus dos lactonas, gamma y delta, variando su composición, según la concentración de la solución y la temperatura.

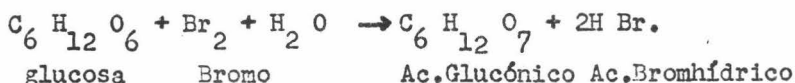
Es el primer producto de oxidación de la glucosa y por ello es un ácido aldónico, una de las formas comerciales más ampliamente usadas es como su sal de calcio (gluconato de calcio)(12)



Métodos de Producción.- Este ácido puede obtenerse por:

A: Métodos Químicos.

A₁.- Oxidación de glucosa en medio alcalino con hipobromitos.



A₂. -- Oxidación electrolítica de soluciones alcalinas de glucosa, usando un ánodo insoluble en presencia de un yoduro soluble en agua (9).

B: Métodos Biológicos.

Estos métodos consisten en la fermentación de soluciones nutritivas conteniendo glucosa, por medio de algunos hongos y bacterias.

La producción de este ácido por microorganismos fue observada por primera vez por Boutrox en 1878 pero lo confundió con ácido láctico, y Molliard en 1922 lo reporta como otro producto de las fermentaciones cítrica y oxálica.

En 1924 Bernhaver descubre una cepa de Aspergillus niger que produce casi exclusivamente ácido glucónico en presencia de carbonato de calcio (10).

Y así se empiezan a conocer las constantes más adecuadas para esta fermentación.

Otro proceso biológico utiliza bacterias para la fermentación de glucosa, específicamente las del género Acetobacter, tales como: Acetobacter oxydans, Acetobacter suboxydans, Acetobacter pasterianum etc. (2).

Las cepas utilizadas en este trabajo fueron: Acetobacter suboxydans y Aspergillus niger.

Acetobacter suboxydans: Bacteria cuya clasificación puede verse en el Cuadro 1. Su nombre proviene del latín: Acetum o vinagre, y bacter es decir: forma masculina de bactrum: bastón. - Suboxydans significa parcialmente oxidante.

La morfología de esta bacteria consiste de bastones cortos, solos o en cadenas. Inmóviles. Gram negativos. Forman en medios líquidos una película muy delgada y difícilmente visible. Las colonias en agar nutritivo son muy pequeñas, circulares y ligeramente amarillas.

Producen ácido de etanol, propanol, glucosa, glicerol y sorbitol. Su temperatura óptima de crecimiento es de 30°C.

Su característica distintiva es la oxidación parcial de sustratos, con la subsecuente formación de cristales de ácido 5 cetoglucónico sobre superficies de medios de cultivo que contengan glucosa y carbonato de calcio.

Origen: Fueron aislados de cerveza en descomposición.

Habitat: Cerveza, también se encuentran en frutas ácidas y vinagre (2).

Aspergillus niger: Su posición taxonómica se puede ver en el Cuadro 2 y como se dijo anteriormente, existen cepas que presentan una capacidad muy especial para producir altos rendimientos de ácido glucónico (6, 7, 13).

Esto es debido a la presencia, en este hongo de una enzima, una deshidrogenasa, que se pensó primero era una oxidasa, lla

CLASIFICACION TAXONOMICA DE ACETOBACTER SUBOXYDANS

(Bergey's Manual of Determinative Bacteriology)

DIVISION	CLASE	ORDEN	SUB ORDEN	FAMILIA	GENERO	ESPECIE
Protophyta	Schizophycaceae		Rhodobacteriineae			
	Schizomycetes	Pseudomonadales	Pseudomonadineae	Pseudomonadaceae	Acetobacter	suboxydans
	Microtatobiotes					

CUADRO 1

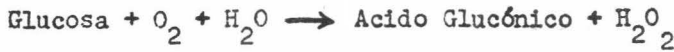
POSICION TAXONOMICA DE ASPERGILLUS NIGER (24)

(Según Alexopoulos C. J. 1962)

DIVISION	SUBDIVISION	CLASE	ORDEN	FAMILIA	GENERO	ESPECIE						
Thallophyta	<ul style="list-style-type: none"> Algas Liquenes Hongos (Fungi) 	<ul style="list-style-type: none"> Mixomycetes Eumycetes 	<ul style="list-style-type: none"> Basidiomycetes Ascomycetes Deuteromycetes 	<ul style="list-style-type: none"> Eurotiales 	<ul style="list-style-type: none"> Ascosphaeracea Eurotiaceae Gymnoascaceae 	<ul style="list-style-type: none"> Aspergillus Penicillus 	<ul style="list-style-type: none"> { Niger 					

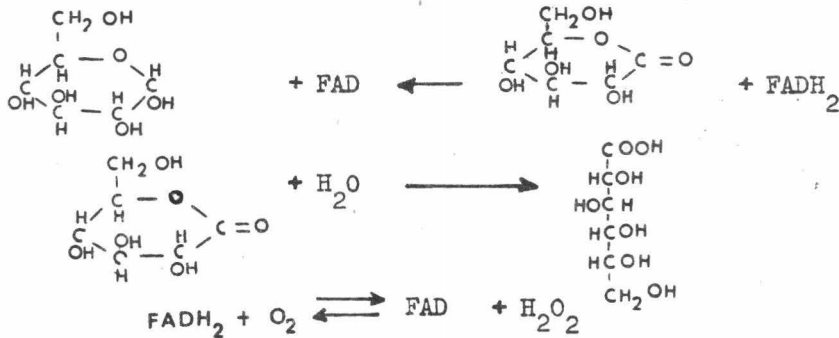
CUADRO 2.

mada "glucosa oxidasa", que cataliza la reacción siguiente:



Ahora se sabe que la glucosa oxidasa o mas bien esta deshidrogenasa, tiene un grupo prostético que es el catalizador específico para la oxidación de la β -D glucopiranososa. Los productos de la reacción aeróbica son β -D gluconolactona y peróxido de hidrógeno. La lactona se hidroliza rápidamente dando el ácido el cual, puede, en presencia de carbonato de calcio convertirse en gluconato (15).

Estas reacciones se sintetizan de la siguiente manera:



FAD = Flavin Adenin Dinucleotido.

Métodos de Producción.

Los métodos de producción microbiológica de ácido glucónico, utilizados a escala industrial, han sido los siguientes:

1o.- Un método hacía uso de bacterias en fermentaciones aeróbicas con suficiente cantidad de oxígeno y a concentraciones de glucosa variando desde 15 hasta 45%, encontrándose su valor óptimo en 25%. El mosto se adicionaba de sales minerales y de la bacteria y se incubaba a temperaturas de 15 hasta 35°C. Por un

tiempo hasta de 18 días, los rendimientos que se reportaban eran muy altos, hasta de 98% (19).

20.- Otro método de superficie, utilizaba hongos generalmente Aspergillus niger que se inoculaba en recipientes de muy poco fondo, con gran superficie, en donde podía crecer el micelio y provistos de tapas para evitar contaminaciones, esto permitía que el hongo actuara por medio de su enzima sobre la solución nutritiva estéril que contenía glucosa, la cual se convertía en ácido glucónico dejándose actuar por el tiempo necesario, durante el cual, no se debía mover el cultivo. (6)

30.- El método del cultivo sumergido, es el más utilizado actualmente, debido a que la formación del ácido glucónico es intracelular, la solución nutritiva y los productos de su oxidación deben penetrar y salir del micelio del hongo por difusión, la agitación del sustrato favorecerá esta reacción presentando con ello un mayor rendimiento; y previniendo con el uso de carbonato de Calcio una acumulación del ácido libre con la subsecuente inhibición de la actividad de la enzima, y así se podrá tratar un mayor volumen de solución y por lo tanto de glucosa, y además esta agitación provee una efectiva incorporación de oxígeno, lo que permite satisfacer la demanda del microorganismo que es aerobio (15).

Para este método se diseñaron a escala de laboratorio, diferentes aparatos entre los que destacó el del Tambor rotatorio (1935) en un intento por optimizar las condiciones de esta fermentación. Pero en la actualidad se sabe que en términos generales, la producción de ácido glucónico a escala industrial debe

cuidar de varios aspectos que son:

- a) Selección del microorganismo adecuado,
- b) Su conservación en perfectas condiciones,
- c) Propagación de la semilla para su empleo en el fermentador,
- d) Selección del sustrato adecuado,
- e) Fermentación aerobia
- f) Purificación y concentración del producto.

Actualmente se emplean en la producción industrial de este ácido, fermentadores que deben reunir ciertas características como las siguientes: estos recipientes deben ser suficientemente fuertes para soportar las presiones que ejercen sobre ellos - los grandes volúmenes de medio acuoso; pero al mismo tiempo, los materiales con los cuales están fabricados, no deben sufrir corrosión por el producto de fermentación, ni soltar al medio, iones metálicos tóxicos en el medio de crecimiento. Ya que la mayoría de los fermentadores industriales, utilizan cultivos puros, los fermentadores deben estar equipados para el control o la prevención de crecimiento de algún microorganismo contaminante. Si el crecimiento del microorganismo es aerobio, entonces el tanque debe estar previsto para efectuar una rápida incorporación de aire estéril, de tal manera que el oxígeno de este aire se disuelva en el medio, y sea fácilmente aprovechable por el microorganismo. Además, el dióxido de carbono resultante del metabolismo microbiano deberá ser evacuado del medio adecuadamente.

Debe haber alguna forma de agitación, tanto para mantener en suspensión al microorganismo en el medio; como para hacer

que los nutrientes y el oxígeno en el medio, sean más accesibles a cada microorganismo.

El fermentador debe tener un dispositivo antiespumante, químico o mecánico según requiera el tipo de cultivo utilizado o la economía. Se debe contar con un control de temperatura para mantener una temperatura constante durante el crecimiento del microorganismo. El fermentador necesitará tener una salida para la toma de muestras del cultivo para su análisis, así como para la introducción del inóculo al inicio de la fermentación.

Se requiere también un mecanismo para medir valores de pH y para efectuar ajustes, si es necesario, durante la fermentación, ya sea bajándolo con algún ácido o subiéndolo con la adición de algún álcali.

Junto al fermentador debe estar el tanque semilla, que actualmente es un fermentador pequeño, en el cual se desarrolle el inóculo y luego se agregue directamente al fermentador evitando problemas de contaminación.

Pueden requerirse otros recipientes para el mezclado de los constituyentes del medio de cultivo con el agua.

Debe poderse esterilizar este medio. Debe haber también filtros especiales para conectar la fuente de aire a alta presión y su entrada al fermentador en forma estéril.

Por último debe haber un orificio en la parte inferior del fermentador o algún mecanismo que permita la salida total del líquido de fermentación, además de una entrada accesible para que pueda ser limpiado correctamente entre cada fermentación.

Las variables que es necesario vigilar durante la fermentación

tación son:

1.- Cantidad de oxígeno que entre y la que se disuelve por la agitación y la presión de aire. (19)

2.- Concentración de glucosa. Han sido reportadas como óptimas las soluciones al 20%. (11, 15)

3.- Control del pH. Una alta acidez inhibe la fermentación. La relación a la cual la glucosa se convierte a ácido - glucónico es más rápida en presencia de Carbonato de calcio que en presencia del ácido libre, por lo que se agrega al medio, carbonato de calcio para mantener un pH alrededor de 5, que es el óptimo reportado para la producción del ácido. (27)

4.- Temperatura.

Como toda fermentación, en este caso existe una temperatura óptima que queda comprendida según lo reportado en la literatura (6,7,10, 13) alrededor de 30°C.

Almidón.

El almidón es una sustancia de reserva de las plantas, especialmente abundante en las semillas (cereales) y tubérculos (papas), donde se presenta en forma de granos. La forma y el tamaño de los granos de almidón, es característica de la planta - que lo contiene, lo que lo hace fácilmente identificable utilizando el microscopio.

Es un polisacárido compuesto de unidades de glucosa, unidos por enlaces glucosídicos; hidrolizándolo parcialmente, se obtiene maltosa como principal componente, aunque la enzima maltasa la convierte en 2 unidades de glucosa.

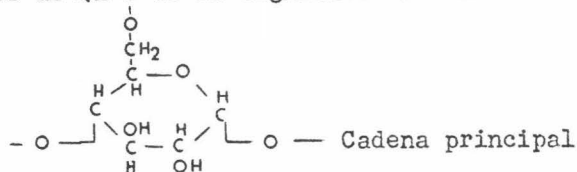
El almidón se puede separar en dos componentes: Amilosa y Amilopectina. Estos pueden ser separados debido a que la amilosa es soluble en agua y menos viscosa en solución que la amilopectina. Si los granos de almidón se dejan hinchar en agua a 60°C - 80°C ., la amilosa se disuelve y la amilopectina restante en los granos, puede recuperarse por centrifugación.

Otra diferencia entre las dos fracciones es el color formado cuando se agrega solución de iodo siendo azul oscuro, para la amilosa y rojo, violeta o café para la amilopectina.

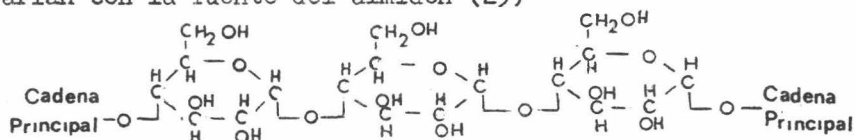
Estas y otras diferencias entre las 2 fracciones pueden ser explicadas por la estructura de sus moléculas.

Aunque ambas están formadas por cadenas de unidades de glucosa, las cadenas, son lineales para la amilosa y ramificadas para la amilopectina. En la molécula de amilopectina, las ramificaciones contienen un promedio de 20 a 25 moléculas de glucosa, - cada una, asociados en cadenas largas con pesos moleculares entre

4,000.000 a 6,000.000. Las ramas están unidas a la cadena principal con enlaces de α 1-6 de la siguiente manera



En contraste con la amilopectina, la amilosa contiene - 200 a 2,100 moléculas de glucosa en una cadena lineal unida en enlaces 1,4 glucosídico, con peso molecular entre 40,000 a - 340,000. Aunque estos pesos moleculares, de ambas fracciones, - varían con la fuente del almidón (25)



Los granos de almidón forman una suspensión en agua fría, pero no se disuelve.

Cuando esta suspensión de almidón es calentada a una temperatura característica al tipo de almidón, los granos se hinchan de improviso. A esto se llama punto de gelatinización o mas correctamente: rango de gelatinización, ya que los granos mayores, comienzan a hincharse a temperaturas más bajas que los granos pequeños, por ejemplo: el rango es de 64° a 72°C para almidón de maiz. Si se continúa el calentamiento la suspensión se torna mas translúcida y más viscosa. El proceso total, se llama gelatinización.

Existen en la naturaleza tres tipos de enzimas que reaccionan con el almidón: α amilasas, β amilasas y fosforilasas.

A las alfa amilasas se les llama tambien "licuificantes"

o dextrogénicas por su acción con el almidón. Están contenidas en semillas en germinación. También se encuentran en la saliva y jugo pancreático y las producen algunos hongos y bacterias. Entre los hongos, los del género *Aspergillus* se distinguen, y de éstos, principalmente *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus niger* son los que dan rendimientos más altos de esta enzima, que se obtiene por medio del método del cultivo sumergido.

Entre las bacterias se puede citar a las del género *Bacillus*, como productoras de esta enzima.

La amilasa, ataca los enlaces α 1, 4 glucosídico de las moléculas de almidón, con la formación de dextrinas de pesos moleculares bajos. Es una enzima extra celular, su acción trae como resultado una rápida lucuefacción y reducción de la viscosidad del almidón; si la acción se continúa resulta una completa sacarificación, siendo el producto final maltosa. La maltasa, enzima que también contienen estos hongos, convierte la maltosa en glucosa. La primera es una enzima amilolítica, ya que hidroliza el almidón y las dextrinas en compuestos de bajo peso molecular, hasta glucosa (19).

La β amilasa es llamada también amilasa sacarificante - porque el principal producto de su acción hidrolítica es la maltosa, esta enzima ataca tanto los enlaces α 1 - 4 como los α 1 - 6 en su acción hidrolítica. Se obtiene casi pura de frijol de soya en germinación aunque también se encuentra en un producto (diastasa) extraído de la malta de cebada y es mezcla de α y β amilasas.

2.4

USOS DEL ACIDO GLUCONICO.

Usos farmacéuticos.

El ácido glucónico tiene amplio uso como fármaco. Las sales de este ácido, son muy eficientes para introducir los elementos "traza" en las dietas. El ácido glucónico ha sido usado para el tratamiento de cálculos renales por su poco poder irritante.

El gluconato ferroso, por sus propiedades no-irritantes es una excelente fuente de hierro en el tratamiento de anemia nutricional y para terapia de hierro. El fosfogluconato ferroso ha sido preparado y se ha encontrado efectivo en el tratamiento de anemia secundaria.

El gluconato de calcio ha demostrado ser un excelente agente terapéutico para el tratamiento de enfermedades causadas por la deficiencia de calcio en el cuerpo humano. También tiene amplio uso veterinario en inyecciones para el ganado que necesite la urgente introducción de calcio (post-parto).

Esta sal ha sido útil como ingrediente en una inyección intramuscular que consiste en una sal soluble de d-tubocurarina la cual es usada en el tratamiento de niños espásticos.

El gluconato de calcio y el gluconato de magnesio se han reportado como útiles ingredientes dentífricos. Se ha visto que el gluconato de magnesio es muy efectivo en el tratamiento de la dismenorrea.

El gluconato de efedrina, se ha preparado y ha sido reportado como menos irritante que el sulfato de efedrina, más comúnmente usado. Un preservativo para sangre animal y humana usa-

do para transfusiones, está hecho de ácido glucónico y aminas terciarias alifáticas. El monoalil ureido del ácido glucónico, es un efectivo diurético.

Usos en alimentación.

La introducción de pequeñas cantidades de ácido glucónico en grasas y aceites, tales como mantequilla, grasa de res, -- aceite hidrogenado de algodón y otros aceites y grasas vegetales y animales, trae como resultado productos más estables, los cuales son menos propensos a rancidez.

La glucono δ -lactona es un agente leudante muy efectivo porque su uso, causa una liberación más gradual de dióxido de carbono que cuando se usa ácido tartárico o sus sales. Por lo que se logra una actividad leudante, trayendo como resultado, productos de gran uniformidad. El uso de sales de calcio en la prevención del oscurecimiento de los productos hechos a base de papa indica otro uso posible para el gluconato de calcio.

Un suplemento alimenticio para el ganado vacuno que incluye gluconato de calcio se ha encontrado efectivo en la prevención de diarreas o en la cura de éstas, cuando afectan al ganado.

El gluconato de calcio ha demostrado ser una fuente satisfactoria de calcio en la dieta de pollos jóvenes y adultos, la calidad del huevo es mejorada cuando es incluida en la ración.

El Departamento de Salud Pública y Educación de los Estados Unidos, a través de la F.D.A. (Food and Drug Administration) publica listas de aditivos permitidos cuya inocuidad ha sido comprobada. En estas listas se llaman sustancias GRASS, (generally recognized as safe) y en la sección de agentes neutralizantes in-

cluye al gluconato de calcio; en la sección de secuestrantes también queda incluida esta sal. (26)

Usos industriales en general.

La versatilidad de los derivados del ácido glucónico indica su amplio uso en la industria en general.

La industria textil emplea ácido glucónico, glucono lactona y gluconato de amonio, en cantidad considerable como catalizadores ácidos porque no son tóxicos, son estables y tienen además un bajo promedio de corrosión.

En la industria de colorantes, se usan el gluconato de amonio y el ácido glucónico para obtener el medio ácido que se necesita para la manufactura de estos colorantes.

La necesidad de un catalizador ácido, inodoro y no tóxico para resinas coloidales ácidas usadas en la industria textil, ha llevado a la amplia aceptación de la glucono δ - lactona o al ácido glucónico para este propósito. La acción secuestrante del gluconato de sodio, ha sido también de interés para la industria textil. De valor particular es la habilidad secuestrante de este material por el fierro en medio alcalino. Esta propiedad indica un posible uso del gluconato de sodio en la prevención de la contaminación por fierro en el proceso de mercerizado.

En el campo de los detergentes se ha hecho considerable el uso del ácido glucónico y sus derivados, particularmente por su acción secuestrante en medio alcalino. Se encuentra como principal ingrediente de muchos limpiadores alcalinos (particularmente para el lavado de botellas), que contienen hidróxido de sodio;

ya que debido a este último, hay una tendencia a que se forme una película en el fondo de la botella muy difícil de quitar, especialmente cuando se usa agua dura. Este problema ha sido controlado por la adición de ácido glucónico o gluconato de sodio, en pequeñas cantidades, permitiendo con esto mayor eficiencia de operación.

El ácido glucónico es ampliamente empleado en la industria lechera para prevenir la formación de "Milkstone", y como un constituyente ácido en limpiadores de latas de leche. Se han desarrollado compuestos para el limpiado de metales que contienen ácido glucónico. Recientemente, se demostró que este ácido era efectivo en la prevención de beerstone, un problema que confrontan muchos cerveceros.

El gluconato de sodio y la glucono- δ -lactona se utilizan en la industria fotográfica para el preparado convencional de mezclas químicas, las cuales deben ser estables bajo condiciones atmosféricas variables. Además, la habilidad secuestrante de los gluconatos, es de valor en la industria fotográfica porque previene la precipitación de hidróxidos metálicos en baños alcalinos de revelado. El ácido glucónico o su lactona ha sido también usado en la preparación de platos para impresión litográfica.

El ácido glucónico y sus derivados, particularmente el gluconato de sodio han encontrado también aplicación en el tratamiento de aguas para evitar corrosión. Se han desarrollado operaciones de electroplateado usando ácido glucónico.

La adición de gluconato de sodio a pinturas solubles en agua para prevenir variaciones en el color, ha sido recomendada

también. Recientemente, gluconamidas sulfonadas, resultantes de la reacción de las glucono δ lactona con ácidos grasos y aminos se han propuesto como detergentes efectivos.

4o.- Azúcares reductores totales. (I)

Para esta determinación se tomaron 20 ml. del medio problema, se filtraron en embudos de vástago corto, cuando en el medio de cultivo se utilizó a la glucosa como fuente energética, del filtrado se tomó un mililitro y se llevó a un matraz aforado de 100 ml., obteniéndose así una dilución 1:100.

Quando se utilizó almidón como sustrato energético, se - centrifugaron 20 ml. de medio de fermentación a una velocidad de 3500 rpm. por 30 minutos y luego se filtraron de la misma manera descrita antes, un mililitro de este filtrado se diluyó con agua destilada a 100 ml. de esta dilución se tomaron 5 ml. y se procedió de igual manera que como se describe en el método I de Underkofler (19). Esta dilución se escogió tomando en cuenta que el medio tiene 20% de glucosa y si se considera que toda ella es de tectable, en 5 ml. habrá un máximo de 10 mg. en esta dilución, - hubo que diluir ya que cada mililitro del medio de fermentación tenía 200 ng. de glucosa y el método es sensible de 1 a 11 mg. en 5 ml. de problema. En el caso del uso de almidón, la dilución primera del filtrado fue de 1 : 50 y de allí, se tomaron 5 ml. y se procedió de igual modo que para el caso anterior.

5o.- Determinación de gluconato de calcio. (II)

Método de Zagrodzky (23)

Para determinar calcio soluble como gluconato de calcio, se procedió con la misma metodología que se utilizó para determinación de azúcares (dil 1: 100), cuando se trató de fermentaciones en las cuales se utilizó la glucosa como fuente de energía para los microorganismos. En el caso de fermentaciones emplean

do almidón (10%) se hizo una dilución 1:50.

Sin embargo para este método se tiene una sensibilidad de 1 a 50 mg. y por eso se tomaron con pipeta volumétrica 25 ml. - de la dilución, ya que en 25 ml. hay un máximo de 50 mg., evi-- tando así un error por la toma de una alícuota inadecuada.

6o.- Determinación de ácido glucónico. (III) (4)

En este caso, las muestras se trabajaron según lo ya descrito anteriormente en el método (I) hasta llegar a la dilu-- ción 1: 100 (2 mg./ml), de ésta, se tomó un ml. y se llevó a un volumen de 5 ml. con agua destilada (0.4 mg./ml). De esta últi-- ma dilución se tomaron 2 ml. en donde hay 0.8 mg. como máximo, todo esto, debido a que la sensibilidad del método es de 1 a - 1000 mg. en 2 ml. de muestra y la curva estandar se preparó de esa manera usando diluciones adecuadas.

7o.- Determinación de Peso de Micelio.

Cada matraz, después de terminada la fermentación y - de haberle extraído un volumen (20 ml) que sirve para los análi-- sis anteriores (4, 5, 6), se esterilizó a 121°C por 20 minutos - con el objeto de inactivar a los microorganismos.

Se filtró todo el contenido del matraz en un embudo büch-- ner de 20 cm. de diámetro aplicándole vacío y haciendo 3 lavados con agua destilada de 20 ml. cada uno al matraz y al micelio.

Con el papel filtro y sobre papel aluminio, se secó en es-- tufa a 60°C durante una hora, después de lo cual se pesó en ba-- lanza analítica, restando en cada caso, el peso del papel filtro conocido de antemano.

RESULTADOS

Azúcares reductores
 totales
 (Underkofler) (3)
 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.05N

Gluconato de Calcio
 (Versenato) (4)
 CaCl_2

Acido Glucónico
 (Espectrofotómetro) (4)

mg ml		mg ml		mg	% Absorbancia
1	1.1	5	0.7	50	0.068
2	1.9	10	1.25	100	0.14
3	2.7	15	1.9	250	0.36
4	3.5	20	2.5	500	0.73
5	4.3	25	3.1	1000	1.47
6	5.2	30	3.8		
7	6.0	35	4.4	Condiciones en espectrofotómetro:	
8	6.8	40	5.1	Nivel grueso	5
9	7.6	45	5.7	Nivel fino	~6
10	8.4	50	6.3	Diafragma	0.05
11	9.3			Milimicras	367

TABLA No.1 CURVAS ESTANDAR DE LAS DETERMINACIONES QUIMICAS.

EXPERIMENTO 1o.

Horas de Cultivo	pH	Azúcares reductores totales		Gluconato de Calcio		Acido Glucónico	
		mg/ml	gr/100	mg/ml	gr/100	mg/ml	gr/100
ACETOBACTER SUBOXYDANS.							
24	6.0	158.4	79.20	23.2	11.36	6.25	3.12
48	5.5	109.0	54.20	80.8	40.16	32.5	16.25
72	5.0	74.0	37.0	119.6	59.36	47.5	23.7
168	3.5	5.4	2.70	90.4	44.96	12.5	6.25
ASPERGILLUS NIGER.							
24	6.0	175.0	87.5	10.0	4.76	1.25	0.625
48	5.5	140.0	70.0	16.4	4.96	7.5	3.75
72	5.5	96.8	48.4	61.6	30.56	22.5	11.25
168	3.5	5.0	2.5	90.4	44.96	32.5	16.25

TABLA No. 2. FERMENTACION DEL MEDIO "A" CONTENIENDO GLUCOSA AL 20% E INOCULADO CON ACETOBACTER SUBOXYDANS Y ASPERGILLUS NIGER RESPECTIVAMENTE.

EXPERIMENTO 2o.

Horas de Cultivo	pH	Azúcares reductores totales		Gluconato de Calcio		Acido Glucónico	
		mg/ml	gr/100	mg/ml	gr/100	mg/ml	gr/100
ACETOBACTER SUBOXYDANS.							
36		20.0	10.0	71.2	35.41	87.0	43.5
48		0.5	0.25	87.2	43.41	94.5	47.23
60		6.5	3.25	76.4	38.01	86.5	43.25
72		11.2	5.60	84.0	41.81	82.0	41.0
84		0.0	0.0	76.4	38.01	82.0	41.0
ASPERGILLUS NIGER.							
36		118.0	59.0	32.0	15.81	8.5	4.25
48		109.0	54.5	19.6	9.61	12.5	6.25
60		67.0	33.5	55.2	26.41	103.5	51.7
72		47.6	23.8	76.4	38.01	34.2	17.1
84		5.0	2.5	36.0	17.81	34.2	17.1

TABLA No. 3. FERMENTACION DEL MEDIO "A" CONTENIENDO GLUCOSA AL 20% E INOCULADO CON ASPERGILLUS NIGER Y ACETOBACTER SUBOXYDANS RESPECTIVAMENTE.

EXPERIMENTO 3o.

Horas de Cultivo	pH	Azúcares reductores totales		Gluconato de Calcio		Acido Glucónico	
		mg/ml	gr/100	mg/ml	gr/100	mg/ml	gr/100
ACETOBACTER SUBOXYDANS.							
24	6.0	174.0	87.0	24.0	11.80	36.0	18.0
42	6.0	135.0	67.5	119.2	59.33	82.8	41.4
50	5.5	119.2	59.6	135.2	67.33	107.2	53.6
65	5.0	83.0	41.5	97.2	48.33	81.6	40.8
74	5.0	16.6	9.3	83.6	41.53	80.4	40.2
138	3.5	15.6	7.8	54.8	27.13	33.4	16.7
162	3.5	10.0	5.0	40.2	18.13	25.0	12.5
186	3.5	14.0	7.0	31.2	15.33	15.4	7.7
210	3.5	1.8	0.9	17.2	8.33	12.0	6.0
218	3.5	0.0	0.0	17.2	8.33	4.6	2.3
ASPERGILLUS NIGER.							
24	6.0	176.0	88.0	10.83	5.31	4.6	2.3
42	6.0	144.0	72.0	16.71	8.25	9.2	4.6
50	6.0	130.0	65.0	20.45	10.12	11.2	5.6
65	5.5	107.2	53.6	26.77	13.28	15.6	7.8
74	5.5	31.8	15.9	35.23	17.51	13.6	9.3
138	5.5	10.0	5.0	99.43	49.61	94.0	47.0
162	5.0	8.0	4.0	73.43	36.61	19.6	9.8
186	5.0	6.0	3.0	22.03	10.91	9.4	4.7
210	3.5	0.0	0.0	6.63	3.21	1.0	0.5
218	3.5	0.4	0.2	2.03	0.91	0.0	0.0

TABLA No. 4. FERMENTACION DEL MEDIO "A" CONTENIENDO GLUCOSA AL 20%
E INOCULADO CON ASPERGILLUS NIGER Y ACETOBACTER SUBOXYDANS
RESPECTIVAMENTE.

EXPERIMENTO 4o.

Horas de Cultivo	pH	Azúcares reductores totales		Gluconato de Calcio		Acido Glucónico	
		mg/ml	gr/100	mg/ml	gr/100	mg/ml	gr/100
8	6.0	155.0	77.5	4.0	1.66	5.0	2.5
20	6.0	131.0	65.5	20.0	9.66	30.0	15.0
32	5.5	121.0	60.5	35.2	17.26	42.0	21.0
44	5.0	103.6	51.8	44.2	22.6	39.5	19.75
56	4.5	96.4	48.2	113.2	56.26	79.5	37.25
70	3.5	47.6	23.8	103.2	51.26	70.0	35.0
78	3.5	13.0	6.5	160.0	79.66	86.5	43.25
94	3.5	15.2	7.6	166.4	82.86	77.5	38.75
160	3.5	3.2	1.6	109.2	54.26	77.5	38.75
180	3.5	3.2	1.6	106.0	52.76	70.5	38.25

TABLA No. 5. FERMENTACION DEL MEDIO "A" CONTENIENDO GLUCOSA AL 20% INOCULADO CON CULTIVOS ASOCIADOS DE ASPERGILLUS NIGER Y ACETOBACTER SUBOXYDANS.

EXPERIMENTO 5o.

Horas de Cultivo	pH	Azúcares reductores totales		Gluconato de Calcio		Acido Glucónico		Peso de Micelio	
		mg/ml	gr/100	mg/ml	gr/100	mg/ml	gr/100	gr/100	ml
24	6.0	32.40	16.2	38.8	19.25	17.5	8.75	5.15	
48	6.0	60.0	30.0	58.4	29.05	48.7	22.35	5.23	
72	5.0	79.6	39.8	70.8	35.25	42.5	21.25	9.11	
96	5.0	10.0	5.0	29.2	14.45	23.75	11.87	10.37	
120	4.0	12.6	6.3	4.0	1.85	12.5	6.25	9.06	
144	4.0	12.6	6.3	26.10	12.85	12.25	6.25	10.71	
168	3.5	2.0	1.0	16.4	8.05	8.5	4.3	19.18	
192	3.5	2.0	1.0	4.0	1.85	10.0	5.0	11.0	
216	3.5	3.0	1.5	6.8	3.25	0.0	0.0	15.30	

TABLA No. 6. FERMENTACION DEL MEDIO "A" CONTENIENDO ALMIDON SOLUBLE
AL 20% HIDROLISIS DE ALMIDON POR ASPERGILLUS NIGER.

EXPERIMENTO 6o.

Horas de Cultivo	pH	Azúcares reductores totales		Gluconato de Calcio		Acido Glucónico		Peso de Micelio	
		mg/ml	gr/100	mg/ml	gr/100	mg/ml	gr/100	gr/100	ml
24	5.0	72.0	36.0	13.6	6.65	5.0	2.5	1.95	
48	5.0	121.0	60.5	36.0	17.85	17.5	8.75		
72	5.0	84.0	42.0	43.6	22.65	35.0	17.5	8.89	
96	5.0	69.6	34.8	32.0	15.85	26.25	13.12	7.66	
120	5.5	72.0	36.0	6.8	3.25	10.0	5.0	6.86	
144	4.5	110.0	55.0	32.0	15.85	7.0	3.5	7.98	
168	5.0	55.0	27.5	32.0	15.85	0.0	0.0	19.78	
192	4.5	25.0	12.5	20.0	9.85	17.5	8.75	16.91	
216	5.5	18.0	9.0	10.0	4.85	0.0	0.0	22.0	

TABLA No. 7. FERMENTACION DEL MEDIO "B" CONTENIENDO GLUCOSA AL 5%
HIDROLISIS DE ALMIDON POR ASPERGILLUS NIGER.

EXPERIMENTO 7o.

Horas de Cultivo	pH	Azúcares reductores totales		Gluconato de Calcio		Acido Glucónico	
		mg/ml	gr/100	mg/ml	gr/100	mg/ml	gr/100
9	6.5	0	0	13.6	6.8	3.5	1.75
45	6.0	8.0	4.2	7.2	3.8	4.87	2.43
96	6.0	13.0	6.5	4.0	2.0	20.5	10.0
105	6.0	20.0	10.0	16.0	8.0	101.2	21.85
125	6.0	13.0	6.5	13.6	6.8	8.5	4.25
192	6.0	0.2	0.1	36.0	18.0	0.625	0.312
210	6.0	10.0	5.0	26.0	13.0	17.0	8.5
240	4.5	3.6	1.8	10.0	5.0	9.5	4.75

TABLA No. 8. FERMENTACION DEL MEDIO "B" CONTENIENDO ALMIDON AL 20%
INOCULACION ASOCIADA DE ASPERGILLUS NIGER Y ACETOBACTER SUBOXIDANS.

EXPERIMENTO 8o.

Horas de Cultivo	pH	Azúcares reductores totales	Blanco: 4.0g/100	Gluconato de Calcio		Acido Glucónico		Peso de Micelio	
		mg/ml	gr/100	mg/ml	gr/100	mg/ml	gr/100	gr/100	ml
24	5.5	30.0	15.0	26.0	12.8	1.0	0.5	4.297	
48	5.5	55.0	27.5	58.0	28.8	15.0	7.5	5.148	
72	5.5	8.0	4.0	112.4	56.0	88.5	44.25	9.95	
96	5.5	1.0	6.5	74.0	36.8	34.75	17.37	11.365	
144	6.5	2.4	1.2	22.0	10.8	34.0	17.0	23.47	
192	7.0	0.0	0.0	2.0	0.8	21.0	10.5	32.02	
216	6.5	0.0	0.0	2.0	0.8	1.25	0.625	35.26	
240	6.5	2.4	1.2	0.0	0.0	1.0	0.5	26.97	

TABLA No. 9. FERMENTACION DEL MEDIO "C" CONTENIENDO AIMIDON SOLUBLE.

INOCULACION ASOCIADA DE ASPERGILLUS NIGER Y ACETOBACTER SUBOXYDANS.

EXPERIMENTO 9o.

Horas de Cultivo	pH	Azúcares reductores totales	Blanco: 25g/100	Gluconato de Calcio		Acido Glucónico		Peso de Micelio	
		mg/ml	gr/100	mg/ml	gr/100	mg/ml	gr/100	gr/100	ml
24	5.5	208.0	104.0	47.2	23.5	39.0	19.5	6.73	
48	4.5	42.4	21.2	86.0	42.9	77.5	38.75	7.43	
72	5.5	50.0	25.0	73.2	36.5	28.25	14.125	11.23	
96	4.8	1.0	0.5	108.0	53.9	40.0	20.0	12.23	
144	5.5	0.6	0.3	44.0	21.9	25.0	12.5	14.84	
192	5.5	0.0	0.0	12.0	5.9	0.5	0.25	16.87	
216	5.5	0.0	0.0	8.8	4.3	0.0	0.0	25.78	
240	5.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	26.97	

TABLA No. 10. FERMENTACION DEL MEDIO "C" CONTENIENDO 1 ML. DE HCl.

INOCULACION ASOCIADA DE ASPERGILLUS NIGER Y ACETOBACTER SUBOXYDANS.

EXPERIMENTO 10o.

Horas de Cultivo	pH	Azúcares reductores totales	Blanco: 1.4g/100	Gluconato de Calcio		Acido Glucónico		Peso de Micelio	
		mg/ml	gr/100	mg/ml	gr/100	mg/ml	gr/100	gr/100	ml
24	5.5	57.6	28.8	54.8	27.0	6.25	3.13	15.14	
48	5.5	98.0	49.0	54.8	27.0	6.5	3.38	15.148	
72	4.5	68.0	34.0	61.6	30.4	6.25	3.13	16.273	
96	5.5	57.6	28.8	71.2	35.2	0.05	0.0	19.51	
168	5.5	10.0	5.0	87.6	43.4	8.75	3.63	21.68	
192	5.5	0.0	0.0	26.0	12.6	5.75	2.63	24.584	
200	5.5	0.0	0.0	26.0	12.6	0.0	0.0	25.30	
216	5.5	0.0	0.0	16.4	7.8	0.0	0.0	27.49	
240	5.5	0.0	0.0	16.4	7.8	0.0	0.0	28.55	

TABLA No. 11. FERMENTACION DEL MEDIO "D".

INOCULACION ASOCIADA DE ASPERGILLUS NIGER Y ACETOBACTER SUBOXYDANS.

EXPERIMENTO 11o.

Horas de Cultivo	pH	Azúcares reductores totales	Blanco: 78g/100	Gluconato de Calcio		Acido Glucónico		Peso de Micelio	
		mg/ml	gr/100	mg/ml	gr/100	mg/ml	gr/100	gr/100	ml
24	5.0	52.4	26.2	78.0	38.6	23.75	8.75	13.84	
48	5.0	72.0	36.0	87.2	43.2	27.5	10.63	16.071	
72	5.0	60.0	30.0	96.8	48.0	27.5	10.63	18.323	
96	5.0	47.6	23.8	96.8	48.0	14.0	3.88	19.045	
168	5.5	18.0	9.0	103.2	51.2	124.3	59.13	20.332	
192	4.5	6.0	3.0	61.6	30.4	20.0	6.88	25.83	
200	5.0	0.2	0.1	38.8	19.0	0.0	0.0	27.90	
216	4.5	0.2	0.1	26.0	12.6	0.0	0.0	32.38	
240	5.5	0.0	0.0	26.0	12.6	0.0	0.0	33.26	

TABLA No. 12. FERMENTACION DEL MEDIO "E".

INOCULACION ASOCIADA DE ASPERGILLUS NIGER Y ACETOBACTER SUBOXYDANS.

M A T E R I A L

Y

M E T O D O S

MATERIAL Y METODOS.

I.- MATERIAL UTILIZADO.

Cristalería en general (matraces erlenmeyer, embudos, tubos, vasos de precipitados, probetas, etc.

Tubos Pyrex de 25 x 100 mm. (20)

Matraces de 250 ml. bafleados (18)

Autoclave marca Marsh Instrument Co. (160°-1.5Kg/cm²)

Potenciómetro marca Beckmann. (1 - 14 pH)

Agitador rotatorio) marca Leland (24 matraces) 160rpm

Centrífuga) marca Wifug (0 -3500 rpm)

Bomba de Vacío marca H.O. Velman.

Estufa Robertshaw (0° - 300°c)

Espectrofotómetro) marca Hitashi-Elmer Coleman 631
UV-Vis (190-1000 mμ)

II.- MATERIAL BIOLÓGICO.

(Las cepas utilizadas) en este trabajo fueron:

Acetobacter suboxydans ATCC. 621 H

Aspergillus niger. Cepa proporcionada por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química de la U.N.A.M.

III.- MEDIOS DE CULTIVO.

El medio de Conservación, que se usó tanto para el hongo como para la bacteria, tiene la composición química siguiente:

Glucosa	3 g.
Mg SO ₄ . 7H ₂ O	0.01 g.
KH ₂ PO ₄	0.2 g.
Extracto de Levadura	0.5 g.

Peptona	0.2 g.
CaCO ₃	0.6 g.
Agar	2.5 g. *
Agua Cbp	100 ml.
pH	5 - 6

Se funde en matraces de 250 ml. a 5 lbs. 10 minutos. Se vacía a tubos, en cantidad de 10 ml. y se esterilizan a 15 lbs. de presión durante 15 minutos. Los tubos se incuban en estufa a 28°C. por 24 hs. para el control de su esterilidad.

El medio que se usó como semilla, (3) tiene la misma com posición química que el anterior con las siguientes modificaciones:

No contiene agar y por lo tanto no es necesario fundir en autoclave, sino solamente calentar hasta disolución para luego vaciar a matraces los que son esterilizados.

El carbonato de Calcio debe esterilizarse aparte en tubos que contienen 0.5 g. de la sal en 20 ml. de agua, incorporándose al medio proporcionalmente cuando se hace la inoculación ya sea con el Aspergillus o con Acetobacter.

Medio de Fermentación (A)

Las cantidades para el medio de fermentación son:

Glucosa	200 g.
Agua de cocimiento de maíz.	37 ml.
Mg. SO ₄ .7H ₂ O	0.165 g.
KH ₂ PO ₄	0.198 g.
Urea	0.105 g.
CaCO ₃	30.0 g. (Esterilizado aparte)

$(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$	0.422 g.
Octadecanol.	10.0 g.
Agua	1000 ml.

Se ajusta el pH a \pm 6.0

Se vacían 100 ml. en matraces bafleados de 250 ml. con tapones de algodón según Solomons (18) y se esterilizan a 121°C durante 20 minutos. Se dejan 24 hs. a 28°C para control de esterilidad, antes de proceder a su inoculación. Este medio fue utilizado en los primeros experimentos, al probar a la glucosa como material oxidable.

Otro medio de fermentación (B) fue:

Almidón	200 gr.
Agua de cocimiento de maíz.	37 ml.
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.165 g.
KH_2PO_4	0.198 g.
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.50 g.
CaCO_3	30.0 g. (esterilizado aparte)
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0.422 g.
Octadecanol	10 g.
Agua	1000 ml.

Se ajusta el pH a \pm 6.0

Se distribuye en matraces bafleados de 250 ml, poniendo 100 ml. en cada uno con tapones según Solomons (18) y se esteriliza a 121°C por 20 minutos, se dejan en estufa a 28°C durante 24 hs. para control de esterilidad antes de inocularlos con la semilla.

Otro medio de fermentación (C) fue:

Almidón	100 gr.
Agua de cocimiento de maíz.	37 ml.
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.165 g.
KH_2PO_4	0.198 g.
$(NH_4)_2SO_4$	0.50 gr.
$CaCO_3$	30.0 g. (esterilizado aparte)
$(NH_4)_2HPO_4$	0.422 g.
Octadecanol	10 g.
Agua	1000 ml.

Se ajusta el pH a ± 6.0

También se distribuye en matraces bafleados de 250 ml. - colocando 100 ml. en cada uno, se esteriliza a $121^{\circ}C$ por 20 minutos y se deja en estufa a $28^{\circ}C$ para control de esterilidad por lo menos 24 horas.

Este medio de fermentación (C) tuvo dos modificaciones en la parte final del trabajo las cuales son:

Contiene en un caso los mismos reactivos en iguales cantidades, pero está adicionado de 0.5 ml. de ácido clorhídrico concentrado en cada matraz, medio que se llamó D, y el segundo caso o medio de fermentación E también tiene iguales cantidades del medio C, pero está adicionado de 0.7 ml. de ácido clorhídrico -- concentrado para cada matraz conteniendo 100 ml. de medio de fermentación.

IV.- DETERMINACIONES QUIMICAS.

1.- "DETERMINACIONES DE AZUCARES REDUCTORES
TOTALES".

UNDERKOFER (19)

Reactivos:

- I.- Sol. que contiene KI al 12.5% y $K_2C_2O_4 \cdot H_2O$ al 25%
II.- Sol. de H_2SO_4 7.5 N.
III.- Sol. estandar de $Na_2S_2O_3$ al 0.05 N.
IV.- Indicador de almidón que contiene almidón soluble al
1% en una solución saturada de NaCl.
V.- Reactivo de Underkofler.

$Cu SO_4 \cdot 5 H_2O$ 37.5 g/l

Sal de Rochelle

$NaK C_4H_4C_6 \cdot 4 H_2O$ 125.0 g

$Na_2 CO_3$ (anhidro) 53.0 g

KI 1.0 g

$Na_2 SO_4$ (anhidro) 50 g.

KIO_3 3.5665 (exactamente)

Solución acuosa de NaOH aproximadamente saturada pa-
ra ajustar el pH-a 9.48

Reactivo de Underkofler.

Preparación:

El carbonato de sodio y la sal de la Rochelle se disuel-
ven en 300 ml. de H_2O destilada después de lo cual el sulfato de
cobre disuelto en 500 ml. de agua, es agregado con agitación con-
tinua de tal manera que no se desprenda bióxido de carbono. El -
uso de un embudo con la salida bajo la superficie es muy útil -
(Solución carbonato-tartrato).

Se agrega el Yoduro de potasio y el tiosulfato de sodio agitando hasta que se disuelva, se lleva el volumen a 960 ml. con H₂O destilada.

Se añade la solución de NaOH lentamente con agitación, - hasta que el pH alcance el valor de 9.48.

El pH se determina en un potenciómetro con electrodos de vidrio a 25°C. Las muestras usadas para tomar el pH siempre se regresan a la solución madre.

Esta solución se calienta a ebullición y es hervida suavemente por 10 minutos en un recipiente cerrado. Se enfría a 20°C.

El iodato de potasio pesado exactamente se agrega, se disuelve completamente y el volumen se afora a un litro en matraz volumétrico.

El reactivo recientemente preparado siempre contiene materia suspendida, por lo tanto la solución se deja en un frasco Pyrex por lo menos una semana. Si se deja en recipientes hechos de cristal blando el óxido cuproso se formará continuamente como un depósito alterando la mezcla.

Después que la materia suspendida se precipita, la solución clara se filtra o se sifonea y se guarda en botella Pyrex. Así se evita en lo máximo la autorreducción.

Procedimiento.

Sensibilidad: 1 a 10 mg. en 5 ml. de muestra Problema.

Exactamente 5 ml. de reactivo de Underkofler se vacían a un tubo Pyrex de 25 x 100 mm. Se agregan 5 ml. de muestra problema y se mezcla agitando. Se coloca un tapón de hule con un capi-

lar y se pone a baño María por treinta minutos.

Se enfrían a 30°C. en baño frío. Se añade 2 ml. de la solución de Ioduro oxalato de Potasio, se agita para mezclar. Se pone un ml. de ácido sulfúrico 7.5 N (II) con el tubo inclinado muy lentamente para que no haya desprendimiento rápido de CO₂.

Se dejan en reposo para que todo el óxido cuproso se disuelva y la solución esté clara.

El exceso de I₂ se titula con la solución de tiosulfato de sodio 0.05 N. usando indicador de almidón cerca del punto final.

Se corre un blanco usando 5 ml. de agua como muestra -- prueba.

La cantidad de miligramos de azúcar por 5 ml. de solución se obtiene de una curva estandar preparada de antemano.

II.- DETERMINACION DE CALCIO SOLUBLE POR EL
METODO DEL VERSENATO (14, 22)

Sensibilidad: 1 a 50 mg.

Alicuota: 25 ml. en 50 ml. de solución.

Reactivos:

1.- Solución amortiguadora

Cloruro de amonio 67.5 g.

Solución concentrada de
amoníaco 570 g.

Se afora un litro con agua destilada.

2.- Solución de Verseno:

Sal disódica del ácido etilen-diaminotetra-acético 3.7g

Cloruro de Magnesio hexahidratado 0.1 g.

Llevar a 1 litro con agua destilada.

3.- Indicador

Eriocromo negro T - 0.5 g. se diluyen en 100 ml. de
etanol o dietil amina.

4.- Titulante.

Solución patrón de calcio que corresponde 1 miligra
mo por mililitro.

Carbonato de calcio anhidro. 1.785 g.

Como precaución se seca el carbonato de calcio a
100°C por 2 horas y se disuelve con 75 ml. de ácido Clorhídrico -
diluido al 5% y se completa a 1 l. con H₂O destilada.

Procedimiento:

A los 50 ml. del medio problema, se le agrega 1 ml. de so
lución amortiguadora (1) después se añade un exceso(20 ml) de la
sal disódica del EDTA, se pone el indicador (5 gotas) y se titula

el exceso de calcio con la solución estandar de calcio (4)

Una precaución que debe tomarse en cuenta al utilizar es te método es que el indicador ya disuelto, dura muy poco tiempo, es inestable, dando un vire poco claro, de azul a morado, en lugar de azul a rojo como es originalmente, por lo tanto, debe prepararse poca cantidad de este reactivo y guardarlo una semana, como máximo, para evitar este problema.

III.- METODO PARA CUANTIFICACION DE GLUCONATO DE
CALCIO OBTENIDO POR MEDIO DE FERMENTACION. (4)

Reactivos.

- a) Solución estandar de gluconato de calcio en agua a la concentración de 1 g/ml. Mediante diluciones adecuadas, se obtienen las concentraciones de 50, 100, 250, 500 microgramos/ml.
- b) Solución de Cloruro férrico hexahidratado al 0.2% - en agua destilada, (se prepara para cada determinación)

Procedimiento.

En una probeta se ponen 2 ml. de solución estandar de las diferentes concentraciones, se les agregan 4 ml. de agua destilada y 2 ml. de solución de cloruro férrico. Cada lectura de la muestra problema debe ser hecha contra un blanco preparado al mismo tiempo, porque el desarrollo del color del cloruro férrico en solución, aumenta continuamente haciendo las lecturas erróneas cuando se emplea solo un blanco.

Después de que el autor confirmó cromatográficamente, durante la fermentación, la ausencia de sustancias que podrían interferir con el cloruro férrico, propuso este método para la determinación del ácido glucónico, de su lactona y de su sal de calcio, producidos por fermentación, utilizándolos adecuadamente diluidos. En esta determinación es necesario restar de la densidad óptica del ácido glucónico, la densidad óptica relativa del color propio del líquido de fermentación. Para esto, de cada medio fer-

mentado se toman 2 ml. y se les agrega 6 ml. de agua y se lee en el espectro-fotómetro a 367 milimicras, con lámpara de Tungsteno, ajustando el aparato con agua destilada. Esta densidad óptica es debida al color propio de la solución. Es de valor mínimo y para cada dilución problema, debe ser restada del valor de la densidad óptica que se obtenga.

Cuando se preparó la curva estandar, se observó cierta variación en los resultados por el continuo cambio de color del reactivo en las muestras, por lo que se decidió controlar el tiempo a partir de la preparación del reactivo.

Con objeto de no preparar los numerosos blancos indicados en el método, se hicieron pruebas con diluciones conocidas de ácido glucónico pero en agua destilada, llevando a cabo el método, con tiempo controlado se vió que si se leía en el espectrofotómetro, entre 10 a 15 minutos después de preparado el reactivo, no había prácticamente variación en las lecturas, por lo tanto el método se modificó en la siguiente manera:

Se disolvió el cloruro férrico, (después de haberlo pesa do en Balanza Analítica) en 100 ml. de agua destilada, transcurridos 5 minutos, se agregaron 2 ml. de este reactivo a cada muestra, (tres problemas y un blanco). Se esperó hasta llegar a los 10 minutos de preparado el reactivo y se procedió a hacer las lecturas dentro de los próximos 5 minutos siguientes (tiempo total 15 minutos)

Para un segundo conjunto de análisis (tres muestras problema y un blanco) se repitieron íntegros los pasos anteriores.

De esa manera se hicieron todos los análisis correspon-

dientes al ácido glucónico.

MÉTODOS DE TRABAJO.

1o.- Conservación de las cepas.

Después de algunos ensayos, se determinó usar el mismo medio de conservación, tanto para el hongo como para la bacteria, una vez preparado, se distribuyó en tubos de 15 x 150 mm. se esterilizaron 15 minutos a 121°C, se inclinaron y dejaron en la estufa por lo menos 24 hs. como prueba de esterilidad, después de lo cual, estaban listos para sembrarse. El Aspergillus niger se resembró cada mes por lo menos y el Acetobacter suboxydans, - cada 10 días para conservarse en buenas condiciones. A las 24 hs. en el caso del Acetobacter se observó una fluorescencia característica en la superficie de crecimiento, y en los cultivos de 2 semanas en adelante se pudo observar la formación de cristales (2). En el Aspergillus se observó en los cultivos de bastante tiempo la formación de esporas, que al final le dieron un color completamente negro.

2o.- Preparación de Semilla.

El medio de semilla se preparó en tubos de 15 x 200 conteniendo 15 ml. de este medio. Se esterilizaron a 121°C por 15 minutos. Estos tubos se inocularon respectivamente con el cultivo de Acetobacter suboxydans y Aspergillus niger, se pusieron en la estufa a temperatura de 30°C. durante 24 horas. El contenido de estos tubos se vació a matraces bafleados que llevaban 150ml. de medio de semilla, además se adicionó una suspensión de 0.5 g. de carbonato de calcio en 10 ml. de agua estéril. (10). Los matraces se colocaron en la agitadora rotatoria por 48 horas, lo-

lográndose con ello un buen crecimiento de cada microorganismo.

30.- Fermentación.

El medio de fermentación (A, B, C o D) se colocó en matraces bafleados de 250 ml. de capacidad, en cantidad de 100 ml. en cada uno de ellos. Se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos y se dejó en estufa a 28°C. durante 24 horas para hacer la prueba de esterilidad y proceder a inocular.

Cada matraz conteniendo el medio de fermentación estéril, se inoculó con 5 ml. del medio de semilla, en el caso de Aspergillus niger y con 10 ml. del medio de semilla, cuando se trató del medio con Acetobacter.

El carbonato de calcio se preparó haciendo una suspensión acuosa al 30% y se esterilizó por separado a 121°C. por 20 minutos. De esta suspensión se tomaron 10 ml. para inocular los matraces conteniendo el medio de fermentación. Estos matraces se agitaron a una velocidad de 160 rpm. durante el tiempo que fue necesario, sacándose un matraz cada 24 horas o en menor tiempo según el caso y se procedió a su análisis.

Los diferentes experimentos efectuados fueron los siguientes:

10.- En el primer experimento se preparó el medio de fermentación A y en condiciones de esterilidad se inocularon ocho matraces con semilla de Aspergillus niger y a otros ocho matraces se les inoculó semilla de Acetobacter suboxydans, se incubaron a 28°C. en agitación a 160 rpm. y se fueron sacando de la fermentación por pares, cada 24 hs. durante tres días, los cuatro días siguientes, no fue posible hacer este muestreo, sacándose los últi

mos cuatro matraces el séptimo día de fermentación.

20.- Con el objeto de obtener más detalles de esta fermentación durante el lapso que no se abarcó en la primera, la segunda corrida, se dirigió a los cuatro días faltantes, siguiendo el mismo procedimiento de la primera, utilizando el mismo medio e inóculos por separado de Acetobacter suboxydans y de Aspergillus niger muestrándose en la misma forma a partir del tercer día de fermentación, hasta el séptimo.

30.- El tercer experimento consistió en redondear los datos de los dos casos anteriores, utilizándose dieciocho matraces, procediéndose de igual manera con respecto al medio de fermentación A y a las semillas de Acetobacter suboxydans y Aspergillus niger, pero sacándose matraces desde el primer día hasta el 90. día cada 24 horas, para tener una idea general sobre el comportamiento de ambos microorganismos en esas condiciones de fermentación.

40.- Para el cuarto experimento y tratando de obtener una acción sinérgica en la obtención del ácido glucónico con el uso combinado de los dos microorganismos, se preparó medio de fermentación A y semillas tanto de Acetobacter suboxydans como de Aspergillus niger, inoculándose los dos microorganismos juntos a veinte matraces, los que se pusieron en agitación a 28°C y se fueron sacando por pares cada 24 hs. para efectuar su análisis durante un lapso de 10 días.

50.- El siguiente experimento diseñado con el propósito de estudiar el comportamiento del Aspergillus niger al desarrollarse en un medio conteniendo almidón y para cuantificar la hi

drólisis que produciría en este sustrato, consistió en preparar 18 matraces con el medio de fermentación B, se inocularon en condiciones estériles con semilla de Aspergillus niger y se incubaron con agitación; sacándose cada 24 hs. matraces por pares por un lapso de nueve días para analizar las muestras, de acuerdo a los métodos ya indicados (I, II, III).

6o.- El experimento anterior fue la base para realizar otro parecido, consistente en usar el mismo medio de fermentación B adicionado de glucosa al 5% repartido en 18 matraces que se inocularon con semillas de Aspergillus niger, se incubaron a 28°C con agitación de 160 rpm. y se analizaron también cada 24 hs. por espacio de nueve días, siguiendo los métodos (I, II, III).

7o.- Con los datos anteriores se proyectó este experimento en el que utilizando el medio de almidón B, se trató de estudiar el efecto producido por la acción de los microorganismos al fermentar juntos este medio. Los matraces se inocularon el primer día con semilla de Aspergillus niger, se incubaron en agitación y al tercer día se les adicionó la semilla de Acetobacter suboxydans; este orden de inoculación tuvo como objetivo el de que el hongo hidrolizara el almidón para que la bacteria pudiera utilizar estos azúcares del medio hidrolizado. Los matraces se analizaron cada 24 hs. por un lapso de diez días. Durante este experimento se observó interferencia en los análisis, debido al almidón residual gelatinizado. Aunque es de hacerse notar que en esta fermentación se utilizó almidón común y corriente.

8o.- Debido a lo anterior, en esta fermentación utilizamos el mismo almidón para la preparación del medio de fermentación C, (almidón soluble Fluka Stärke Ioslich purum), inoculan-

do los matraces con semilla de *Aspergillus* sp. el primer día, in cubando en agitación y al tercer día se inoculó también con semilla de *Acetobacter* sp, se incubó en agitación y se hizo el análisis de los matraces cada 24 horas por un lapso de diez días.

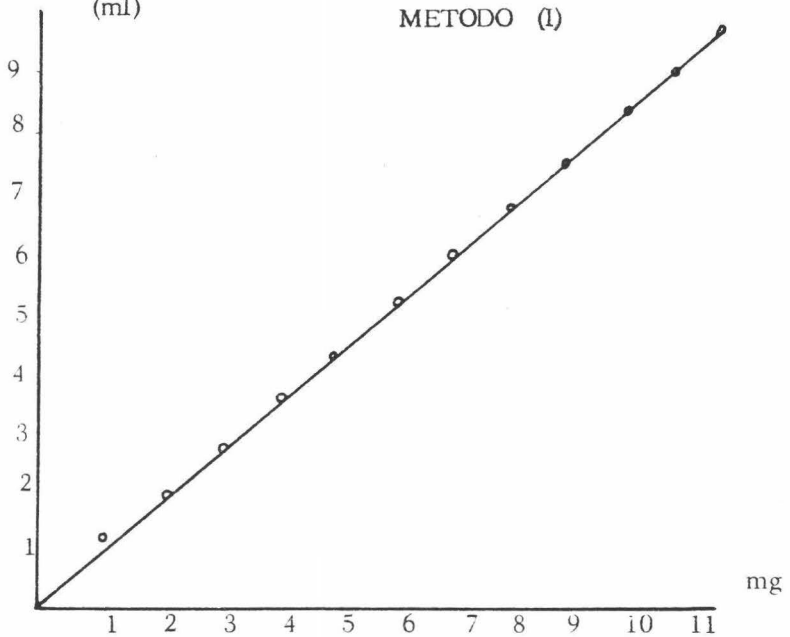
9o.- La siguiente fermentación fué semejante a la anterior, se utilizó el medio C adicionado de un mililitro de ácido clorhídrico concentrado Q.P., por matraz, pero usando almidón común y corriente, el ácido clorhídrico provocó una hidrólisis de este almidón y rompimiento del gel que se forma con ésto logramos obtener una mejor agitación y aeración del medio, además de evitar la interferencia del almidón al llevar a cabo las determinaciones analíticas.

10o.- Se utilizó el medio de fermentación D, adicionado de almidón común y corriente y para provocar su hidrólisis, se adicionó 0.5 ml. de clorhídrico concentrado a cada matraz. El medio de cultivo se inocula desde el primer día con la semilla de *Aspergillus* sp. y después de tres días de incubación con la semilla de *Acetobacter* sp. Los matraces se incubaron en agitación y cada 24 hs. se tomaron muestras para su análisis, llevándolos a cabo durante un período de 10 días.

11o.- En esta última fermentación se utilizó el medio de fermentación E el cual se inoculó primero con semilla de Aspergillus niger, se incubó a 28°C. agitándose y al tercer día se inoculó con la semilla de *Acetobacter* sp. continuándose la incubación y agitación durante diez días, cada 24 hs. se sacaron matraces por pares para proceder a su análisis. (I, II, III).

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.05N
(ml)

METODO (I)



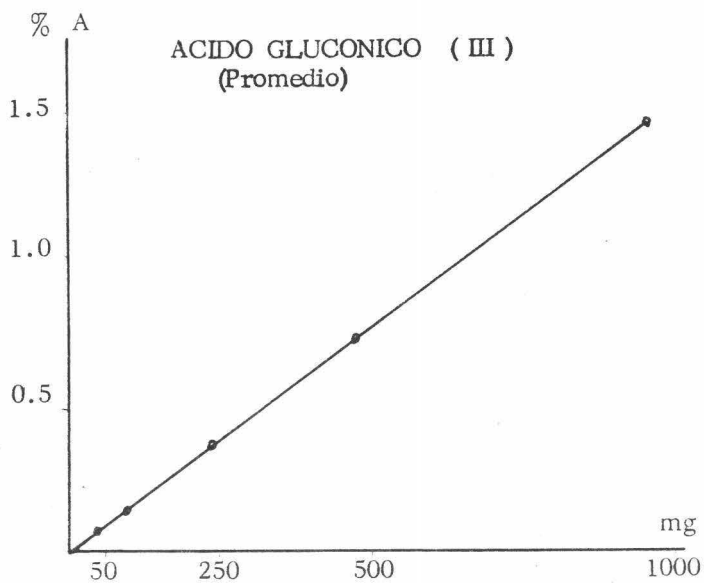
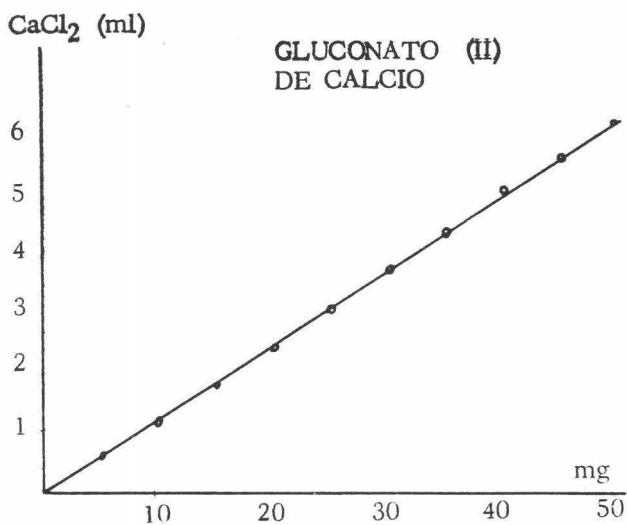
GRAFICA No 1

CURVA ESTANDAR DE GLUCOSA PARA LA DETERMINACION

DE AZUCARES REDUCTORES TOTALES.

(Método de Underkofler I). TABLA No 1'

GRAFICA 2



GRAFICA 3

CURVAS PATRON UTILIZADAS EN LA DETERMINACION
DE ACIDO GLUCONICO. (Métodos II, III). TABLA No 1.

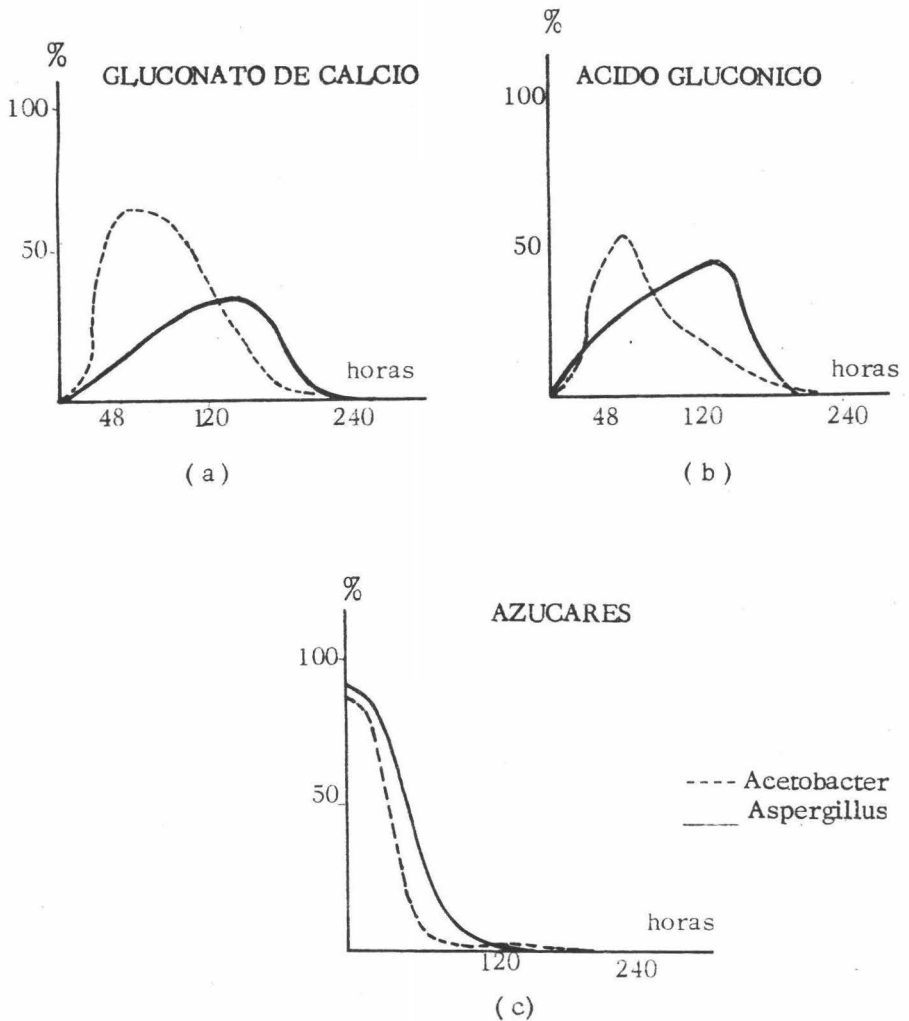


FIGURA 1
 PRODUCCION DE GLUCONATO DE CALCIO, ACIDO GLUCONICO,
 Y CONSUMO DE AZUCARES POR *Aspergillus niger* Y *Acetobacter*
suboxidans AL SER INOCULADOS POR SEPARADO EN EL MEDIO
 DE FERMENTACION A (Glucosa al 20%). EXPERIMENTO 3.

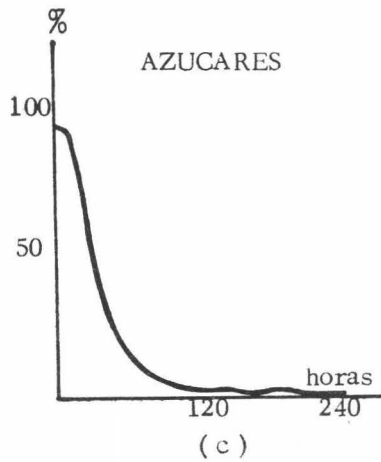
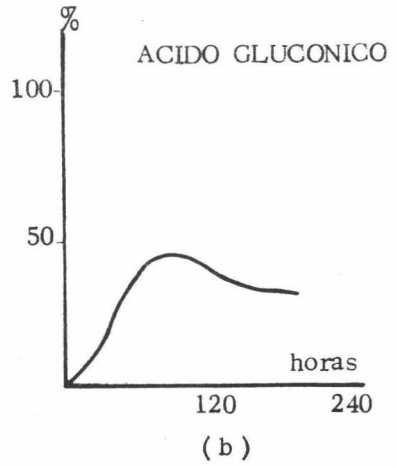
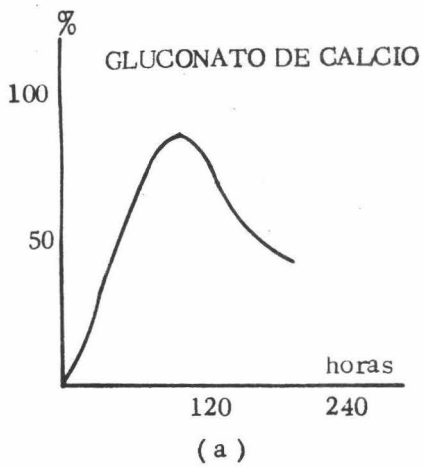


FIGURA 2
 CULTIVO SIMULTANEO DE *Aspergillus niger* y *Acetobacter suboxidans* EN EL MEDIO DE FERMENTACIÓN "A"

EXPERIMENTO 4.

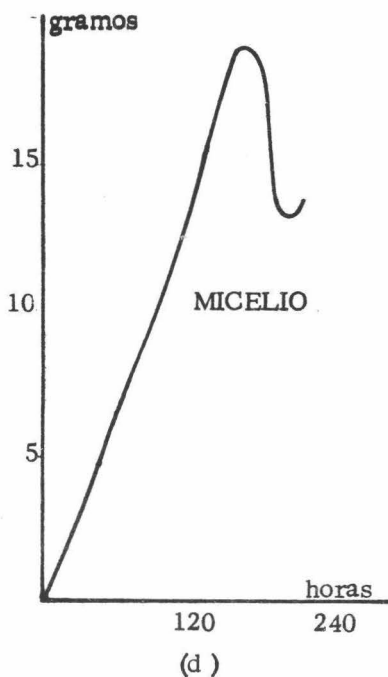
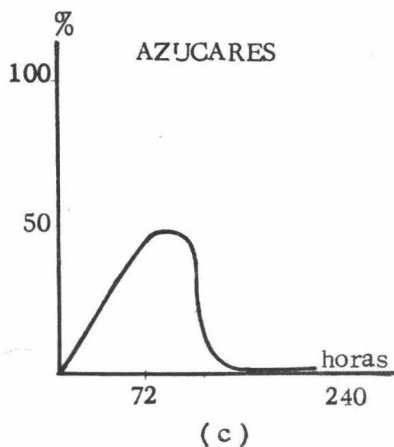
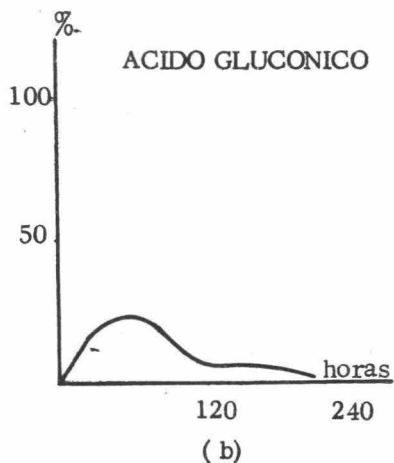
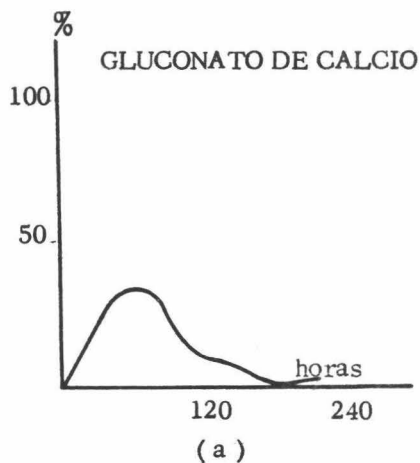
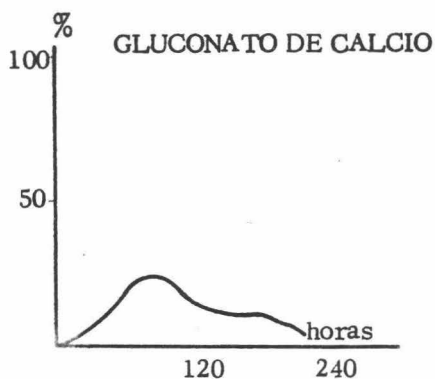
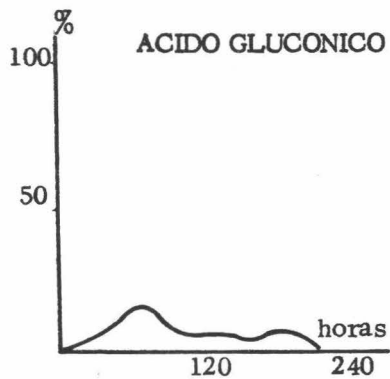


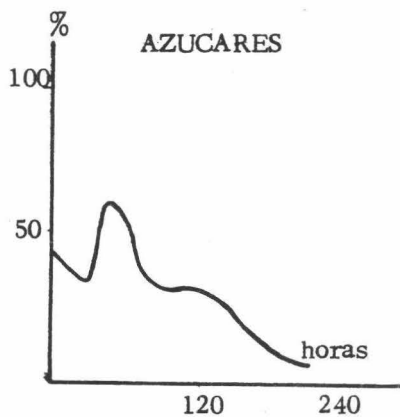
FIGURA 3
 PRODUCCION DE GLUCONATO DE CALCIO, ACIDO GLUCONICO,
 MICELIO Y CONSUMO DE AZUCARES REDUCTORES EN EL MEDIO
 DE FERMENTACION "B" (almidón soluble al 20%).
 HIDROLISIS DEL ALMIDON POR Aspergillus niger .
 EXPERIMENTO 5.



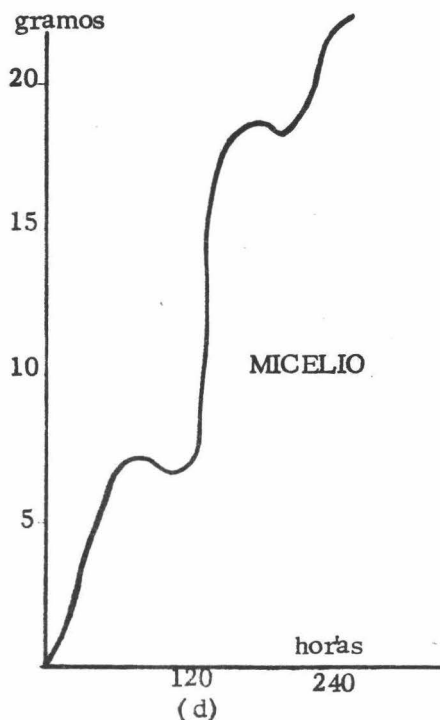
(a)



(b)



(c)

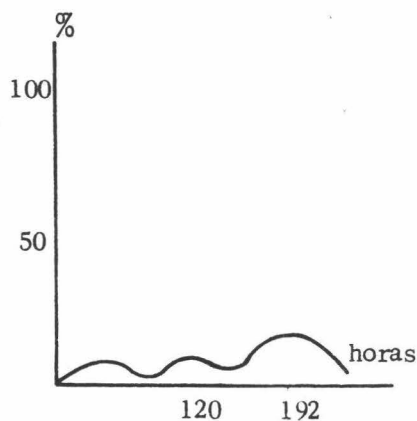


(d)

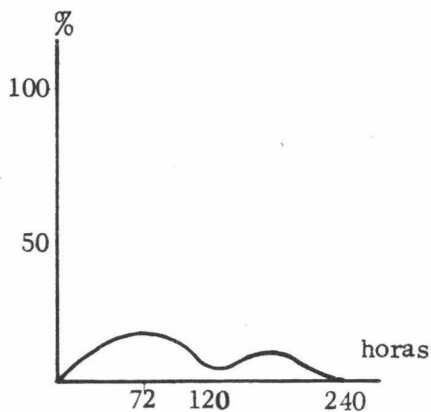
FIGURA 4
 PRODUCCIÓN DE GLUCONATO DE CALCIO, ACIDO GLUCONICO,
 MICELIO Y CONSUMO DE AZUCARES EN EL MEDIO DE FERMENTACION B (Glucosa al 5%).

HIDROLISIS DEL ALMIDON POR Aspergillus niger.

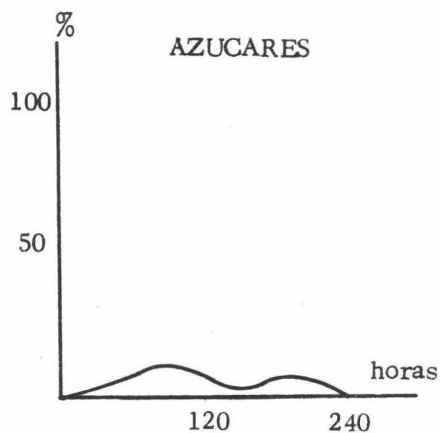
EXPERIMENTO 6



(a)



(b)



(c)

FIGURA 5
 PRODUCCION DE GLUCONATO DE CALCIO,, ACIDO GLUCONICO
 Y CONSUMO DE AZUCARES EN EL MEDIO DE FERMENTACION
 "B" (almidón al 20%). INOCULACION ASOCIADA DE Aspergillus
niger Y Acetobacter suboxidans. EXPERIMENTO 7.

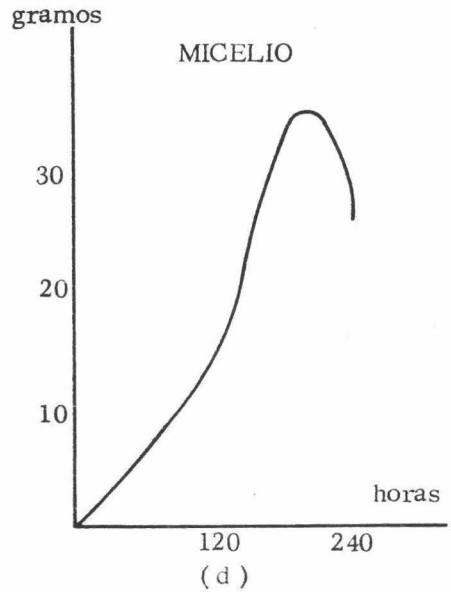
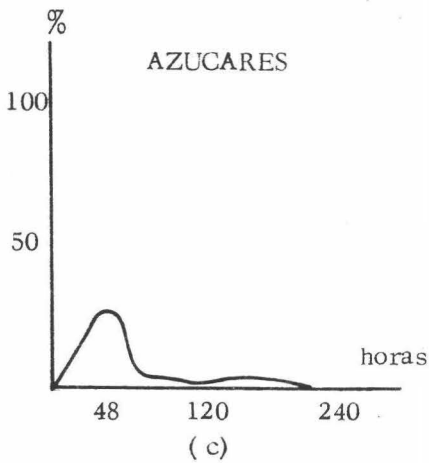
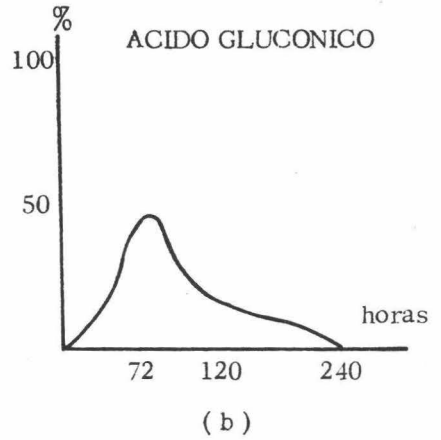
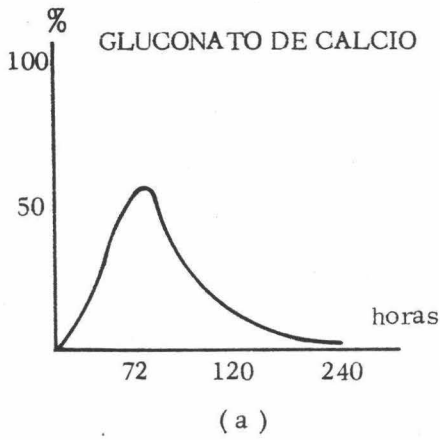


FIGURA 6
 PRODUCCION DE GLUCONATO DE CALCIO, ACIDO GLUCONICO,
 MICELIO Y CONSUMO DE AZUCARES EN EL MEDIO DE FERMEN
 TACION "C" (conteniendo almidón soluble). INOCULACION
 ASOCIADA DE Aspergillus niger Y Acetobacter suboxidans.

EXPERIMENTO 8.

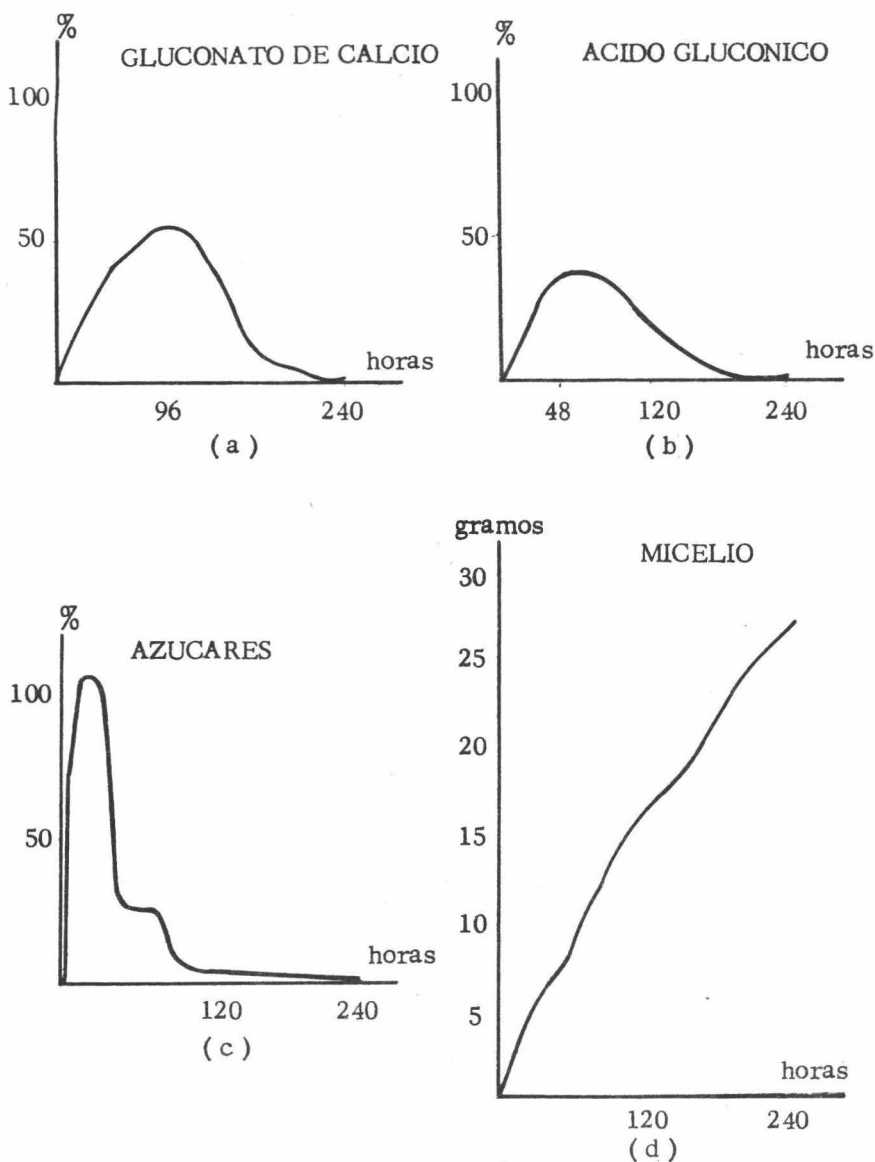


FIGURA 7
 PRODUCCION DE GLUCONATO DE CALCIO, ACIDO GLUCONICO,
 MICELIO Y CONSUMO DE AZUCARES EN EL MEDIO DE FERMEN-
 TACION C (conteniendo 1 ml de HCl). INOCULACION ASOCIADA
 DE Aspergillus niger Y Acetobacter suboxidans.

EXPERIMENTO 9.

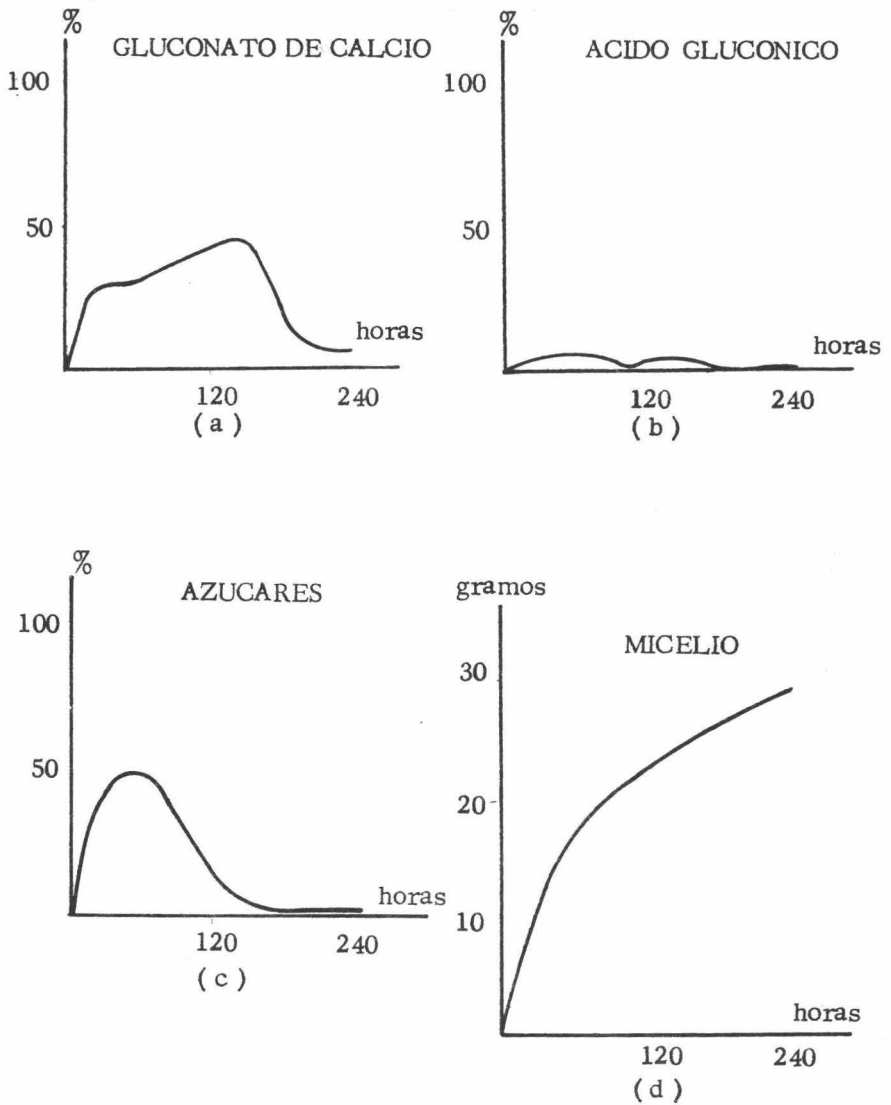


FIGURA 8
 PRODUCCION DE GLUCONATO DE CALCIO, ACIDO GLUCONICO,
 MICELIO Y CONSUMO DE AZUCARES EN EL MEDIO DE FERME-
 TACION D (0.5 ml de HCl) . INOCULACION ASOCIADA DE
Aspergillus niger Y Acetobacter suboxidans . EXPERIMENTO 10.

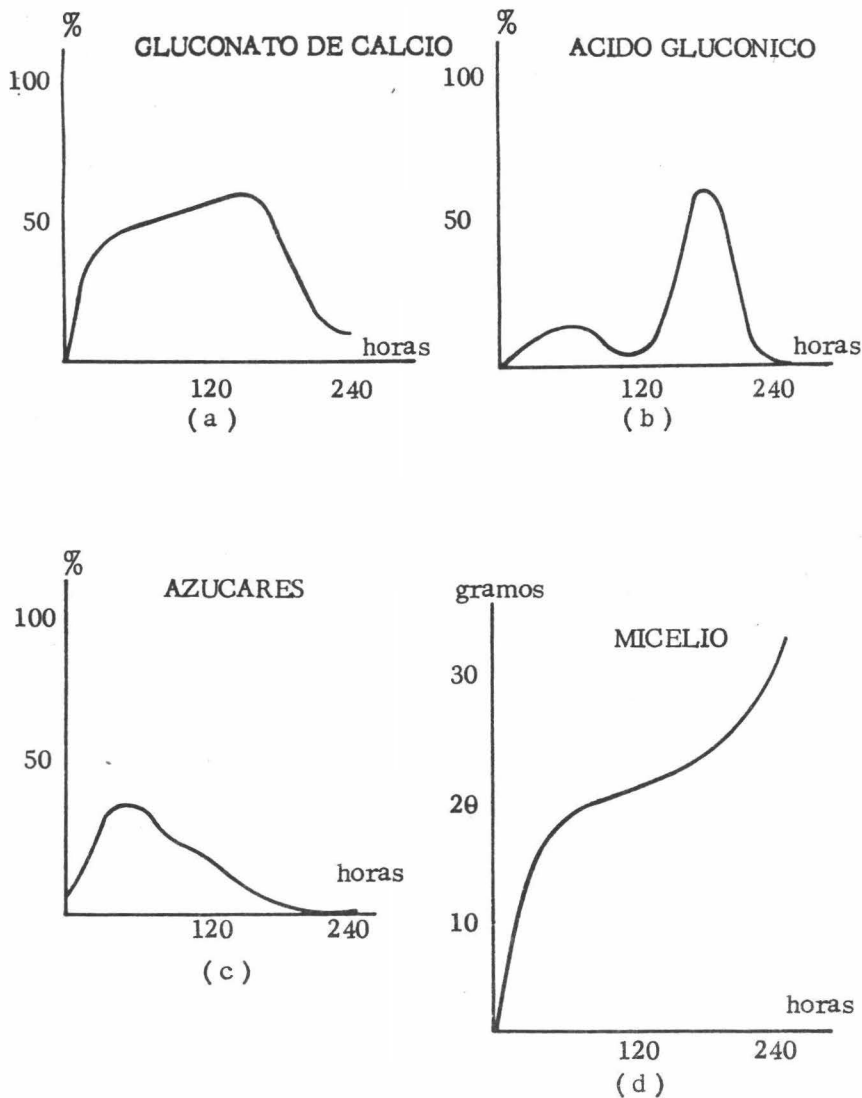


FIGURA 9
 PRODUCCION DE GLUCONATO DE CALCIO, ACIDO GLUCONICO,
 MICELIO Y CONSUMO DE AZUCARES EN EL MEDIO DE FERMENTACION E . INOCULACION ASOCIADA DE Aspergillus niger Y Acetobacter suboxidans. EXPERIMENTO 11.

DISCUSSION

D I S C U S I O N

Las gráficas 1, 2 y 3 representan las curvas estandar - preparadas para las determinaciones químicas efectuadas en este trabajo.

En la primera o de azúcares reductores totales utilizan do el Método de Underkofler, se usaron cantidades conocidas de - glucosa, contra mililitros de tiosulfato de sodio 0.05 N. prepa - rado para cada determinación y esto mismo se hizo en todas las - determinaciones posteriores.

Debido a que la gráfica No. 1 da una equivalencia de mi lilitros de Tiosulfato de sodio a miligramos de glucosa en una - dilución, esta gráfica permitió que todas las determinaciones de las muestras problema, pudieran relacionarse, mediante una multi plicación y un razonamiento proporcional posterior para la obten ción de los gramos de glucosa por ciento.

La muestra problema tomada después de diluir es de 0.05ml. como se indica en la sección 4a. de método de trabajo, cantidad - que al ser leída en la gráfica y multiplicarse por 20 nos da mi - ligramos de glucosa por mililitros de medio, dato que nos sirve para calcular la cantidad de gramos por ciento en las tablas.

En la segunda gráfica, se utilizaron miligramos de glu - conato de calcio puro contra la solución de Calcio como cloruro de calcio preparada como indica el método II.

La tercera gráfica como en la tabla I se indica, repre - senta un promedio de las varias determinaciones que se prepara - ron, al estandarizar el método número III.

Debido a que este método es muy sensible se realizaron diferentes determinaciones para encontrar las condiciones que se citan en la tabla No. 1.

Gráfica 2.

Para hacer uso de esta gráfica, se debió tomar en cuenta que el análisis de gluconato de calcio se hizo en 0.25 ml. de medio, por lo que hay que multiplicar por cuatro para tener la cantidad de calcio por mililitro y con este dato hacer los cálculos siguientes, para obtener los gramos de gluconato en por ciento.

Si llamamos Z a los miligramos por mililitro que se tienen de esta multiplicación tenemos que:

$Z = \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ Además se necesitaba saber cuántos miligramos hay en 100 mililitros de medio por lo tanto se multiplicó por 100 a Z y se tuvo: 100 Z; éstos son los miligramos de gluconato de calcio producidos en 100 mililitros de medio de cultivo, como se va a trabajar con gramos se dividió entre mil lo que queda $\frac{100 Z}{1000}$, simplificando se tiene 0.1 Z este es un factor constante que sirvió para pasar miligramos por mililitro a gramos por cien mililitros. Así se tiene el razonamiento siguiente:

$$\begin{aligned} 20 \text{ gr. glucosa} & : 0.1 (Z) \text{ gr.} \\ 100 \text{ gr. glucosa} & : X \\ X & = \frac{100 \times 0.1 \times Z}{20} \end{aligned}$$

X representa los gramos de gluconato de calcio producidos por cien gramos de glucosa como los factores son constantes lo anterior se reduce a:

$$X \% = 0.5 Z$$

Ya obtenidos estos datos se restaban de la cantidad total de gluconato de calcio producida, un 0.4% como lo indica el método II (14) para que los resultados sean verdaderos y poderlos así transcribir a las tablas de resultados.

Este razonamiento fué seguido de manera similar para los cálculos de ácido glucónico aunque tomando en cuenta que la dilución usada fué mayor en estas determinaciones. Como la cantidad final que se tomó para la determinación fué de: 0.004 ml. para obtener los miligramos por mililitro de ácido glucónico producidos en el medio de fermentación se debe multiplicar por 250 y con ellos razonar como se hizo para la determinación de gluconato de calcio.

Figura 1.

En este tercer experimento puede observarse que la bacteria trabajó mejor al producir una cantidad mayor de ácido glucónico y en menor tiempo que el hongo, como puede verse en la gráfica (a) y (b).

La gráfica C de esta figura va de acuerdo con lo dicho anteriormente, la bacteria al oxidar la glucosa más rápidamente, consume los azúcares más rápido que el hongo.

Con respecto a los métodos puede decirse que se observan mejores resultados en el método de determinación de gluconato de calcio que en el de ácido glucónico, sin embargo se usaron los dos métodos en el control del ácido glucónico.

Figura 2.

En esta cuarta fermentación donde se asociaron los micro

organismos en un medio de glucosa al 20% puede observarse que se elevó sensiblemente la producción de ácido glucónico, es decir - que se observó sinergismo, además de un aceleramiento en la producción de este ácido, tomando en cuenta el comportamiento de Aspergillus niger que emplea dos días más para lograr su máxima - producción.

El consumo de azúcares, por lo anterior, es más rápido que cuando cada microorganismo trabaja individualmente.

También se observa que el método que dió rendimientos más altos fue el del gluconato de calcio.

Figura 3.

En esta quinta fermentación se estudió el comportamiento del Aspergillus niger al utilizar como sustrato al almidón soluble.

Se observa que en el cuarto día (Gráfica C) alcanza el - mayor consumo de azúcares por el desdoblamiento del almidón.

La producción de ácido glucónico fue baja, lo que se pue de observar en los dos métodos de cuantificación (A y B). Nuevamente se vió que la determinación por el método del Versenato dió resultados mas altos. A partir de este experimento se determinó - la cantidad de micelio producido por el hongo con el objeto de - saber si además de usar la energía en producir glucónico, la usa ba en producir micelio, esto se hizo para que en estudios posteriores se busque la manera de disminuir el crecimiento de micelio y de aumentar el del ácido glucónico.

Este experimento fué la base para las manipulaciones pos teriores con respecto al tiempo de inóculo cuando se trató de --

los dos microorganismos, ya que la producción de azúcares reductores totales en el medio de fermentación inducida por el hongo tuvo su máximo valor a las setenta y dos horas de inoculado éste - (Gráfica C).

Figura 4.

La sexta fermentación, se basó en los resultados obtenidos en la quinta, por lo cual se introdujo, además del almidón una pequeña cantidad de glucosa (5%), con el objeto de ver si se mejoraba la producción del ácido glucónico, al tener el microorganismo una fuente de energía más rápida que utilizar, sin tener primero que hidrolizar el almidón para la obtención de esta energía, esto trajo como resultado que el microorganismo atacara primero el azúcar disponible hasta casi consumirlo hasta entonces - empezó a hidrolizar el almidón que quedó como única fuente de -- energía. (Gráfica C).

En las gráficas de producción de ácido glucónico se observa que no hubo mejora en la cantidad producida, permaneciendo ésta por debajo de la producción anterior, mientras que la gráfica de producción de micelio presentó varias curvaturas, observándose que al final de la fermentación el microorganismo produjo - mas micelio, que en la fermentación anterior. O sea en este caso el microorganismo se dedicó a reproducirse y dejó en segundo lugar la producción de ácido glucónico.

Figura 5.

Durante esta séptima fermentación con la introducción de almidón común y corriente al medio de cultivo y la inoculación - de este medio con los dos microorganismos, se tuvo un problema de

interferencia en las determinaciones químicas ya que al comenzar a preparar el medio, después de esterilizar, éste presentó problemas de gelatinización, lo que impidió el poder transferirlo de la solución original a los matraces individuales, procediéndose por lo tanto a pesar la cantidad de almidón necesaria para cada matraz ya efectuada la fermentación. Al tomar las muestras se no tó que el almidón en agua produce un color opalescente el cual au mentó el color desarrollado por la reacción entre el ácido glucónico y el cloruro férrico mismo que se utiliza en su determinación en el espectrofotómetro, lo que trajo como consecuencia un blanco elevado para la mayoría de las muestras problema. En el caso de las gráficas, los puntos máximos llevan corregido este blanco, pe ro los demás puntos no, pues quedaban del lado negativo de la -- gráfica, por lo que dá como resultado gráficas no apegadas a la realidad.

La producción de ácido glucónico según los datos de las gráficas no coincide en sus puntos máximos porque mientras el - gluconato de calcio tiene su máxima producción a las 192 horas el ácido glucónico que debería coincidir con él la tiene a las - 72 horas.

El Acetobacter suboxydans se inoculó a las 72 horas de - iniciada la fermentación, basándose en los resultados de los experimentos 50. y 60., tiempo donde la mayor liberación de azúcares tiene lugar, para permitirle a la bacteria una fuente de ener gía segura.

Figura 6.

Durante la fermentación número 8 (Gráfica C), puede obser

vase que a las 48 horas de liberación de azúcares alcanza su máxima concentración, mientras que la producción de ácido glucónico se encuentra a las 72 horas, lo que significa que el almidón hidrolizado, está siendo oxidado inmediatamente a ácido glucónico.

En esta fermentación se utilizó almidón soluble, lo que trajo como consecuencia análisis sin interferencia. En la siguiente fermentación se utilizó almidón corriente al 10% y se adicionó ácido clorhídrico para hidrolizar el almidón y evitar la gelatinización.

Aunque no se lograron resultados tan altos de ácido glucónico como cuando se empleó almidón soluble al 20%, el uso de este sustrato debe preferirse al del almidón soluble, debido al poco costo.

Figura 7.

En esta novena fermentación el efecto hidrolítico sobre el almidón por la adición del ácido clorhídrico concentrado se notó por la cantidad de azúcares que está aumentada en forma notable. (Gráfica C).

Respecto a la producción de ácido glucónico y gluconato de calcio se observó que no hay coincidencia con respecto a los máximos, ya que mientras el gluconato de calcio se sintetizó en mayor cantidad a las 96 hs., el ácido glucónico lo hizo en un máximo de 48 hs. En cuanto al micelio, el hongo lo produjo en gran cantidad y al terminar la fermentación aun siguió producción, como en todas las fermentaciones donde desde el principio hubo glucosa fácilmente utilizable por los microorganismos.

Figura 8.

En la fermentación 10 (Gráfica B) que representa producción de ácido glucónico puede observarse que hubo interferencia o muy poca producción por el método del ácido, esto último quedó descartado al compararse con el método del versenato que dió resultados aceptables (Gráfica A).

Esta fermentación al ser comparada con la siguiente tiene pocas diferencias, en lo que se refiere a hidrólisis del almidón, pero sin embargo se nota que hay mayor producción de ácido glucónico, debido quizá a que hay en el medio de cultivo mayor concentración de glucosa por la hidrólisis lograda con una cantidad mayor de ácido clorhídrico. (Gráficas A y B de la figura 9).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES.

El objetivo primordial de este trabajo en cuanto a obtención de ácido glucónico utilizando las cepas de *Aspergillus niger* y *Acetobacter suboxydans* se alcanzó, ya que sí hubo producción de este ácido.

La metodología utilizada para la cuantificación tanto de azúcares como de ácido glucónico es aceptable, aunque comparativamente es mejor el método que dosifica al ácido glucónico como gluconato de calcio y esto se comprobó con lo encontrado en la literatura acerca de que es de los métodos más aceptables. (23, 24).

Se encontró que hubo incremento en la producción de ácido glucónico al asociar los 2 microorganismos y acortamiento en el tiempo clásico que dura el proceso cuando se utiliza glucosa en el medio de fermentación; esto indica la posibilidad de mejorar los métodos actuales de producción industrial a partir de la glucosa, por métodos microbiológicos.

Los resultados que se obtuvieron al emplear en el medio de fermentación almidón al 20% en primer lugar y posteriormente al 10%, permiten afirmar que es necesario afinar las condiciones de trabajo en cuanto a mejorar las cepas y probar con ellas varios tipos de almidón para obtener buenos rendimientos de ácido glucónico, con un bajo costo en su producción.

Puede decirse que el trabajar con dos microorganismos para lograr un mismo producto metabólico microbiano, se puede intentar, siempre y cuando se vigilen con más atención las condiciones de temperatura, pH y aereación, que en este caso estuvieron limi

tadas a las condiciones de laboratorio en que se trabajó, además debe utilizarse un medio de cultivo barato y que no presente problemas de gelatinización como el almidón.

El empleo de concentraciones más bajas de almidón (10%) usadas como alternativa al problema presentado con las concentraciones de 2 O%, permitió obtener buenos rendimientos de Acido - glucónico, abriéndose con ello un nuevo camino para estudios posteriores, pero teniendo en cuenta la hidrólisis parcial del almidón inducida por el tratamiento con ácido clorhídrico para que - el medio de cultivo presentara características físicas aceptables.

El rango de pH de nuestras fermentaciones fué muy gran-de, ya que variaron de 3.5 a 6.0 fenómeno que hay que controlar durante la fermentación, así mismo es necesario vigilar la tem-peratura y la agitación en estudios posteriores de esta biosín-tesis.

R E S U M E N

RESUMEN

Se estudiaron en primer lugar las características de la fermentación de Aspergillus niger y Acetobacter suboxydans para obtención de ácido glucónico, bajo condiciones de laboratorio y según lo reportado en la literatura.

Se inocularon los dos microorganismos en un medio de cultivo adecuado de glucosa y se logró obtener una acción Sinérgica con ellos, en la producción de este ácido.

Se probaron diferentes medios de cultivo a base de almidón con el objetivo posterior, de utilizar el más adecuado.

Se usó un medio de cultivo con almidón al 20% y al ver que no era accesible para los microorganismos por las interferencias presentadas, se probó a una concentración más baja (10%).

Posteriormente, para usar almidón barato, ya que primero se trabajó con almidón soluble de alto precio, se procedió a inducir hidrólisis parcial de este almidón corriente con diferentes cantidades de HCl.

Se incubaron los dos microorganismos en estos diferentes medios de cultivo parcial o totalmente hidrolizados y se obtuvieron los resultados reportados en el trabajo. Basándose en ellos, deberá continuarse este estudio, ya que el trabajo indica que sí es posible la producción de ácido glucónico utilizando almidón como fuente de materia prima y por lo menos dos microorganismos adecuados que trabajen complementariamente.

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

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Aronovsky, S. I. and Clark T. F. Gluconic acid production repeated recovery and Re - use of submerged *Aspergillus niger* by filtration. *Ind. Eng. Chem* 33, (8): 1065 - 1067 (1941)
- 2.- Breed, R. S., Murray, E. G. and Smith N. R. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 7th. Ed. The Williams and Wilkins, Co. Baltimore (1957)
- 3.- Elom, R. H., Pfeifer, U. F. Moyer A. J. et al; Sodium Gluconate Production, Fermentation with *Aspergillus niger*, *Ind. Eng. Chem.* 44: 435 - 440. (1952)
- 4.- Coppi Germano. Procedimiento Rápido per il dosaggio dell ' acido gluconico prodotto por via fermentativa. Carlo Erba, Milán. *Boll. Chim Farm.* 101, 241 - 243. (1962)
- 5.- F. Feigl. *Qualitative Analysis by Spot tests.* Last. Ed. Elsevier Publishing Co. Inc. New York. 1956.
- 6.- Gastrock E. A. and Wells, P.A. Gluconic acid production on Pilot - Plant scale. *Ind. Eng. Chem.* 30, (7): 782 - 789. (1938)
- 7.- Herrick, H. T. and May O.E. Gluconic acid production by Submerged mold growth. *Ind. Eng. Chem.* 26, (5): 575 - 578 (1934)
- 8.- Karlson, P. y Pulido F. *Manual de Bioquímica.* Edit. Marín, S. A. Barcelona 1969.
- 9.- Lien, O. G. Gluconic acid, Analytical procedures for its derivatives *Anal. Chem.* 31, 1367 (1959)
- 10.- May, O. E. and Herrick H. T. Semi-Plant, Scale production of Gluconic acid by Mold Fermentation. *Ind. Eng. Chem.* 21, (12): 1198 - 1203 (1929)
- 11.- Prescott, S. C. and Dunn, C. G. *Industrial Microbiology* 3er. Ed. Mc.Graw-Hill Book Col. New York. (1959)
- 12.- Prescott, F. J. and Shaw, J. K. Gluconic acid and its derivatives, *Ind. Eng. Chem.* 45. (2): 338 - 342 (1953)

- 13.- Porges, K., Clark T. F. and Gastrock, E. A. Gluconic acid Production repeated Use of Submerged. *Aspergillus niger* for Semicontinuous Production. *Ind. Eng. Chem.* 32, (I): 107 - 111. (1940).
- 14.- Quantitative determination of gluconic, oxalic and citric acids in liquors after citric acids fermentation of molasses Jadwiga Skiba (Inst. Ferment. Ind. Warsaw). *Prace Inst. - Lab. Bada-wczych Przemyslu Spozy wzego* 11, No. 4, 37-42 (1961)
- 15.- Rainbow C., and Rose, A. H. *Biochemistry of Industrial Microorganisms.* Academic Press. London 1963.
- 16.- Rakoff, H. G. Rose, E. C. *Química Orgánica Fundamental.* Edit. Limusa Wiley, S. A. México (1971).
- 17.- Radley, J. A. *Starch and Derivatives* 3rd. Ed. Vol. I y II John Wiley & Sons. Inc. New York (1967)
- 18.- Solomons, G. L. *Materials and Methods in Fermentation* Academic Press. New York (1969)
- 19.- Underkofler, L. A. and Hickey, R. J. *Industrial Fermentations.* Vol. I, II. Chemical Publishing Co. New York, 1954.
- 20.- Underkofler, L. A. and Gugmon, J. F. Semimicro method for the determination of reducing sugars in fermentation media. *Iowa State Coll. J. Sci* 17, 251 - 6 (1943).
- 21.- Van Gelder, D. W. Gluconic Acid monohydrate recovery. *Patente Británica* 902, 609. Eng. I. 1962.
- 22.- Vogel, A. I. *Quantitative inorganic analysis.* 3er. ed. Longmans. London (1961)

- 23.- Zagrodski, S. and Niwinska. Determination of calcium salts in sugar juices and sugar products by the new Versene method Gaceta Cukrownicza 58, 35-38. (1956)
- 24.- The Pharmacopeia of the United States of America. Eighteen Revision Congress Library (1966)
- 25.- Griswold R. M. The experimental Study of foods. Houghton Mifflin Co. Boston, (1962)
- 26.- Meyer, L. H. Food Chemistry Van Nostrand Reinhold Co. New York (1960)
- 27.- Casida L. E. Industrial Microbiology John Wiley and Sons. New York. (1964)