

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



PROPUESTA DE CINÉTICA DE FERMENTACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN
DE ÁCIDO GLUTÁMICO

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR

AMELIA MERCEDES QUIJANO QUAN

WENDY CAROLINA ZULETA GUZMAN

16 DE FEBRERO
PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIATURA EN QUÍMICA Y FARMACIA

MAYO DE 2006

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA.



©2004, DERECHOS RESERVADOS

Prohibida la reproducción total o parcial de este documento,
sin la autorización escrita de la Universidad de El Salvador

<http://virtual.ues.edu.sv/>

SISTEMA BIBLIOTECARIO, UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

Rectora

Dra. María Isabel Rodríguez

Secretaria General

Lic. Alicia Margarita Rivas de Recinos

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

Decano

Lic. Salvador Castillo Arévalo

Secretaria

MSc. Miriam del Carmen Ramos de Aguilar

COMITÉ DE TRABAJOS DE GRADUACION

Coordinadora General

Lic. María Concepción Odette Rauda Acevedo

Asesora de Área de Microbiología

Lic. Coralia González de Díaz

Asesora de Área de Análisis de Alimentos Fisicoquímico

Ing. Rina Lavinia Hidalgo de Medrano

Docente Director

Ing. María del Carmen Guillén de Medrano

AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo de graduación no habría sido posible sin el apoyo de muchas personas, que de manera directa e indirecta, contribuyeron a la elaboración del mismo. Por este motivo queremos hacer extensivo nuestro sincero agradecimiento y reconocimiento a las siguientes personas:

DOCENTE DIRECTORA: Ing. María del Carmen Guillén de Medrano, por su valiosa cooperación, paciencia y apoyo necesario para la realización del presente trabajo de investigación.

COMITE DE PROCESO DE GRADUACION: Lic. Odette Rauda, Lic. Coralia de Díaz e Ing. Lavinia de Medrano, por la orientación profesional a través de sus evaluaciones para el mejoramiento de nuestro trabajo de graduación.

A NUESTROS PADRES por el apoyo incondicional, que nos brindaron durante el desarrollo de toda nuestra formación profesional.

Así mismo le agradecemos a: Sr. Oscar Coreas, Lic. Marco Aquino, Lic. Norma de Zelaya, Br. Ladislao Ardón, Lic. Evelyn de Ramos y Lic. Julio Valle; por su oportuna y valiosa colaboración.

MUCHAS GRACIAS.

Amelia Quan

Wendy Zuleta

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de graduación principalmente:

A Mi Padre Dios, por haberme dado la sabiduría, la dirección y fortaleza para poder concluir mi carrera. **A Mis Padres** Lilian de Quijano y Carlos Quijano que con su amor, educación y apoyo incondicional han logrado de mi lo que soy ahora y por haber depositado la confianza para el logro de mis metas. Gracias Mami por ser comprensiva y por los consejos tan valiosos que sigue donando a mi vida, gracias Papi por creer en mí y por ser el ejemplo y orgullo para mi vida.

A Mis Hermanos Carlos y Cristina por su amor, amistad y por estar ahí cuando los he necesitado. También quiero dedicar y agradecer a mi mejor amigo y gran amor **José Barahona** por su amor, paciencia, apoyo y los más sinceros consejos en todo momento.

A mi compañera de tesis **Wendy** por compartir conmigo el sacrificio, la paciencia, el apoyo y comprensión que utilizamos en todo este tiempo. Y a todas aquellas personas y amigos que significaron un punto esencial en mi vida, gracias por estar ahí.

Amelia Quan

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo de graduación a: **Mi Padre Celestial** por traerme hasta aquí y permitirme alcanzar uno de mis sueños, por darme una herramienta más para servirte y por la fidelidad que me muestras cada día de mi vida. Esto no habría sido posible sin Ti, gracias Señor, a ti sea la gloria!.

A Mi Madre: Edith Guzmán por su amor, ejemplo, consejos, y amistad que me ha brindado siempre, mamá para mi es una bendición contar con usted, la amo, agradezco sus oraciones, sacrificio para darme una formación profesional y aún más que eso una formación integral, por este motivo le dedico éste trabajo. **A Mi Abuelita** Angelina Privado, gracias por su amor, cuidados, consejos y regaños, la amo y también le dedico éste logro. **A mis Padres** Nelson y Víctor Zuleta por haberme brindado su apoyo. **A la Familia Umanzor** muchas gracias por su amistad, oraciones y su apoyo desinteresado, son de gran bendición para mi vida. **A mis pastores y líderes** por sus oraciones, consejos, y cariño sincero que me han ofrecido siempre. A mi compañera **Amelia**, gracias por tu paciencia y apoyo, para ayudarme a llevar a cabo el presente trabajo.

Al resto de mi familia, a todas las personas que me han brindado su amistad y apoyo, mis amigos y hermanos en Cristo, gracias!

Wendy Zuleta

INDICE

Capítulo	Pág.
Resumen	
Capitulo I	
1.0 Introducción	xvii
Capitulo II	
2.0 Objetivos	
Capitulo III	
3.0 Marco teórico	23
3.1 Metabolitos Primarios	
3.2 Ácido Glutámico	24
3.2.1 Historia del Ácido Glutámico.	26
3.2.2 Usos Comerciales.	27
3.2.3 Usos del Ácido Glutámico en la industria de medicamentos y alimentos.	29
3.2.4 Desventajas de Uso y Consumo del Ácido Glutámico.	30
3.2.5 Producción de Ácido Glutámico.	31
3.3 Cepas de Producción.	32
3.4 Biosíntesis de Ácido Glutámico.	33
3.4.1 Efecto de la Permeabilidad sobre la Producción de Ácido Glutámico.	35
3.4.2 Condiciones de Fabricación.	37
3.4.2.1 Fuentes de Carbono.	
3.4.2.2 Fuentes de Nitrógeno.	
3.4.2.3 Factores de Crecimiento.	38
3.4.2.4 Suministro de Oxígeno.	
3.5 Carne de soya.	
3.6 <i>Aspergillus niger.</i>	39
3.6.1 Reproducción asexual.	40
3.7 Cinética de Crecimiento Microbiano.	41
3.7.1 Medición del Crecimiento Microbiano.	43
3.7.1.1 Peso seco celular.	
3.7.1.2 Absorción.	44
3.7.1.3 Peso húmedo.	45
3.7.1.4 Volumen de células empacadas.	
3.7.1.5 Número de células.	
3.7.1.6 Masa de un componente celular.	46
3.7.1.7 Mediciones Físicas.	

Capítulo	Pág.
Capítulo III	
3.7.2 Cinética del crecimiento microbiano del cultivo por lotes.	47
3.7.3 Evaluación de la cinética de crecimiento microbiano.	49
3.7.3.1 Crecimiento de Microorganismos.	50
3.7.3.1.1 Velocidad volumétrica de generación de células microbianas por peso seco.	
3.7.3.1.2 Velocidad específica de generación de células microbianas por peso seco.	
3.7.3.2 Consumo de nutrientes (sustrato o sacarosa).	51
3.7.3.2.1 Velocidad volumétrica de consumo de sustrato.	
3.7.3.2.2 Velocidad específica de consumo de sustrato.	
3.7.3.3 Formación de producto.	52
3.7.3.3.1 Velocidad volumétrica de formación de productos.	
3.7.3.3.2 Velocidad específica de formación de productos.	53
3.7.3.3.3 Rendimiento en el cultivo.	
Capítulo IV	
4.0 Diseño Metodológico	55
4.1 Investigación bibliográfica.	
4.2 Investigación de campo.	
4.3 Parte experimental:	56
4.3.1 Preparación del Agar Czapek, Medio 33 y reactivos.	
4.3.2 Procedimiento para el proceso de fermentación.	
4.3.2.1 Procedimiento de preparación de muestra.	
4.3.2.2 Aislamiento del hongo <i>Aspergillus</i> a partir de la carne de soya.	
4.3.2.3 Multiplicación del Hongo.	57
4.3.2.4 Preparación del Bioreactor.	58
4.3.3 Fermentación.	
4.3.4 Tratamiento de Muestras.	59
4.3.4.1 Determinación de Biomasa por el Método de Peso Seco.	

Capítulo	Pág.
Capítulo IV	
4.3.4.2 Elaboración de la Curva Estándar de Sacarosa.	60
4.3.4.3 Determinación de Azúcares por el Método de Fenol- Sulfúrico.	61
4.3.4.4 Elaboración de la Curva Estándar de Ácido Glutámico.	62
4.3.4.5 Determinación de Ácido Glutámico en las muestras.	63
4.3.4.6 Determinación de Grados Brix.	
4.3.4.7 Determinación de pH.	64
Capítulo V	
5.0 Resultados e Interpretación de Resultados.	66
5.1 Determinación de Biomasa.	
5.1.1 Velocidad Volumétrica de Biomasa por Método de Peso Seco.	67
5.1.2 Velocidad Específica de Biomasa por Método de Peso Seco.	69
5.2 Determinación de sustrato (Azúcares totales y consumidos).	71
5.2.1 Aplicación del Método de Mínimos Cuadrados.	72
5.2.2 Resultados de Muestras Analizadas.	74
5.2.3 Velocidad Volumétrica de Consumo de Sustrato.	75
5.2.4 Velocidad Específica de Consumo de Sustrato.	77
5.3 Determinación del Rendimiento de Ácido Glutámico.	78
5.3.1 Curva Estándar de Ácido Glutámico.	
5.3.2 Aplicación del Método de Mínimos Cuadrados.	79
5.3.3 Resultados de Muestras Analizadas.	80
5.3.4 Velocidad Volumétrica de Producción de Ácido Glutámico.	82
5.3.5 Velocidad Específica de formación de Ácido Glutámico.	84
5.4 Rendimiento en el Cultivo.	85
5.5 Determinación de Grados Brix.	87
5.6 Determinación de pH.	88

Capítulo V	Pág.
5.7 Modelo de Comportamiento del Ácido Glutámico con el Crecimiento Microbiano.	89
5.8 Ventajas en la Utilización del Medio 33 para la Obtención de Ácido Glutámico, para la Industria Alimenticia y Farmacéutica.	90
Capítulo VI	
6.0 Conclusiones	92
Capitulo VII	
7.0 Recomendaciones	96
Bibliografía	
Anexos	

INDICE DE ANEXOS

ANEXO N°

- 1 Preparación de reactivos
- 2 Material y Equipo.
- 3 Tabla N°. 1 Preparación de Soluciones Estándar de Sacarosa.
- 4 Tabla N°.2: Resultados triplicados de Curva Estándar de Sacarosa.
- 5 Tabla N°. 3: Resultados triplicados de análisis de muestras de Sacarosa.
- 6 Tabla N°. 4: Preparación de Soluciones Estándar de Ácido Glutámico.
- 7 Tabla N°. 5: Resultados triplicados de Curva Estándar de Ácido Glutámico.
- 8 Tabla N°. 6: Resultados triplicados de análisis de muestras de Ácido Glutámico.
- 9 Composición de medio 33.
- 10 Preparación del Agar Czapek más ninhidrina.
- 11 Biosíntesis de Ácido L-Glutámico.
- 12 Determinación de Biomasa por el Método Peso Seco.
- 13 Determinación de Azúcares por el Método de Fenol – Sulfúrico.
- 14 Tabla N°. 7: Importaciones de Ácido Glutámico y sus sales a El Salvador el año 2000-2004.
- 15 Procedimiento para la fermentación de Ácido Glutámico.

INDICE DE FIGURAS

FIGURA N°	PAGINA
1 Naturaleza del Glutamato monosódico	25
2 Biosíntesis de Ácido Glutámico	33
3 Curva de Crecimiento en un cultivo por lotes	48
4 ln Biomasa vrs Tiempo	66
5 Velocidad Volumétrica de Biomasa vrs Tiempo	68
6 Velocidad Específica de Biomasa vrs Tiempo	70
7 Curva idealizada de Sacarosa	73
8 Concentración de Azúcares en muestras vrs Tiempo	74
9 Velocidad Volumétrica de Consumo de Sustrato vrs Tiempo	76
10 Velocidad Específica de Consumo de Sustrato vrs Tiempo	77
11 Curva idealizada de Ácido Glutámico	80
12 Concentración de muestras de Ácido Glutámico vrs Tiempo	81
13 Velocidad Volumétrica de Producción de Ácido Glutámico vrs Tiempo	83
14 Velocidad Especifica de Producción de Ácido Glutámico vrs Tiempo.	84
15 Rendimiento de Ácido Glutámico vrs Tiempo	86
16 Grados Brix vrs Tiempo	87
17 pH vrs Tiempo	88

INDICE DE TABLAS

TABLA N°	PAGINA
1 Super producción de algunos metabolitos primarios	24
2 Determinación de Biomasa por el método de Peso seco	66
3 Resultados de Velocidad Volumétrica de Biomasa por Peso seco	68
4 Resultados de Velocidad Específica de Biomasa.	70
5 Curva Estándar de Sacarosa	71
6 Aplicación del método de mínimos cuadrados.	71
7 Resultados de la interpolación de las muestras en Curva Idealizada.	74
8 Resultados de Velocidad Volumétrica de Consumo de Sustrato	76
9 Resultados de Velocidad Especifica de Consumo de Sustrato.	77
10 Curva Estándar de Ácido Glutámico	78
11 Resultados de la aplicación del método de los mínimos cuadrados para la curva de Ácido Glutámico.	79
12 Resultados de la interpolación de las muestras en Curva Idealizada.	81
13 Resultados de Velocidad Volumétrica de Producción de Ácido Glutámico.	83
14 Resultados de Velocidad Específica de Producción de Ácido Glutámico.	84
15 Rendimiento de Ácido Glutámico en el cultivo.	86
16 Resultados de la determinación de Grados Brix.	87
17 Resultados de pH.	88

RESUMEN

El presente trabajo de investigación pretende proponer la cinética de fermentación para la obtención de Ácido Glutámico. Para ello se llevó a cabo una investigación bibliográfica y posteriormente la parte experimental.

En la primera etapa se definió el fundamento de la cinética de fermentación, las características del aminoácido Ácido Glutámico, biosíntesis, cepas de producción, condiciones de fabricación, cinética de producción, así como el beneficio y desventajas del uso de dicho aminoácido en el organismo humano.

A partir de dicha investigación se procedió a la parte experimental utilizando el método de fermentación microbiológica (Cultivo por lotes), empleando como medio de fermentación el Medio 33 y como productor de Ácido Glutámico el hongo *Aspergillus niger*, aislado a partir de la carne de soya. Los datos obtenidos son el resultado del análisis de las muestras analizadas durante el período de fermentación que comprendió 192 horas. Los parámetros evaluados fueron: Biomasa, Concentración de Sustrato consumido, Rendimiento de Ácido Glutámico, grados Brix y pH. Estos resultados determinaron el rendimiento óptimo del aminoácido; alcanzándose una concentración máxima igual a 0.861g/L de Ácido Glutámico a las 89 horas del proceso fermentativo, período que corresponde a la fase exponencial en la cual se observó la mayor producción del metabolito.

De acuerdo a los resultados obtenidos y las gráficas representativas para cada parámetro evaluado (Biomasa, consumo de sustrato, rendimiento de ácido glutámico, rendimiento del cultivo, grados Brix y pH); el rendimiento de Ácido glutámico fue bajo debido a que el microorganismo utilizó una porción mayoritaria de sustrato para la generación de biomasa y energía de mantención.

Se recomienda llevar a cabo el proceso fermentativo utilizando el medio 33 en cultivos continuos para obtener un mayor rendimiento de Ácido Glutámico.

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN

1.0 INTRODUCCIÓN

El Ácido Glutámico es el principal neurotransmisor excitador del Sistema Nervioso Central en el ser humano. Este ayuda a potenciar las actividades relacionadas con el aprendizaje, memorización y plasticidad neuronal durante el desarrollo del cerebro humano, por estas propiedades el ácido glutámico es incluido en la formulación de medicamentos y en suplementos vitamínicos destinados a estimular la memorización.

El Glutamato Monosódico (GMS), es la sal sódica del ácido glutámico, se utiliza como aditivo en la industria alimenticia por contar con la propiedad de intensificar el sabor natural de los alimentos y por tener un bajo contenido de sodio comparado con la sal común (NaCl), convirtiéndolo en una opción para las dietas hiposódicas.

Según antecedentes de producción de Ácido Glutámico, Pierre Gourdon y Davin Uy realizaron una investigación sobre presión osmótica, capacidad de transporte y consecuencias de sobreproducción del ácido glutámico, respectivamente; ambos sobre el microorganismo ***Corynebacterium glutamicum***. En el primer caso se presentó el proceso de fermentación bajo condiciones estrictas de producción, el metabolito obtenido fue glutamato de sodio con una concentración final de aproximadamente 100 g/litro y una presión osmótica de 2000 mosmol/kg. El segundo demostró que no hubo sobreproducción de ácido glutámico o glutamato, a pesar, de que los niveles de biomasa y otras determinaciones realizadas se mantuvieron constantes.

La Organización Tifac, en la India llevó a cabo el Proyecto tecnología de producción de ácido láctico, tánico, glucónico, ácido glutámico y L-Lisina extraídos de la melaza. El cual relata la demanda necesaria y estatus de la melaza de la India para la producción de las materias primas detalladas anteriormente con el fin de producirlas para suplir su propia demanda así como exportarlas para mejorar su economía nacional. Este proyecto no funcionó debido a que la demanda de ácido glutámico para su nación no es significativa y la producción del mismo no es rentable.

El ácido glutámico y su sal son ampliamente utilizados en la industria farmacéutica y alimenticia de El Salvador. Cada año se importa un promedio de 288,826 kg, lo cual representa una inversión de 298,325.60 dólares por año, debido a la falta de productores locales de dichas materias primas. Lo anterior implica una pérdida significativa para la economía del país. En el presente trabajo de investigación se pretende plantear una manera de obtención de ácido glutámico para proponer al país la posibilidad de ser exportadores del mismo. El método de obtención es la fermentación del hongo *Aspergillus niger* en el medio 33. El hongo fue aislado de la carne de soya deshidratada y se cultivó en el agar Czapeck para posteriormente multiplicarlo. Las esporas fueron sembradas en el medio 33, que es el medio productor de aminoácidos, durante 192 horas muestreando a las 0, 24, 48, 72, 89, 144 , 168 y 192 horas, respectivamente; para determinar el tiempo óptimo de producción del metabolito; así como conocer el comportamiento del microorganismo y las condiciones necesarias para lograr una mayor producción del aminoácido y transferir este método a escala industrial.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Proponer la cinética de fermentación para la obtención de Ácido Glutámico.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

2.2.1 Obtención de ácido glutámico por medio del proceso de fermentación y evaluación de la cinética microbiana.

2.2.2 Detallar los diferentes usos del ácido glutámico en la industria de medicamentos y alimentos.

2.2.3 Determinar por medio de los datos experimentales los siguientes parámetros: Biomasa, Azúcares totales y consumidos, Rendimiento de Ácido Glutámico, Grados Brix y pH; durante el proceso cinético. Evaluar los resultados de la cinética de producción, cálculos y gráficos correspondientes para cada parámetro.

2.2.4 Describir el modelo de comportamiento del ácido glutámico a partir del crecimiento microbiano.

2.2.5 Proponer las ventajas de la utilización del medio 33 para la obtención de ácido glutámico, para la industria alimenticia y farmacéutica.

CAPÍTULO III
MARCO TEÓRICO

3.0 MARCO TEÓRICO

3.1 Metabolitos Primarios ⁽¹³⁾

Los metabolitos primarios son moléculas de bajo peso molecular que intervienen, en los distintos mecanismos anabólicos y catabólicos, ya sea como un producto intermedio o final.

Características de los Metabolitos primarios:

- Son indispensables para el crecimiento del microorganismo que los produce.
- Se metabolizan como productos únicos.
- Son producidos por todos los microorganismos; es decir que son universales.
- La producción no se pierde fácilmente por mutación espontánea.

Algunos de los metabolitos primarios de interés industrial son:

- Alcoholes: etanol
- Aminoácidos: ácido glutámico, lisina, ornitina.
- Ácidos Orgánicos: ácido acético, ácido cítrico, ácido glucónico.
- Vitaminas: cianocobalamina, riboflavina.
- Polioles: glicerol.
- Nucleótidos: 5'guanilico, 5' iosínico.



Tabla N°.1: SUPER PRODUCCIÓN DE ALGUNOS METABOLITOS PRIMARIOS

Producto	Requerimiento (mg/mL)	Producción de metabolito a nivel mundial
Lisina	250.000	50,000
Ácido Glutámico	300.000	100,000
Ácido losínico	25.000	13,000
Riboflavina	0.500	10,000
Cianocobalamina	0.001	50

3.2 Ácido Glutámico ⁽¹⁰⁾

Todo organismo viviente, está compuesto por proteínas. Las proteínas participan en sus diferentes formas en los procesos químicos vitales.

El organismo transforma las proteínas de los alimentos que ingerimos y las “degrada” en sus distintos componentes: los aminoácidos. Los cuales son sintetizados para formar sus propias proteínas, cada una estructurada especialmente para cumplir una tarea o función específica, la falta de un aminoácido impide la formación de dicha proteína, provocando deficiencia de la función que ésta realiza en el organismo humano. Por lo tanto la presencia de los aminoácidos en el metabolismo es de vital importancia.

Los aminoácidos se clasifican en “esenciales” y en “no esenciales” ⁽¹⁴⁾.

Aminoácidos esenciales: No pueden ser sintetizados por el organismo y deben ser aportados por la dieta o en caso contrario pueden producir trastornos en la salud. Entre estos se encuentran: arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano, valina.

Aminoácidos no esenciales: Son imprescindibles para la salud; pero pueden ser sintetizados en el cuerpo por los aminoácidos esenciales.

Un consumo inferior al óptimo de aminoácidos esenciales aumenta las necesidades del organismo de aminoácidos no esenciales.

Entre los aminoácidos no esenciales se encuentra el ácido glutámico, éste es el principal neurotransmisor excitador del Sistema Nervioso Central (SNC) del ser humano, participa en fenómenos tan importantes como el aprendizaje, memorización y contribuye a la plasticidad neuronal durante el desarrollo del cerebro. Existen aproximadamente 20 aminoácidos conocidos, de estos aminoácidos 8 son esenciales para adultos y 10 para los niños.

En 1995 la FDA realizó una revisión exhaustiva de la bibliografía científica sobre el glutamato monosódico emitida por la Federación de Sociedades Americanas para la Biología Experimental (FASEB), y llegó a la conclusión de que no existe alguna diferencia entre el glutamato libre presente en la naturaleza en las setas, queso y tomates, y el glutamato libre bajo la forma de glutamato monosódico, en proteínas hidrolizadas o en salsa de soya. El informe concluyó que el glutamato monosódico es inocuo para la población en general ⁽¹⁴⁾.

<p>AMINOÁCIDO</p> <p>Unidad básica de las proteínas La proteína es un componente indispensable para la vida. Forma nuestras estructuras, piel, uñas, cabello, como también por ejemplo: la hemoglobina en la sangre. La unión de varios aminoácidos forman una proteína. Además algunos aminoácidos en su forma libre, como glutamato poseen sabor.</p>	<p>GLUTAMATO MONOSÓDICO</p> $\text{HOOC-CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COONa}\cdot\text{H}_2\text{O}$ <p> </p> <p>NH₂</p>	<p>SODIO</p> <p>El Sodio es un mineral también indispensable para la vida, se encuentra en nuestras células, sangre, en vegetales, animales. Forma junto al cloro la sal de mesa o de cocina que todos utilizamos en nuestras comidas.</p>
<p>El Glutamato Monosódico es la sal sódica del aminoácido más abundante en la naturaleza: el ácido glutámico. Esta sustancia es 100 % natural, ya que está formada por dos sustancias totalmente naturales.</p>		

Fig. N°. 1: NATURALEZA DEL GLUTAMATO MONOSÓDICO

3.2.1 Historia del Ácido Glutámico.

A principios del siglo XX, el profesor Kikunae Ikeda, de la Universidad Imperial de Tokio, reflexionaba sobre el sabor de las comidas: “Existe un sabor que es común a los espárragos, los tomates, el queso y la carne, pero que no es ninguno de los sabores conocidos de dulce, ácido, amargo y salado”.

En 1907, inició sus experimentos para identificar cuál era el origen de este sabor distinto. Sabía que estaba presente en el “caldo” elaborado a partir del kombu (un tipo de alga), que se encuentra en la cocina japonesa tradicional. Comenzó con una cantidad muy grande de caldo de kombu y logró extraer cristales de ácido glutámico (o glutamato).

Ikeda observó que el glutamato tenía un sabor diferenciado y le puso por nombre “umami”, decidió elaborar un sazonador usando su recién aislado glutamato.

Para ser usado como sazonador, el glutamato debía tener algunas de las mismas características que se encuentran, por ejemplo, en el azúcar y la sal; es decir debía ser fácilmente soluble en agua, pero sin absorber la humedad ni solidificarse. También observó que el glutamato monosódico tenía buenas propiedades de conservación y un fuerte sabor umami sabroso. Resultó ser un sazonador ideal. Debido a que el glutamato monosódico carece de olor y de textura propia, se puede usar en muchos platillos, en los que potencia de manera natural el sabor original de los alimentos.

El GMS o glutamato de monosodio, es la sal sódica del ácido glutámico. Se vende como una sustancia en cristales finos de color blanco, similar en apariencia a la sal o el azúcar. No tiene un gusto distintivo propio, se cree que estimula a los receptores de glutamato en la lengua para aumentar los sabores parecidos a los de la carne.

Los investigadores japoneses iniciaron el desarrollo del proceso de fermentación por medio de síntesis química obtuvieron Ácido L-glutámico y D-glutámico. La forma "L" es la más compatible con la bioquímica humana ya que metabólicamente, el ácido L-glutámico es prácticamente equivalente en forma libre o combinada, ya que las proteínas se destruyen en el aparato digestivo, produciendo los aminoácidos individuales, que son los que se absorben. El ácido L- glutámico se considera el aminoácido de mayor consumo a nivel mundial⁽¹⁶⁾.

3.2.2 Usos Comerciales

El ácido glutámico es uno de los aminoácidos más abundantes en la naturaleza, forma parte de la composición de muchos alimentos ricos en proteínas tales como el queso, carne, pescado, leche y algunos vegetales.

Los alimentos ricos en glutamato han sido utilizados como resaltadores del sabor alrededor del mundo desde hace más de 1000 años atrás.

Una de las razones por la cual el GMS se ha hecho tan popular es por su propiedad de armonizar los diferentes sabores que encontramos en nuestros

alimentos como ningún otro ingrediente lo ha hecho. El efecto del sabor del GMS es reconocido internacionalmente como quinto sabor básico y ha sido clasificado como potenciador de sabor (sustancias que a las concentraciones que se utilizan normalmente en los alimentos no aportan un sabor propio, sino que potencian el de los otros componentes presentes). Además influye en la sensación de “cuerpo”, en el paladar y en la viscosidad, ya que aumenta en ambas el grado de sabor, un buen ejemplo es el de sopas y salsas.

Hoy en día, esta propiedad resaltadora del sabor del GMS hace que éste sea producido no sólo para su consumo directo en los diferentes hogares del mundo, sino también para su uso como insumo en la gran industria de alimentos, siendo muchas veces indispensable en la fabricación de una variedad de productos que consumimos diariamente.

El ácido glutámico usado en aplicaciones farmacéuticas, es el resultado de un sofisticado proceso de producción, y tiene un grado de pureza considerablemente superior al del ácido glutámico usado a granel en la producción del GMS ⁽¹²⁾.

3.2.3 Usos del Ácido Glutámico en la industria de medicamentos y alimentos ⁽¹⁷⁾.

- El ácido glutámico puede ser utilizado en las dietas hiposódicas como un sustituto de la sal común, debido a que 100 g de NaCl contienen 40g de Na, en cambio 100 g de Glutamato monosódico contienen 13.3g de Na; es decir solamente la tercera parte de sodio que contiene la sal común.

- Por su característica de potenciar el sabor natural de las comidas, puede hacer los alimentos más atractivos para los ancianos que pierden el sentido del gusto; aún si estos padecen de hipertensión arterial.

- Por ser un saborizante es muy útil en niños, ya que si se agrega glutamato a la sopa de vegetales, los niños expresan a través de expresiones faciales goce por el sabor de la sopa, de una manera similar a sus respuestas ante soluciones dulces.

También puede utilizarse en la preparación de alimentos para pacientes anoréxicos o bulímicos con el fin de aumentar la palatabilidad de los mismos.

- Los pacientes con enfermedades renales muestran una disminución de los umbrales a los cuatro gustos (dulce, amargo, salado y ácido), en éstos resultaría satisfactorio el uso de glutamato monosódico para brindarles mayor placer en su alimentación.

- En general, en la industria alimenticia se autoriza la adición del 1% de glutamato a las carnes rojas y pescados enlatados, mientras que en las salsas se permite 2% y hasta un 50% en agentes saborizantes.

Es obligatorio declarar el contenido y cantidad de Ácido Glutámico en los alimentos preenvasados.

- En Estados Unidos, el GMS se considera un ingrediente alimenticio común, como la sal, levadura y pimienta. Esta incluido en la lista de ingredientes reconocidos como inocuos de la Food and Drug Administration de los Estados Unidos (FDA). Su ubicación en esta lista significa que el GMS es inocuo para el uso al que está destinado.

- Puede consumirse aún cuando se este cumpliendo con un tratamiento farmacológico ya que no se ha demostrado que el Ácido Glutámico interactué con algún medicamento Glutamato

3.2.4 Desventajas de Uso y Consumo del Ácido Glutámico.

Aunque se considera al GMS como un aditivo alimenticio seguro para la mayoría de la población, hay un grupo de personas con asma severo difícilmente controlado, quienes son propensos al aumento de síntomas por GMS, y pueden sufrir un empeoramiento temporal de los síntomas asmáticos

luego de consumir GMS. La dosis que ha producido esta reacción en este tipo de personas varía en el rango de 0.5 - 2.5 gramos.

Generalmente el consumo de ácido glutámico está libre de efectos colaterales para la mayor cantidad de personas que lo toman. Sin embargo, las personas con problemas hepáticos o renales no deben de tomar altas cantidades de aminoácidos (incluyendo el ácido glutámico), sin antes haber consultado a un médico.

3.2.5 Producción de Ácido Glutámico ⁽⁴⁾.

El ácido glutámico se fabrica predominantemente por procedimientos microbianos, aunque también es producido químicamente. Los investigadores japoneses iniciaron el desarrollo del proceso de fermentación directa debido a que el ácido D, L- glutámico que se forma por síntesis química es una mezcla racémica y únicamente la forma L es activa y posee la propiedad de potenciar los sabores.

El método de fermentación directa utiliza diferentes fuentes de carbono (glucosa, fructosa, melazas, hidrolizados de almidón, n-alcanos, etanol, glicerol, acetato, propionato); nitrógeno (urea, sales amoníacas, líquido de macerado de maíz o harina de soya); sales inorgánicas de calcio, de potasio y de magnesio; así como iones fosfato y sulfato; además cantidades mínimas de magnesio, hierro, manganeso, zinc, cobalto y biotina.

En el proceso de fermentación, se obtiene ácido glutámico crudo bajo condiciones estrictamente controladas, a partir de un microorganismo, en un sustrato al cual se le ha adicionado nitrógeno y varios nutrientes.

Muchos almidones naturales se utilizan como sustrato para la fermentación, entre ellos se encuentran: tapioca y melazas de caña de azúcar. El ácido glutámico crudo se filtra, purifica y por neutralización se convierte en glutamato monosódico. Después de una purificación adicional, cristalización y secado, el glutamato tiene forma de cristales blancos listos para ser empacados y utilizados.

3.3 Cepas de Producción. ⁽⁴⁾

A partir de estudios sobre 2000 microorganismos en diferentes medios, se encontró que el ácido L-glutámico es producido por una amplia variedad de bacterias, estreptomicetos, levaduras y hongos. Los ensayos realizados con el aislamiento de ***Corynebacterium glutamicum* (*Micrococcus glutamicum*)** dieron una mayor producción de ácido glutámico. Otras cepas industrialmente importantes pertenecen a los géneros: ***Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Micobacterium* y *Arthrobacter*.**

Morfológicamente estas cepas son generalmente bacterias gram (+), no esporulantes e inmóviles. Además todos los productores de ácido glutámico requieren de biotina y crecen o muestran poca actividad de glutamato deshidrogenasa.

3.4 Biosíntesis de Ácido Glutámico. ⁽⁴⁾

La glucosa es una fuente de Carbono, esta es degradada por los microorganismos productores de Ácido Glutámico a fragmentos de C₃ y C₂ a través de la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), el ciclo de la pentosa fosfato y los fragmentos canalizados al ciclo de los ácidos tricarboxílicos. La vía EMP es más frecuente en las condiciones de producción de Ácido Glutámico.

El precursor clave del Ácido Glutámico es el ∞ -cetoglutarato que se forma en el ciclo de TCA vía citrato e isocitrato y por aminación reductiva con iones NH₄⁺ libres, se convierte en ácido L-glutámico. Esta ultima etapa es catalizada por la NADPH₂ requerida, en esta etapa de la reacción, el NADPH₂ es proporcionado por la oxidación descarboxilativa previa del isocitrato a ∞ -cetoglutarato mediante la enzima isocitrato deshidrogenasa. El NADPH₂ posteriormente es regenerado por la aminación reductiva de ∞ -cetoglutarato:

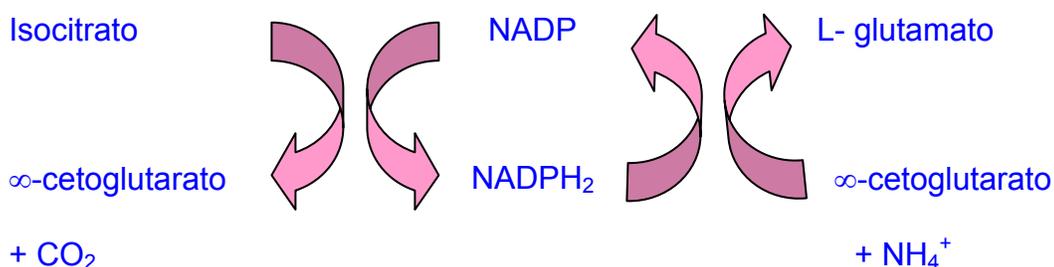


Fig. N° 2: BIOSÍNTESIS DE ÁCIDO GLUTÁMICO.

La cepa utilizada comercialmente para la producción de ácido glutámico tiene un bloqueo en la ∞ -cetoglutaratodeshidrogenasa. En ausencia de iones NH₄⁺ se acumula ∞ -cetoglutarato debido a la interrupción del ciclo del TCA. Por lo tanto

se requieren secuencias anapleróticas eficientes para proporcionar al ciclo del TCA, los intermediarios que se requieren para todas las demás reacciones de la célula. Se llevaron a cabo estudios sobre la vía de biosíntesis del ácido glutámico utilizando compuestos marcados durante la formación de este en presencia de CO₂. Se marca radiactivamente el grupo ∞-carboxilasa y la malato dependiente de NADPH₂ implicadas en el proceso de fijación de CO₂. La enzima málica cataliza la carboxilación del piruvato a málico (ver anexo 11). Estas secuencias anapleróticas completan el ciclo del TCA con ácidos di carboxílicos C₄. El malato es transformado vía oxalacetato a citrato e isocitrato , los cuales sirven como etapas preliminares a la formación de Ácido Glutámico a partir de glucosa o acetato como fuente de Carbono de la siguiente manera:



1 mol de Ácido Glutámico se produce a partir de 1 mol de glucosa o de 3 moles de acetato.

Experimentos con células en reposo han mostrado que la velocidad de conversión real es entre 50 – 70% molar. Parte del descenso en el rendimiento se debe a la reversibilidad de la reacción de la enzima málica y a la descarboxilación del oxalato a CO₂.

3.4.1 Efecto de la Permeabilidad sobre la Producción de Ácido Glutámico

La producción y secreción de cantidades excesivas de ácido glutámico dependen de la permeabilidad de la célula, por ello las cepas de uso comercial para la producción de ácido glutámico son seleccionadas a través de los siguientes mecanismos:

- Mediante deficiencia de biotina.
- Deficiencia de ácido oleico en auxótrofos para ácido oleico.
- Por adición de ácidos grasos saturados (C₁₆-C₁₈) o derivados de los mismos.
- Mediante la adición de penicilina.
- Deficiencia de glicerol en auxótrofos (organismos que solamente se desarrollan en un determinado sustrato), de glicerol.

Todas las cepas productoras del ácido glutámico tienen un requerimiento de biotina para crecer. La biotina es una coenzima esencial en la síntesis de los ácidos grasos.

Durante el crecimiento con glucosa, los microorganismos súper-productores acumulan intracelularmente glutamato, hasta 25 — 35 µg de ácido L-glutámico/mg peso seco. Por medio de la regulación por retroalimentación o retroinhibición, se bloquea la síntesis de glutamato, salvo que se modifique la permeabilidad de la célula y de esta manera se facilita la salida del aminoácido al exterior de la célula. La modificación de la permeabilidad, se consigue con una deficiencia en el bloqueo biosintético de la biotina. Una deficiencia en biotina origina cambios en la composición lipídica de la membrana debido al

papel que desempeña la biotina en la síntesis de ácidos grasos. Los niveles de biotina que se requieren para el medio son críticos a la hora de obtener una buena producción de ácido L- glutámico. Las concentraciones que se usan oscilan entre 1-5 $\mu\text{g/L}$ de biotina, por ello una concentración mayor de 5 $\mu\text{g/L}$ produce un aumento en la síntesis de ácido oleico, lo cual se manifiesta en un contenido mayor en fosfolípidos en la membrana celular. Las células con alto contenido en fosfolípidos son incapaces de excretar ácido glutámico. La permeabilidad también se puede alterar por la adición de penicilina durante la fase logarítmica de crecimiento, lo que favorece significativamente la secreción de ácido L-glutámico, incluso en presencia de biotina. La penicilina se adiciona a las fermentaciones en medios que contienen grandes cantidades de biotina. La utilización de penicilina o ácidos grasos saturados hace posible el uso comercial de medios de cultivo baratos, como melazas de azúcar de caña o de remolacha, que de otra manera no podrían ser utilizados debido a su alto contenido en biotina.

El descubrimiento de la importancia de la permeabilidad celular en la producción de ácido glutámico ha hecho posible realizar algunos enfoques racionales a la producción industrial de este importante aminoácido.

3.4.2 Condiciones de Fabricación ⁽⁶⁾

Los factores que afectan la fermentación del ácido glutámico son:

- Fuentes de Carbono
- Fuentes de Nitrógeno
- Factores de Crecimiento
- Suministro de Oxígeno.

3.4.2.1 Fuentes de Carbono ⁽⁶⁾

En la fermentación de ácido glutámico pueden ser utilizados una amplia variedad de carbohidratos. Entre los monosacáridos que se utilizan se encuentran: glucosa y sacarosa; fructosa, maltosa, ribosa, xilosa y las fuentes de carbohidratos no refinados; las melazas de caña de azúcar y de remolacha son las más importantes; así como los hidrolizados de almidón.

3.4.2.2 Fuentes de Nitrógeno ⁽⁶⁾

Se utilizan las sales amoniacales, y el amonio en estado gaseoso o en solución acuosa.

El amonio desempeña un papel importante en la producción industrial del ácido glutámico. La alimentación con amonio permite el control del pH y elimina el problema de la toxicidad del mismo, para ello se utiliza con mucha secuencia la urea.

3.4.2.3 Factores de Crecimiento ⁽⁶⁾

La concentración óptima de biotina depende de la fuente de carbono utilizada por ejemplo, en medios con el 10% de glucosa la concentración es de 5 µg/L, y en medios menores que el 10% de concentración de glucosa es menor la concentración de biotina.

3.4.2.4 Suministro de Oxígeno ⁽⁶⁾

La concentración de oxígeno debe ser balanceada, ya que cuando hay deficiencia de este se produce secreción de lactato y succinato; mientras que el exceso de oxígeno en presencia de una baja concentración de amonio conduce a la inhibición de crecimiento y producción de α-cetoglutaratos. En ambos casos los rendimientos de ácido glutámico son mínimos.

3.5 Carne de Soya

La carne de soya reúne las características necesarias para el crecimiento del microorganismo a utilizar, (*Aspergillus niger*) ya que contiene 30% de hidratos de carbono, 18% de aceite no saturado, 14% de humedad y 38% de proteínas. Es la única legumbre que contiene los aminoácidos esenciales en la proporción correcta para la salud humana y es una fuente de fósforo, potasio, vitaminas del grupo B y E, zinc, hierro y antioxidantes.

Por poseer estas características se le considera una fuente principal para la producción de especies de mohos como *Aspergillus niger* y *penicillium*.

3.6 *Aspergillus Níger* ⁽⁶⁾

Reproducción Asexual: Este género característico ya fue descrito en 1729 por el italiano P: A: Michelli, en su célebre obra “Nova plantarum genera”. Le dio el nombre “***Aspergillus***”, derivado de la palabra latina asper = áspero.

Aspergillus níger es una familia de especies de mohos que pueden encontrarse en muchos países, especialmente en los meses de invierno y de otoño.

Microbiológicamente las especies de ***Aspergillus*** son hongos infectantes para los humanos. Estas hifas son hialinas, tabicadas y de contorno regular. Tienen paredes paralelas, miden de 3 a 6 μm de diámetro.

Las colonias de ***Aspergillus níger*** aisladas en agar Czapeck o agar Sabourau inicialmente son cubiertas por un micelio aéreo blanco, veloso. A medida que la colonia madura, se observa un efecto de sal y pimienta, la superficie finalmente es cubierta por esporas negras. El reverso de la colonia permanece con un color tostado claro, lo que lo distingue de otros hongos. La coloración negra de las colonias se debe a las conidias negras. Estas son soportadas por conidióforos largos no septados, cuyos extremos hinchados miden 80 μ de diámetro. Los esterigmas están ramificados y dispuestos en pisos. Los esterigmas primarios son largos, mientras que los secundarios (y en algunos casos los terciarios) son cortos. El extremo es fuertemente abultado, los esterigmas ramificados dan origen a que la umbela de las conidias adquieran un aspecto diferente de todas las restantes especies de ***Aspergillus***.

Reproducción sexual: no se han descubierto los estados perfectos en la mayoría de las especies de *Aspergillus* y es muy posible que tales especies hayan perdido su capacidad de reproducción sexual ⁽¹⁾.

3.6.1 Reproducción Asexual.

La reproducción asexual del microorganismo se da cuando el microorganismo es aún joven y vigoroso, el micelio produce abundantes conidióforos. Estos no se organizan de ninguna manera, sino que nacen aislados directamente de las hifas somáticas. La célula hifal que se ramifica para dar lugar al conidióforo recibe el nombre de célula basal. Los conidióforos son hifas largas, erguidas, cada una termina en una cabeza, llamada vesícula.

Sobre toda la superficie de la vesícula multinucleada se desarrollan una gran cantidad de esterigmas que la cubren completamente.

A medida que maduran los esterigmas, comienzan a formarse conidios en sus extremos, uno debajo del otro, en cadenas. Los conidios son globosos y unicelulares, con paredes externamente rugosas. Al principio uninucleados, en muchas especies, por divisiones nucleares sucesivas, pronto se hacen multinucleados; sin embargo, en la mayoría de las especies los conidios permanecen uninucleados.

Los conidios de los *Aspergillus* se forman dentro del extremo del esterigma, un tabique transversal delimita una porción del protoplasma con un núcleo. El protoplasto se redondea y segrega una pared propia dentro del esterigma

tubular; además llega a desarrollar un conidio. La pared conidial puede fusionarse parcial o completamente con la pared del esterigma. Entre tanto, un segundo protoplasto, debajo del primero, crece para formar otra espora y empuja la primera espora hacia el exterior, de manera que se forma una cadena de esporas a medida que el protoplasma del esterigma continua creciendo y nuevos conidios se organizan uno debajo del otro.

Como los conidióforos y los conidios se producen en gran abundancia, es su color el que predomina sobre la colonia que cubren. De este modo, las colonias de *Aspergillus* parecen ser negras.

Dado que el color de la colonia es uno de los criterios que se utiliza para la determinación, no podemos dejar de destacar la importancia de elegir un medio idóneo para cultivar *Aspergillus* ⁽¹⁸⁾.

3.7 Cinética de Crecimiento Microbiano ⁽⁶⁾.

Para el estudio cuantitativo de la cinética de procesos de fermentación, es necesario disponer de métodos experimentales sencillos para determinar el crecimiento de poblaciones microbianas. Estos métodos deben considerar la forma de reproducción de las células procarióticas y eucarióticas. Las células procarióticas bacterianas se reproducen por fisión binaria, sin que sea posible diferenciar una célula madre de una célula hija, por ello la edad máxima de cada célula es el lapso comprendido entre dos replicaciones sucesivas. La edad del cultivo en un sistema por lotes, es el tiempo transcurrido desde la

inoculación. En un cultivo de bacterias no existen grandes diferencias entre el estado fisiológico de las distintas células que lo componen. Otra característica es que las células bacterianas se presentan en forma individual o en asociaciones débiles de pocos individuos, las cuales pueden ser dispersadas homogéneamente en el medio líquido de cultivo.

En el caso de los hongos filamentosos o mohos se acentúa la importancia de la reproducción mediante esporas. Sin embargo en un cultivo de laboratorio o industrial, resulta más relevante la formación de hifas (cadena de células con envoltente común) y su elongación mediante la reproducción de la célula de los extremos (crecimiento apical). El conjunto de hifas constituye el micelio, cuya presencia e interacción con el agua confiere al cultivo características reológicas no-newtonianas y alta consistencia. El micelio puede desarrollarse en forma difusa (distribuido en todo el líquido) o discreta. Por las características mencionadas los cultivos de mohos son heterogéneos desde la perspectiva física y fisiológica.

Los métodos que determinan el número de células, son en general preferidos en trabajos de orientación básica, mientras que en el área aplicada resulta más adecuada la cuantificación de la masa.

El crecimiento se puede considerar como el aumento ordenado de todos los constituyentes químicos de un organismo unicelular, conduce a un aumento en el número de individuos en la población. Se puede considerar el crecimiento a nivel de individuos dentro de una población (ciclo celular) o el crecimiento de

poblaciones celulares (ciclo de crecimiento). El crecimiento de las poblaciones celulares se puede subdividir en sistemas cerrados, como el cultivo intermitente, y en sistemas abiertos, como el cultivo alimentado por lotes y el cultivo continuo.

No existe un método en particular que se considere como el mejor, por lo que de acuerdo a las características de cada caso se debe seleccionar el método adecuado. El problema de determinar el crecimiento microbiano no está aún resuelto a satisfacción. Subsisten situaciones comunes en las cuales resulta difícil obtener en forma expedita datos confiables. Una fermentación micelial con un medio de cultivo fuertemente coloreado y con sólidos en suspensión ejemplifica lo aseverado.

3.7.1 Medición del Crecimiento Microbiano ⁽⁶⁾

Existen muchos métodos para la determinación del crecimiento de células microbianas, entre los cuales podemos mencionar: peso seco o biomasa, absorción, peso húmedo, volumen de células empacadas, número de células, masa de un componente celular, mediciones físicas.

3.7.1.1 Peso seco celular

El método más usado para medir el crecimiento microbiano, es secar volúmenes conocidos de cultivo celular lentamente, hasta obtener un peso constante. Cuando se trata de células que sedimentan rápidamente, como

levaduras, esto usualmente implica centrifugación ($4,6 \times 10^3$ rpm). Luego las células concentradas se colocan en una estufa a $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ o a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta obtener un peso constante. El peso de las células secas usualmente se expresa en términos de g/L.

En las determinaciones de peso seco celular existen fuentes de error importantes debido a la absorción de humedad atmosférica por las células secas y los tubos de centrifuga o las membranas durante el enfriamiento. Esto se puede evitar al enfriar en un desecador o mediante la determinación de la cantidad de agua absorbida por las membranas o tubos y con la corrección adecuada del peso medido. La presencia de sólidos en el medio, los cuales se encuentran frecuentemente en muchos medios industriales importantes, requiere que el peso seco medido sea corregido con respecto al peso de los sólidos.

3.7.1.2 Absorción ⁽⁶⁾

A menudo se obtiene ventaja del hecho de que en una celda espectrofotométrica, las células microbianas desvían la luz, de modo que la cantidad de ésta que llega al detector del espectrofotómetro, está relacionada directamente con el número de células presentes en la muestra del cultivo de acuerdo a la Ley de Beer. Por lo general, se emplean longitudes de onda alrededor de 600 nm. Es importante entender que como la absorbancia es afectada por el tamaño y la forma de las células, la relación entre la

absorbancia y el número de células cambia sí el tamaño o la forma de estas cambia durante el crecimiento del cultivo. La absorción de luz está relacionada con el peso seco celular. Esto se da midiendo la absorbancia con el peso seco de muestras del cultivo y graficando uno contra el otro (absorbancia vrs tiempo).

3.7.1.3 Peso húmedo ⁽⁶⁾

Es simplemente la centrifugación o la filtración de muestras del cultivo seguida por el pesado directo. Aunque es un método extremadamente rápido, es importante estandarizar correctamente el procedimiento, ya que se mide el agua tanto intracelular como extracelular, lo cual puede causar errores considerables.

3.7.1.4 Volumen de células empacadas

Mediante la centrifugación de muestras del cultivo en tubos de centrífuga graduados se puede determinar rápidamente el volumen de células empacadas. Este método es muy inexacto, especialmente cuando se miden pequeños cambios en la población celular.

3.7.1.5 Número de Células

El crecimiento se puede determinar también en términos de número de células por litro. El número total de células se puede medir colocando muestras de cultivo adecuadamente diluidas sobre portaobjetos de microscopios graduados

como los de Herber o los hematocitómetros y contando el número de células con la ayuda de un microscopio.

Aunque este método es relativamente rápido y exacto no distingue entre células viables y no viables, también muy agotador, sin embargo, se cuenta con contadores de células automáticos.

3.7.1.6 Masa de un Componente Celular.

En los casos donde se dificulte el uso de otros métodos, la cantidad de un componente celular, la cual es una cantidad constante del peso seco total, se puede usar para estimar la concentración de células o de biomasa. Se han usado componentes como el nitrógeno, proteína, RNA, DNA y ATP celulares. Pueden surgir dificultades, ya que varía la cantidad de estos componentes en la célula, a menudo considerablemente, durante el crecimiento de las células especialmente cuando las condiciones de éste son diferentes.

3.7.1.7 Mediciones Físicas

El crecimiento de las células microbianas va acompañado siempre de generación de calor. Recientemente se demostró que hay una relación directa entre la cantidad de calor producido y la concentración de biomasa. Este método es directo, no requiere de muestreo y es instantáneo, pero es más adecuado para biorreactores a gran escala, puesto que la cantidad de calor

generado en escala pequeña puede ser demasiado pequeña para ser adecuada.

Para cultivos aeróbicos es posible medir la rapidez de captación de oxígeno, ya que se ha demostrado que está directamente relacionada con la concentración de biomasa. Es obvio que éste método no es adecuado para cultivos anaeróbicos.

3.7.2 Cinética del crecimiento microbiano de un Cultivo por Lotes

El conocimiento de la cinética y producción de metabolitos es fundamental en el tratamiento cuantitativo de los procesos de fermentación. El conocimiento de la cinética de un cultivo permite la predicción del transcurso de la fermentación, la evaluación de velocidades, rendimientos, productividades y entrega información útil para establecer las estrategias de producción y optimización del proceso.

El comportamiento cinético de una población está determinado por un conjunto de factores genéticos y ambientales. Entre estos últimos destacan las condiciones de operación (composición del medio, temperatura, pH y otras) y la modalidad de cultivo entre las que distinguimos el cultivo por lotes y el cultivo por lotes alimentados o semicontinuo.

El cultivo por lotes se define como aquel que se realiza sin intercambio de materia con los alrededores, salvo lo referente a los gases (aireación, producción de dióxido de carbono y otros) que se suministran y retiran del sistema en forma continua. En esta modalidad de cultivo se adicionan

inicialmente los nutrientes y luego se inocula con una determinada cantidad de células viables.

Para que un cultivo sea por lotes, se deben de cumplir ciertas características:

- Todas las células que componen a la población deberán reproducirse a intervalos regulares.
- No existan sustancias inhibitoras del crecimiento.
- La composición del medio tiene que ser simple, en especial en cuanto a las fuentes de carbono y nitrógeno.

Estas condiciones son presentadas gráficamente en una Curva de Crecimiento.

La grafica peso seco o biomasa (g/L) vrs. tiempo de incubación en horas (h). La curva presenta varias zonas o fases:

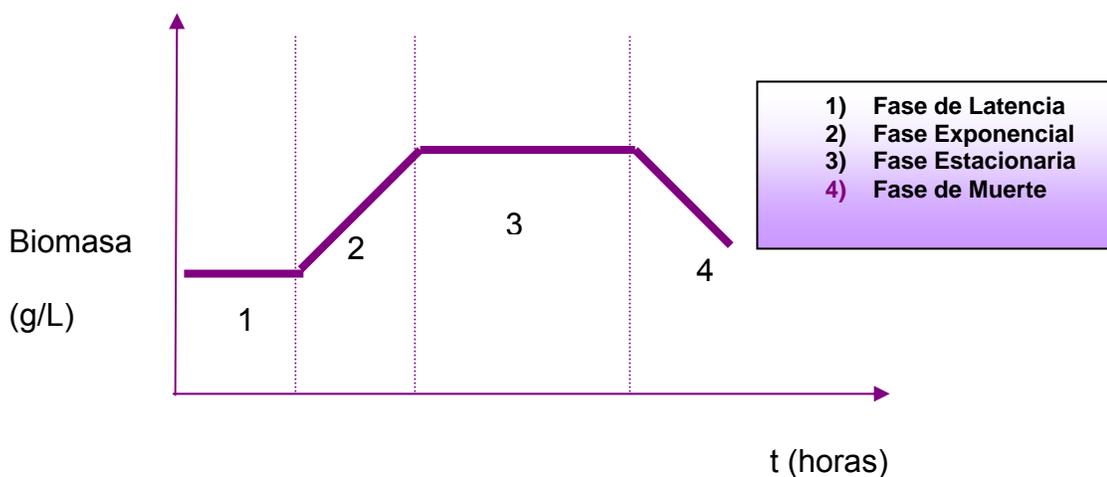


Fig. N°.3: CURVA DE CRECIMIENTO EN UN CULTIVO POR LOTES.

- Fase de latencia: Se produce inmediatamente después de la inoculación. En ella no hay iniciación de replicación de ADN ni separación de nuevas células.

Se produce el reacomodo de la composición macro molecular al nuevo ambiente en que se encuentran las células inoculadas.

- Fase de crecimiento exponencial o logarítmico: Las células se reproducen a una velocidad que es la máxima de todas las fases de crecimiento, por no existir limitación de nutrientes.
- Fase estacionaria: Se alcanza cuando se agota un nutriente, razón por la cual se detiene el crecimiento.
- Fase de muerte: Esta fase se presenta en aquellos cultivos en los que se inducen enzimas autolíticas en condiciones de inanición.

3.7.3 Evaluación de la Cinética de Crecimiento Microbiano

La evaluación de la cinética de crecimiento microbiano de un cultivo por lotes implica la medición del crecimiento de los microorganismos, consumo de nutrientes y formación de productos.

3.7.3.1 Crecimiento de Microorganismos ⁽³⁾.

3.7.3.1.1 Velocidad Volumétrica de generación de células microbianas por peso seco ⁽³⁾

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1} = \frac{d \ln X}{dt}$$

donde:

μ : velocidad volumétrica (g / L h)

X_2 : gramos de biomasa en el tiempo final

X_1 : gramos de biomasa en tiempo inicial

t_2 : tiempo final en horas

t_1 : tiempo inicial en horas

3.7.3.1.2 Velocidad Específica de generación de células microbianas por peso seco ⁽³⁾

$$\mu' = \frac{1}{X} \times \frac{d \ln X}{dt}$$

donde:

μ' : velocidad específica (g / L h)

X: gramos de biomasa / litros de muestra analizada

$d \ln X / dt$: velocidad volumétrica de biomasa

3.7.3.2 Consumo de nutrientes (Sustrato o Sacarosa).⁽³⁾

3.7.3.2.1 Velocidad Volumétrica de consumo de Sustrato

$$QS = \frac{S_2 - S_1}{t_2 - t_1} = \frac{-dS}{dt} \quad , \text{ por lo tanto } QS = -dS/dt$$

donde:

QS: Velocidad volumétrica de consumo de sustrato (g / L h)

S₂: Concentración (g/L) de sustrato en el tiempo final

S₁: Concentración (g/L) de sustrato en el tiempo inicial.

t₂: tiempo final en horas

t₁: tiempo inicial en horas

Las unidades son:

Gramos de sustrato consumidos

Litro x hora

3.7.3.2.2 Velocidad específica de consumo de sustrato⁽³⁾

$$qS = \frac{-1}{X} \times \frac{-dS}{dt}$$

donde:

qS: Velocidad específica de consumo de sustrato (g/L.h)

-dS/dt: velocidad volumétrica de consumo de sustrato

X: gramos de biomasa / litros de muestra analizada

Las unidades son:

Gramos de sustrato consumidos

Gramos de biomasa x hora

3.7.3.3 Formación de Producto ⁽³⁾

3.7.3.3.1 Velocidad volumétrica de formación de productos

$$QP = \frac{P_2 - P_1}{t_2 - t_1} = \frac{dP}{dt} \quad , \text{ por lo tanto } QP = dP/dt$$

donde:

QP: Velocidad volumétrica de producción de Ácido glutámico (g / L h)

P₂: Concentración (g/L) de Ácido Glutámico en el tiempo final

P₁: Concentración (g/L) de Ácido glutámico en el tiempo inicial.

t₂ : tiempo final en horas

t₁ : tiempo inicial en horas

Las unidades son:

Gramos de producto formado

Litro x hora

3.7.3.3.2 Velocidad Específica de Formación de Productos ⁽³⁾

$$qP = \frac{1}{X} \times \frac{dP}{dt}$$

donde:

qP: Velocidad específica de producción de Ácido glutámico (g / L h)

dP/dt: velocidad volumétrica de producción de ácido glutámico

X: gramos de biomasa / litro de muestra analizada

Las unidades son:

Gramos de producto formado

Gramos de biomasa x hora

3.7.3.4 Rendimiento en el Cultivo ⁽³⁾

$$Y_{p/s} = \frac{dP}{-dS}$$

donde:

Y_{p/s}: gramos de ácido glutámico / gramos de sustrato consumido

dP: gramos de ácido glutámico

-dS: gramos de sustrato consumido

Las unidades son:

Gramos de producto

Gramos de sustrato consumido

CAPÍTULO IV
DISEÑO METODOLÓGICO

4.0 Diseño Metodológico

Tipo de estudio Prospectivo, dividido en tres etapas:

4.1 Investigación bibliográfica:

- Biblioteca del Ministerio de Economía (MINEC).

- Biblioteca de la Universidad Alberto Masferrer (USAM)

- Internet

4.2 Investigación de campo

Se realizó un muestreo puntual dirigido a la obtención de la carne de soya comercial que se utilizó en el proceso de fermentación que fue adquirida en el supermercado “Super Selectos” del sector de la Residencial San Luis.

4.3 Parte experimental:

4.3.1 Preparación del Agar Czapek, Medio 33 y reactivos (ver anexos 1, 9 y 10).

4.3.2 Procedimiento para el proceso de fermentación⁽³⁾. (Anexo 15)

4.3.2.1 Procedimiento de preparación de muestra: carne de soya.

- Pesar en una balanza granataria 30g de carne de soya comercial deshidratada y transferirla a un mortero.
- Adicionar 10 mL de agua destilada estéril para su hidratación.
- Triturar con la ayuda de un pistilo hasta obtener una solución pastosa.
- Dejar en reposo.

4.3.2.2 Aislamiento del hongo *Aspergillus* a partir de la carne de soya. ⁽³⁾

- Preparar 1000 mL de Agar Czapek más ninhidrina al 5% (ver anexo 10).
- Seleccionar 20 placas de petri limpias, empacar y esterilizar a 121 °C por 15 minutos en autoclave, dejar enfriar a temperatura ambiente.
- Adicionar aproximadamente 20 mL de agar Czapek estéril a una temperatura de 40°C en cada placa, dejar solidificar y refrigerar.
- Sembrar la carne de soya, preparada en el numeral 4.3.2.1, en 10 placas de petri con el agar Czapek más ninhidrina al 5%, con la ayuda de un hisopo estéril estriar en cada placa. Las demás placas de petri serán utilizadas para la multiplicación del hongo (numeral 4.3.2.3).

- Realizar bajo condiciones ambientales estériles, para evitar una posible contaminación.
- Sellar y rotular las placas con la fecha de sembrado y enumerarlas del 1 al 10.
- Incubar a 28 °C por una semana.
- Observar el crecimiento del hongo diariamente, la coloración de las colonias, características que presentan y la coloración del halo alrededor de las colonias.

4.3.2.3 Multiplicación del Hongo ⁽³⁾ (Ver anexo 15).

- Seleccionar las placas que muestran mayor crecimiento del hongo verde y mayor intensidad en el halo color violeta alrededor de sus colonias del numeral 4.3.2.2.
- Sembrar el hongo en las 10 placas de petri con Agar Czapek más ninhidrina (ver numeral 4.3.2.2), estriando suavemente sobre cada placa.
- Sellar y rotular las placas con la fecha de sembrado y enumerarlas del 1 al 10.
- Incubar a 28°C por 1 semana junto con las 10 placas en las cuales se aisló el hongo (4.3.2.2).
- Observar el crecimiento y multiplicación del hongo así como la formación del halo de color violeta alrededor de sus colonias.

4.3.2.4 Preparación del Bioreactor ⁽³⁾

- Lavar con agua y jabón el bioreactor de 3 litros de capacidad.
- Enjuagarlo con agua hirviendo.
- Limpiar el interior con alcohol isopropílico; dejar evaporar el alcohol.
- Agregar agua destilada estéril para eliminar los restos de alcohol isopropílico.
- Dejar escurrir hasta que esté completamente seco.

4.3.3 Fermentación⁽³⁾

- Preparar 2.5 L de medio 33 (ver anexo 9)
- Tomar una alícuota de 60mL del medio 33 y transferirla a un erlenmeyer de 125 mL y rotular la muestra como “hora 0”. Refrigerar.
- Proceder de la siguiente manera con cada una de las 20 placas de la multiplicación y del aislamiento del hongo (numerales 4.3.2.2 y 4.3.2.3):
- Colocar la placa sobre el bioreactor que contiene el medio 33, en posición vertical.
- Arrastrar todas las esporas del hongo con la ayuda de un asa estéril y sembrarlas en el medio 33, bajo condiciones estériles. Repetir el mismo procedimiento para las demás placas (20 placas).
- Preparar el equipo de fermentación: soporte, motor del fermentador, agitador de propela, y bomba de oxígeno.
- Agregar 10 gotas de aceite mineral al medio para evitar la formación de espuma en el momento que inicie la agitación constante.

- Encender el agitador de propela y la bomba de oxígeno para iniciar la agitación constante.
- Cubrir el bioreactor de 3 litros que contiene al medio y el hongo con papel aluminio.
- Mantener la agitación durante todo el proceso de fermentación.
- Tomar una alícuota de 60 mL del medio con el hongo sembrado al transcurrir 24, 48, 72, 89, 144, 168 y 192 horas; con la ayuda de una pipeta de Mohr de 20 mL.
- Transferir la muestra a un erlenmeyer de 125 mL. Rotular y almacenar en refrigeración.

4.3.4 Tratamiento de Muestras ⁽³⁾

4.3.4.1 Determinación de Biomasa por el Método de Peso Seco.

- Cortar el papel filtro en 8 porciones cuadradas y proceder de la siguiente manera para cada porción de papel filtro: (ver Anexo 12)
- Secar una porción de papel filtro a una temperatura de 75°C por 2 horas y enfriar en un desecador por 30 minutos.
- Pesar el papel filtro que ha sido previamente secado.
- Filtrar los 60 mL de la muestra recolectada durante el proceso de fermentación y recibir el filtrado en un erlenmeyer estéril de 125 mL rotulado. Guardar el filtrado para realizar otras determinaciones.

- Lavar el papel filtro con tres porciones de 5 mL de agua destilada estéril y recibir los lavados en un vaso de precipitado de 100 mL.
- Colocar el papel filtro pre- pesado sobre una placa de petri y someterlo a una temperatura de 75°C por 2 horas; enfriar en un desecador por 30 minutos.
- Pesar el papel filtro en balanza analítica y por diferencia de peso, determinar la biomasa, la cual representará en cada muestra el crecimiento o decrecimiento microbiano.

Nota: Proceder de igual manera para las muestras recolectadas a las 0, 24, 48, 72, 89, 144, 168 y 192 horas.

4.3.4.2 Elaboración de la Curva Estándar de Sacarosa. ⁽³⁾ (Anexos 3 y 13)

- Pesar 0.02 g de sacarosa estándar y transferirla a un balón volumétrico de 100 mL.
- Adicionar al balón 30 mL de agua destilada. Agitar hasta su completa disolución.
- Aforar con agua destilada para obtener una concentración de 200 µg/mL. Homogenizar.
- Preparar a partir de la solución de sacarosa, las soluciones que se detallan en el anexo 3.
- Llevarlas a temperatura ambiente.
- Leer la absorbancia en el Spectronic 20-D a una longitud de onda de 490 nm.
- Utilizar como blanco la solución del tubo número 1, (anexo 3).

- Llevar triplicados de todas las soluciones.
- Anotar las absorbancias y graficar una curva de absorbancia vrs concentración

4.3.4.3 Determinación de Azúcares por el Método de Fenol-Sulfúrico ⁽³⁾

La determinación de azúcares totales se realizará en el filtrado obtenido en la determinación de Biomasa por peso seco. (numeral 4.3.4.1)

- Seguir el ejemplo del tubo número 6 para la preparación de las muestras (anexos 3 y 13)
- Medir volumétricamente 10 mL del filtrado. Colocarlos en un tubo de ensayo rotulado, adicionar 1 mL de solución de sulfato de zinc al 10% y 1mL de hidróxido de sodio 0.5 M, utilizando para ello pipetas Mohr, la adición de estos reactivos es para desproteínizar las muestras.
- Dejar reposar por 15 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar por 15 minutos a 1000 rpm y utilizar el sobrenadante obtenido para la cuantificación de azúcares.
- Tomar una alícuota de 2.5 mL del sobrenadante y adicionar 2.5 mL de agua destilada, 0.1 mL de fenol al 80%. Sumergir los tubos en baño de hielo y adicionar lentamente 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, utilizar pipetas de Morh.
- Agitar y dejar reposar por 30 minutos exactos a temperatura ambiente.
- Proceder a leer inmediatamente en el Spectronic 20-D a una longitud de onda de 490 nm.

- Repetir el mismo procedimiento para las muestras recolectadas a las 0, 24, 48, 72, 89, 144, 168 y 192 horas, llevando cada muestra por triplicado.

4.3.4.4 Elaboración de la curva Estándar de Ácido Glutámico ⁽³⁾

- Pesar 0.02 g de ácido glutámico y transferirlos a un balón volumétrico de 100 mL.
- Adicionar al balón 30 mL de agua destilada. Agitar hasta su completa disolución.
- Aforar con agua destilada para obtener una concentración de 200 µg/mL. Homogenizar.
- Preparar a partir de la solución de ácido glutámico las soluciones indicadas en anexo 6.
- Antes de adicionar la acetona al 75%, calentar cada tubo en baño de María a 80°C por 10 minutos y enfriar a temperatura ambiente. Agitar.
- Leer la absorbancia de cada tubo, en el Spectronic 20-D a una longitud de onda de 570 nm.
- Utilizar como blanco la solución del tubo número 1, anexo 6.
- Llevar triplicados de todas las soluciones.
- Anotar las absorbancias y graficar una curva de absorbancia vrs concentración.

4.3.4.5 Determinación de Ácido Glutámico en las muestras ⁽³⁾

La determinación de Ácido glutámico se realizará en el filtrado obtenido en la determinación de Biomasa por peso seco (numeral 4.3.4.1).

- Seguir el ejemplo del tubo número 6 (anexo 6) para la preparación de las muestras
- Medir una alícuota de 2.5 mL del filtrado, colocarlos en un tubo de ensayo y adicionar 2.5 mL de agua destilada. Agregar 1mL de solución de ninhidrina.
- Agitar, calentar cada tubo en baño María por 5 minutos a 75°C. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
- Adicionar 7 mL de acetona y homogenizar.
- Leer la absorbancia de cada tubo, en el Spectronic 20-D a una longitud de onda de 570 nm.
- Repetir el mismo procedimiento para las muestras recolectadas a las 0, 24, 48, 72, 89, 144, 168 y 192 horas, llevando cada muestra por triplicado.

4.3.4.6 Determinación de Grados Brix ⁽³⁾

- Con la ayuda de un agitador transferir una gota del filtrado (obtenido en el numeral 4.3.4.1) y colocarla en el porta muestra del brixómetro. Cerrar el porta muestra.
- Proceder a hacer la lectura orientando el brixómetro hacia la luz para poder observar la escala del brixómetro.
- Llevar por triplicado cada muestra.

4.3.4.7 Determinación de pH ⁽³⁾

- Medir una alícuota de 20 mL del filtrado (numeral 4.3.4.1), transferir a un beaker de 30 mL.
- Llevar a temperatura de 25 °C, introducir el electrodo del pHmetro en el filtrado y dejar que se estabilice para proceder a hacer las lecturas.
- Repetir este procedimiento para todas las muestras.
- Llevar por triplicado cada muestra.

CAPÍTULO V
RESULTADOS

5.0 Resultados e Interpretación de Resultados

5.1 Determinación de Biomasa

Tabla N°2: DETERMINACIÓN DE BIOMASA POR EL MÉTODO DE PESO SECO

Peso de Papel sin Mx (g)	Peso Papel + Mx (g)	Peso de Papel Con Mx – Peso Papel sin Mx (g)	Biomasa g / L	Tiempo (h)	ln X
0.9640	1.2550	0.2910	4.85	0	1.5790
0.9600	1.2570	0.2970	4.95	24	1.5994
0.9360	1.2585	0.3225	5.38	48	1.6827
0.9340	1.3730	0.4390	7.32	72	1.9906
0.9265	1.4420	0.5155	8.59	89	2.1506
0.9250	1.5600	0.6350	10.58	144	2.3590
0.9200	1.5625	0.6425	10.71	168	2.3712
0.9245	1.5700	0.6455	10.76	192	2.3758

donde:

X: gramos de biomasa / litros de muestra analizada

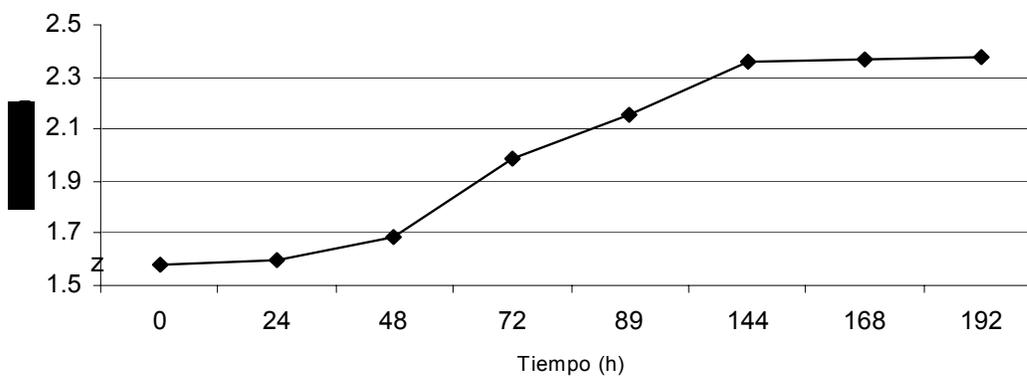


Fig N°4: Gráfica de ln vrs Tiempo (h).

La fig N°4 muestra la producción de biomasa a medida transcurre el tiempo durante la fermentación. En dicha gráfica se observa un comportamiento constante durante el período que comprende de las 0 a las 24 horas. La producción aumenta desde las 24 hasta las 144 horas; a partir de este período se observó una tendencia constante hasta el final del proceso fermentativo (192 horas). La mayor producción de biomasa se da a las 144 horas.

De acuerdo a lo anterior la fase de latencia se desarrolló de las cero hasta las 24 horas, la fase exponencial desde las 24 hasta las 144 horas y la fase estacionaria dentro del rango de las 144 a las 192 horas. No se observó la fase de muerte, debido a que el período establecido para esta investigación comprendió únicamente el proceso de fermentación de 0 hasta 192 horas.

5.1.1 Velocidad Volumétrica de Biomasa por Método de Peso Seco ⁽³⁾.

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1} = \frac{d \ln X}{dt}$$

donde:

μ : velocidad volumétrica (g / L h)

X_2 : gramos de biomasa en el tiempo final

X_1 : gramos de biomasa en tiempo inicial

t_2 : tiempo final en horas

t_1 : tiempo inicial en horas

Para $t_2 = 24$ horas

$$\mu = (1.5994 - 1.5790) / 24 \text{ horas}$$

$$\mu = 8.5 \times 10^{-4} \text{ g /L h}$$

Tabla N°3: RESULTADOS DE VELOCIDAD VOLUMÉTRICA DE BIOMASA POR PESO SECO

Velocidad Volumétrica (g /L h)	Tiempo (h)
0.00	0
8.50×10^{-4}	24
2.16×10^{-3}	48
5.72×10^{-3}	72
6.42×10^{-3}	89
5.42×10^{-3}	144
4.72×10^{-3}	168
4.15×10^{-3}	192

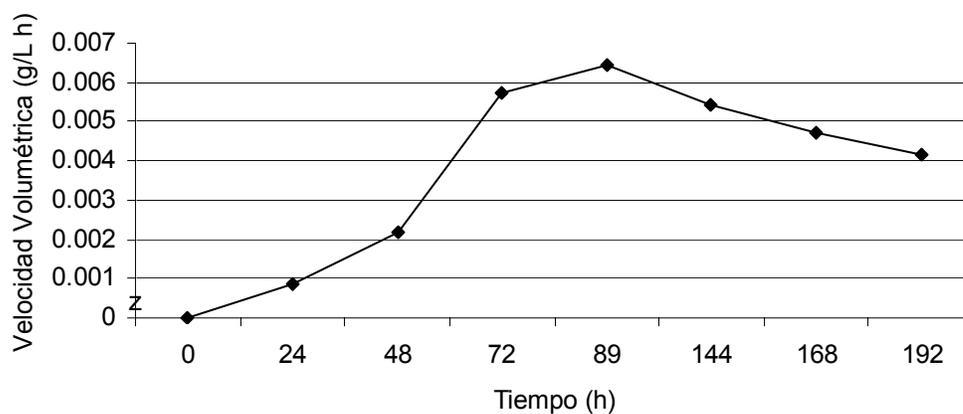


Fig. N°5: Gráfica Velocidad volumétrica de Biomasa (g/L h) vrs Tiempo (h).

En la fig. N°5 se observa la relación entre la velocidad volumétrica, la cual representa la producción de biomasa total (células microbianas del hongo), en el medio de fermentación sobre el tiempo total.

De acuerdo a ésta gráfica se observa un leve incremento de la velocidad volumétrica a las 24 horas, la cual continúa en aumento hasta las 89 horas, período que corresponde a la fase exponencial, en la cual se llevó a cabo la mayor producción de biomasa. La velocidad volumétrica disminuyó durante la fase estacionaria.

5.1.3 Velocidad Específica de Biomasa por Método de Peso Seco⁽³⁾.

$$\mu' = \frac{1}{X} \times \frac{d \ln X}{dt}$$

donde:

μ' : velocidad específica (g / L h)

X : gramos de biomasa / Litros de muestra analizada

$d \ln X / dt$: velocidad volumétrica de biomasa por Método de Peso Seco

Para $t_2 = 24$ horas

$$\mu' = (1/4.95)(8.50 \times 10^{-4})$$

$$\mu' = 1.71 \times 10^{-4} \text{ g / L horas}$$

Tabla N°4: RESULTADOS DE VELOCIDAD ESPECÍFICA DE BIOMASA

Velocidad Específica de generación de células microbianas (g /L h)	Tiempo (h)
0.00	0
1.71×10^{-4}	24
4.01×10^{-4}	48
7.81×10^{-4}	72
7.47×10^{-4}	89
5.12×10^{-4}	144
4.41×10^{-4}	168
3.86×10^{-4}	192

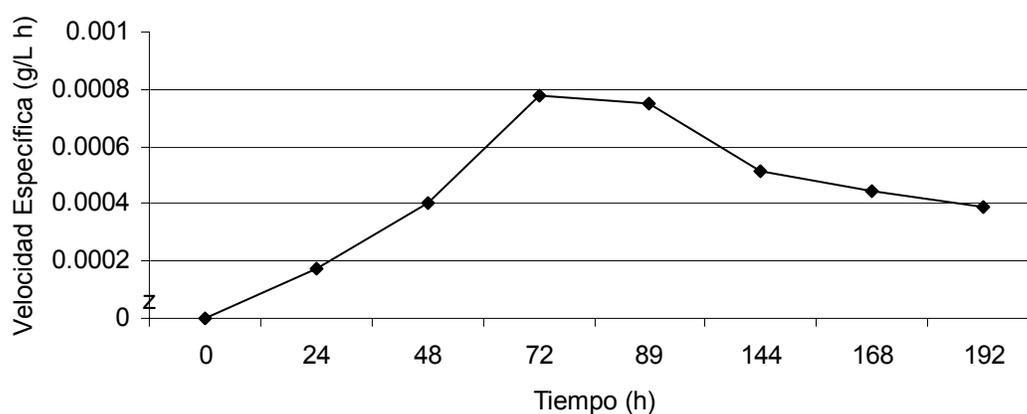


Fig. N°6: Gráfica de Velocidad específica de Biomasa (g/Lh) vrs Tiempo(h).

La fig N°6, describe la cantidad de biomasa (células microbianas del hongo), que se produce en un tiempo determinado del proceso fermentativo.

Según esta figura, se muestra una mayor tendencia de crecimiento microbiano a las 72 horas, período contemplado dentro de la fase exponencial; es decir que es en esta etapa de la fase exponencial donde los microorganismos se reproducen a mayor velocidad.

5.2 Determinación de sustrato (Azúcares totales y consumidos)

Los resultados de absorbancia que se presentan en la siguiente tabla son los promedios de los datos obtenidos al analizar por triplicado cada uno de los tubos. (anexo 4)

Tabla N° 5: CURVA ESTÁNDAR DE SACAROSA

Tubo No.	mL de sln estándar	mg de estándar	Concentración (mg/mL)	Absorbancia
1	0.0	0.0	0.00	0.00
2	0.5	0.1	0.02	0.08
3	1.0	0.2	0.04	0.21
4	1.5	0.3	0.06	0.36
5	2.0	0.4	0.08	0.49
6	2.5	0.5	0.10	0.63
7	3.0	0.6	0.12	0.76
8	3.5	0.7	0.14	0.89
9	4.0	0.8	0.16	0.97
10	4.5	0.9	0.18	1.05
11	5.0	1.0	0.20	1.35

Tabla N° 6: APLICACIÓN DEL MÉTODO DE MÍNIMOS CUADRADOS

Concentración (x)	Absorbancia (y)	x ²	y ²	xy
0.00	0.00	0.0000	0.0000	0.0000
0.02	0.08	0.0004	0.0064	0.0016
0.04	0.21	0.0016	0.0441	0.0084
0.06	0.36	0.0036	0.1296	0.0216
0.08	0.49	0.0064	0.2401	0.0392
0.10	0.63	0.0100	0.3969	0.0630
0.12	0.76	0.0144	0.5776	0.0912
0.14	0.89	0.0196	0.7921	0.1246
0.16	0.97	0.0256	0.9409	0.1552
0.18	1.05	0.0324	1.1025	0.1890
0.20	1.35	0.0400	1.8225	0.2700
Σ = 1.10	Σ = 6.79	Σ = 0.1540	Σ = 6.0527	Σ = 0.9638

5.2.1 Aplicación del Método de Mínimos Cuadrados

La relación entre la concentración y la absorbancia es lineal; sin embargo no todos los puntos caen exactamente en la recta, lo cual se debe a errores aleatorios en el proceso de medición. Por lo tanto se debe tratar de trazar la “mejor” línea recta a través de los puntos. La técnica estadística conocida como método de los mínimos cuadrados nos da los medios para la elaboración objetiva de una ecuación para esta línea.

Ecuación lineal: $y = mx + b$

donde:

m : pendiente

b : intercepto

x : concentración

y : absorbancia

$$m = S_{xy} / S_{xx}$$

$$S_{xy} = \sum xy - \frac{\sum x \sum y}{N}$$

$$S_{xy} = 0.9638 - \frac{(1.1)(6.79)}{11}$$

$$S_{xy} = 0.2848$$

$$S_{xx} = \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{N}$$

$$S_{xx} = 0.154 - \frac{(1.1)^2}{11}$$

$$S_{xx} = 0.044$$

$$m = 0.2848 / 0.044$$

$$m = 6.47 \cong 6.5$$

$$b = \frac{\sum y}{N} - m \frac{\sum x}{N}$$

$$b = 6.79/11 - [(6.47)(1.1)/11]$$

$$b = -0.029 \cong -0.03$$

$$y = 6.5 x - 0.03 \quad \text{Ecuación de la curva idealizada}$$

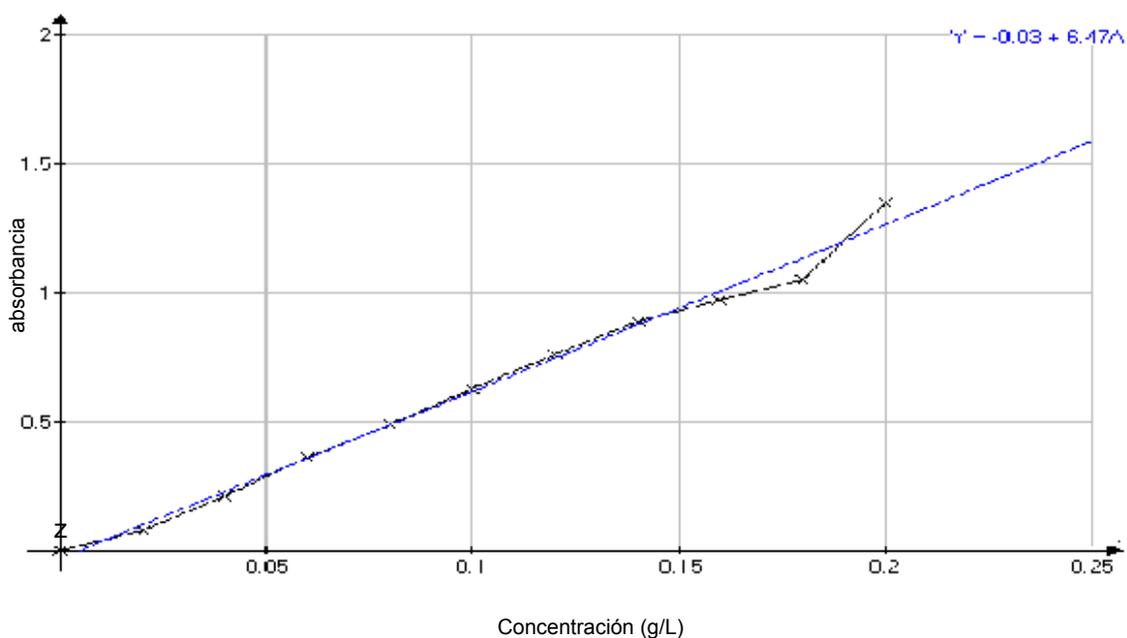


Fig. N°7: Curva idealizada de Sacarosa.

La Fig. N°7, representa la curva idealizada de sacarosa, la cual proporciona los datos corregidos por el método de mínimos cuadrados; para interpolar la absorbancia (y) de las muestras analizadas y determinar la concentración (x).

5.2.2 Resultados de Muestras Analizadas

Ecuación de la curva idealizada: $y = 6.5 x - 0.03$

Al despejar x: $x = (y + 0.03) / 6.5$

Al sustituir y por la absorbancia de la muestra a las cero horas:

$$x = (0.175 + 0.03) / 6.5 \quad x = 0.03154 \text{ mg / mL}$$

Tabla N°7: RESULTADOS DE LA INTERPOLACIÓN DE LAS MUESTRAS EN CURVA IDEALIZADA.

Tiempo (h)	Absorbancia	Concentración (mg)	Factor de Dilución	Concentración (mg/mL)	Concentración (g/L)
0	0.175	0.03154	10	0.3154	0.3154
24	0.136	0.02554	10	0.2554	0.2554
48	0.041	0.01092	10	0.1092	0.1092
72	0.038	0.01046	10	0.1046	0.1046
89	0.468	0.07662	---	0.07662	0.07662
144	0.465	0.07615	---	0.07615	0.07615
168	0.461	0.07554	---	0.07554	0.07554
192	0.461	0.07554	---	0.07554	0.07554

La absorbancia que se contempla en la tabla N°7, es el promedio de los análisis triplicados (anexo 5).

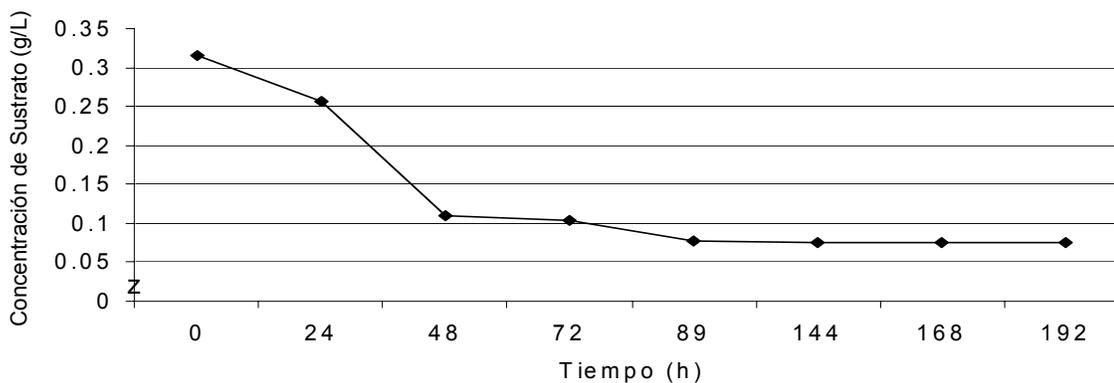


Fig. N°8: Gráfica de Concentración de azúcares en muestras(g/L) vrs Tiempo(h).

La Fig. N°8, permite observar la tendencia de los resultados de la concentración, obtenidos por la interpolación de las absorbancias de las muestras analizadas en la gráfica idealizada, durante el tiempo del proceso fermentativo. Conforme a los datos representados en dicha gráfica, el consumo de sustrato inicia a las 24 horas, el mayor consumo se observa durante la fase exponencial, específicamente a las 89 horas. En la fase estacionaria la concentración de sustrato se mantiene constante.

5.2.3 Velocidad Volumétrica de Consumo de Sustrato ⁽³⁾.

$$QS = \frac{S_2 - S_1}{t_2 - t_1} = \frac{-dS}{dt}$$

donde:

QS: Velocidad volumétrica de consumo de sustrato (g / L.h)

S₂: Concentración (g/L) de sustrato en el tiempo final

S₁: Concentración (g/L) de sustrato en el tiempo inicial.

t₂ : tiempo final (h)

t₁ : tiempo inicial (h)

para t₂ = 24 horas

$$QS = 0.2554 - 0.3154 / 24$$

$$QS = -0.0025 \text{ g/ L h}$$

Tabla N°8: RESULTADOS DE VELOCIDAD VOLUMÉTRICA DE CONSUMO DE SUSTRATO.

Concentración (g/L)	QS (g/ L h)	Tiempo (h)
0.31540	0.000	0
0.25540	-0.0025	24
0.10920	-0.0043	48
0.10460	-0.0029	72
0.07662	-0.0027	89
0.07615	-0.0017	144
0.07554	-0.0014	168
0.07554	-0.0012	192

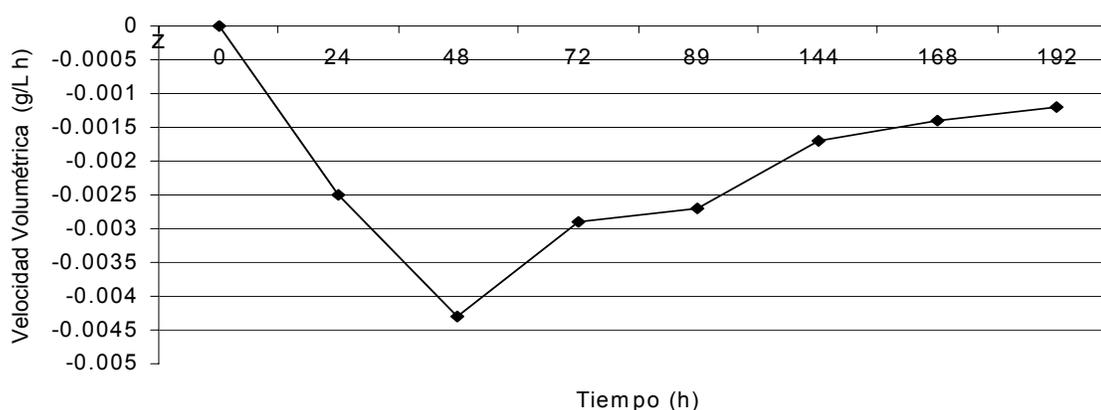


Fig. N°9: Gráfica de Velocidad volumétrica de consumo de Sustrato (g/Lh) vrs Tiempo(h).

La figura N°9 describe la velocidad en la cual se consume el sustrato total en el medio de fermentación durante el proceso.

La gráfica demuestra que a las 48 horas ocurre el máximo consumo de sustrato por el hongo *Aspergillus niger* para llevar a cabo su reproducción y metabolizar el ácido glutámico.

5.2.4 Velocidad Específica de Consumo de Sustrato ⁽³⁾.

$$q_S = \frac{-1}{X} \times \frac{-dS}{dt} \quad \text{donde:}$$

q_S : Velocidad específica de consumo de sustrato (g/L.h)

dS/dt : velocidad volumétrica de consumo de sustrato

X : gramos de biomasa / Litro de muestra analizada

Para $t_2 = 24$ horas

$$q_S = (-1 / 4.95)(-0.0025) \quad q_S = 5.05 \times 10^{-4} \text{ g / L h}$$

Tabla N° 9: RESULTADOS VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CONSUMO DE SUSTRATO

Concentración (g/L)	q_S (g/ L h)	Tiempo (h)
0.31540	0.00	0
0.25540	5.05×10^{-4}	24
0.10920	7.99×10^{-4}	48
0.10460	3.96×10^{-4}	72
0.07662	3.14×10^{-4}	89
0.07615	1.61×10^{-4}	144
0.07554	1.31×10^{-4}	168
0.07554	1.30×10^{-4}	192

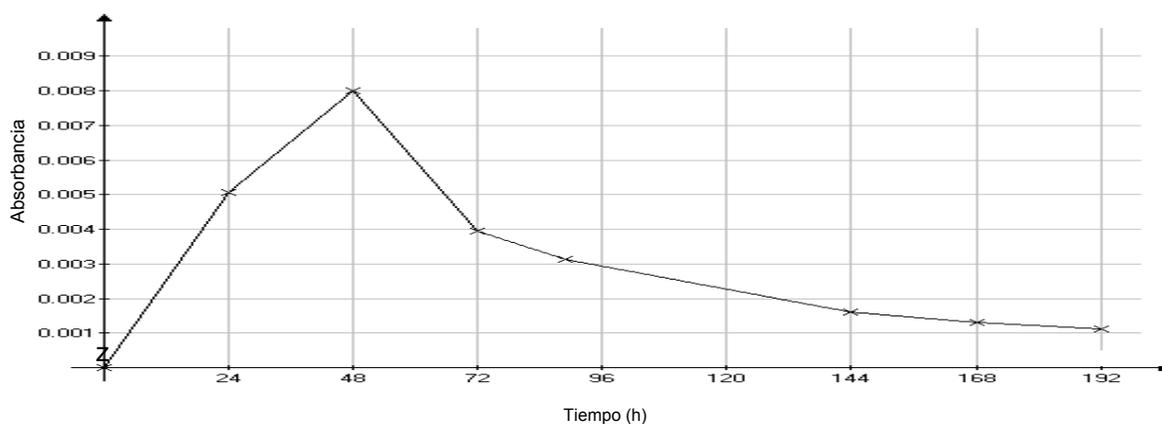


Fig. N°10: Velocidad específica de consumo de Sustrato(g/Lh) vrs Tiempo (h)

La figura N°10 describe la rapidez con la que se va consumiendo el sustrato en un tiempo específico durante el proceso de fermentación.

Según la gráfica (Figura N°10), se muestra una mayor velocidad de consumo de sustrato a las 48 horas, período contemplado dentro de la fase exponencial; es decir que es en esta etapa de dicha fase donde se consume la mayor cantidad de sustrato.

5.3 Determinación del Rendimiento de Ácido Glutámico⁽³⁾.

5.3.1 Curva Estándar de Ácido Glutámico

Tabla N°10: CURVA ESTÁNDAR DE ÁCIDO GLUTÁMICO

Tubo No.	mL de sln estándar	mg de estándar	Concentración (mg/mL)	Absorbancia
1	0.0	0.0	0.00	0.0
2	0.5	0.1	0.02	0.39
3	1.0	0.2	0.04	0.61
4	1.5	0.3	0.06	0.79
5	2.0	0.4	0.08	0.91
6	2.5	0.5	0.10	1.10
7	3.0	0.6	0.12	1.27
8	3.5	0.7	0.14	1.45
9	4.0	0.8	0.16	1.61
10	4.5	0.9	0.18	1.73
11	5.0	1.0	0.20	1.98

La absorbancia detallada en la Tabla N°10 es el promedio de los análisis hechos por triplicado (anexo 7).

Tabla N° 11: RESULTADOS DE LA APLICACIÓN DEL MÉTODO DE LOS MÍNIMOS CUADRADOS PARA LA CURVA DE AG

Concentración (mg/mL) = x	Absorbancia (y)	x ²	y ²	xy
0.00	0.00	0.0000	0.0000	0.0000
0.02	0.39	0.0004	0.1521	0.0078
0.04	0.61	0.0016	0.3721	0.0244
0.06	0.79	0.0036	0.6241	0.0474
0.08	0.91	0.0064	0.8281	0.0728
0.10	1.10	0.0100	1.2100	0.1100
0.12	1.27	0.0144	1.6129	0.1524
0.14	1.45	0.0196	2.1025	0.2030
0.16	1.61	0.0256	2.5921	0.2576
0.18	1.73	0.0324	2.9929	0.3114
0.20	1.98	0.0400	3.9204	0.3960
Σ = 1.10	Σ = 11.84	Σ = 0.1540	Σ = 16.4072	Σ = 1.5828

5.3.2 Aplicación del Método de Mínimos Cuadrados

Ecuación lineal: $y = mx + b$; donde:

m : pendiente

x : concentración

b : intercepto

y : absorbancia

$$m = S_{xy} / S_{xx}$$

$$S_{xy} = \sum xy - \frac{\sum x \sum y}{N}$$

$$S_{xy} = 1.5828 - [(1.1)(11.84) / 11]$$

$$S_{xy} = 0.3988$$

$$S_{xx} = \sum x^2 - (\sum x)^2 / N$$

$$S_{xx} = 0.154 - (1.1)^2 / 11$$

$$S_{xx} = 0.044$$

$$m = 0.3988 / 0.044$$

$$m = 9.06$$

$$b = \sum y / N - m \sum x / N$$

$$b = 1.0764 - [(9.06)(0.10)]$$

$$b = 0.17$$

$$y = 9.06x + 0.17 \quad \text{Ecuación de la curva idealizada}$$

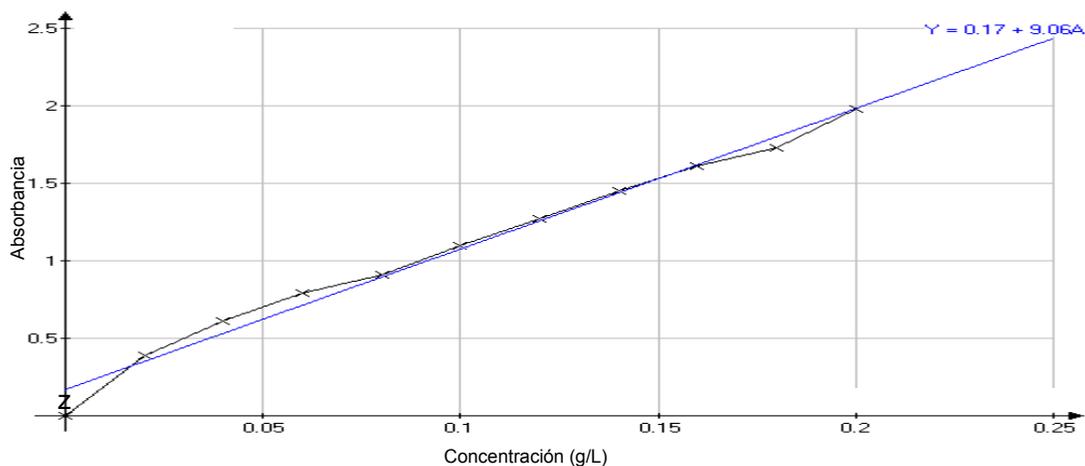


Fig. N°11: Curva idealizada de Ácido Glutámico.

La Fig N°11, representa la curva idealizada de Ácido Glutámico, la cual proporciona los datos corregidos por el método de mínimos cuadrados; para interpolar la absorbancia (y) de las muestras analizadas y determinar la concentración (x).

5.3.3 Resultados de Muestras Analizadas

Resultados de Muestras

Ecuación de la curva idealizada de Ácido Glutámico

$$x = (y - 0.17) / 9.06$$

Al despejar "x" y sustituir "y" por la absorbancia de la muestra de las cero horas:

$$x = (1.08 - 0.17) / 9.06$$

$$x = 0.100 \text{ mg}$$

Tabla N°12: RESULTADOS DE LA INTERPOLACIÓN DE LAS MUESTRAS EN LA CURVA IDEALIZADA.

Tiempo (h)	Absorbancia	Concentración (mg/mL)	Factor de Dilución	Concentración (mg/mL)	Concentración (g/L)
0	1.08	0.1004	---	0.100	0.100
24	0.59	0.0464	10	0.464	0.464
48	0.68	0.0563	10	0.563	0.563
72	0.89	0.0795	10	0.795	0.795
89	0.95	0.0861	10	0.861	0.861
144	0.68	0.0563	10	0.563	0.563
168	0.67	0.0552	10	0.522	0.522
192	0.64	0.0519	10	0.519	0.519

Las absorbancias detalladas en la tabla anterior son el promedio de los resultados obtenidos al realizar los análisis por triplicado (anexo 8)

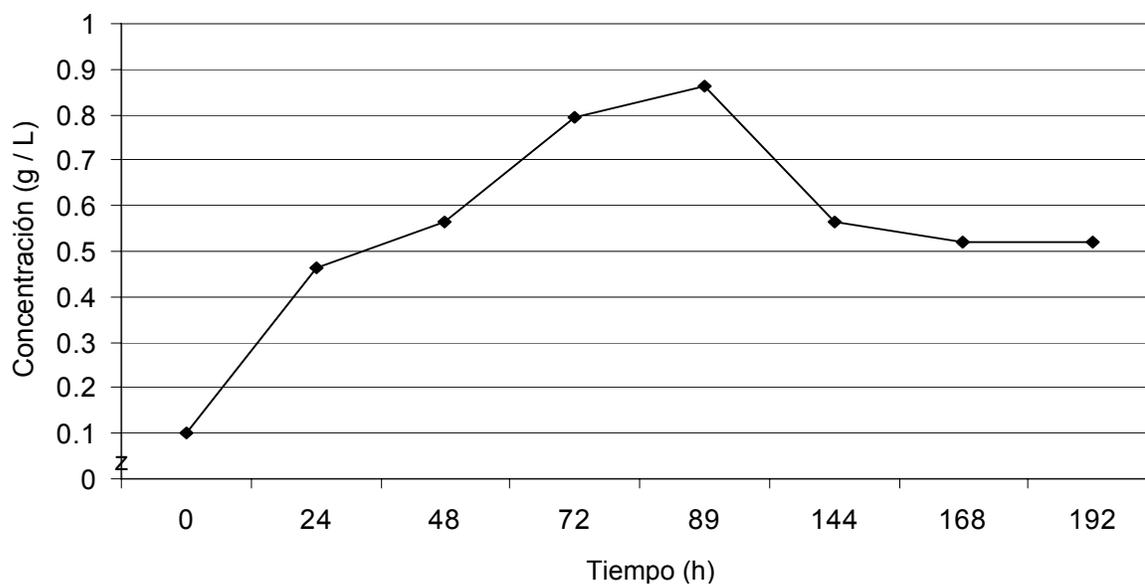


Fig. N°12: Gráfica de Concentración de muestras de Ácido Glutámico (g/L) vs Tiempo(h)

La Fig. N°12, permite observar la tendencia de los resultados de concentración de ácido glutámico en la interpolación de las absorbancias de las muestras analizadas durante el tiempo del proceso fermentativo.

De acuerdo al comportamiento que describe la grafica, en la fase de latencia inicia la producción de ácido glutámico, en la fase exponencial se observa un máximo a las 89 horas y comienza a disminuir en el período de 89 a las 144 horas. Durante el rango de las 144 y 192 horas se presenta una concentración constante de ácido glutámico.

5.3.4 Velocidad Volumétrica de Producción de Ácido Glutámico⁽³⁾.

$$QP = \frac{P_2 - P_1}{t_2 - t_1} = \frac{dP}{dt}$$

donde:

QP: Velocidad volumétrica de producción de Ácido glutámico (g / L h)

P₂: Concentración (g/L) de Ácido Glutámico en el tiempo final

P₁: Concentración (g/L) de Ácido glutámico en el tiempo inicial.

t₂ : tiempo final en horas

t₁ : tiempo inicial en horas

para t₂ = 24 horas

$$QP = 0.464 - 0.100 / 24 - 0$$

$$QP = 0.01516 \text{ g/ L h}$$

Tabla N°13: RESULTADOS DE VELOCIDAD VOLUMÉTRICA DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO GLUTÁMICO

Concentración (g/L)	QP (g/ L h)	Tiempo (h)
0.100	0	0
0.464	0.01516	24
0.563	9.646×10^{-3}	48
0.795	9.653×10^{-3}	72
0.861	8.551×10^{-3}	89
0.563	3.215×10^{-3}	144
0.522	2.512×10^{-3}	168
0.519	2.182×10^{-3}	192

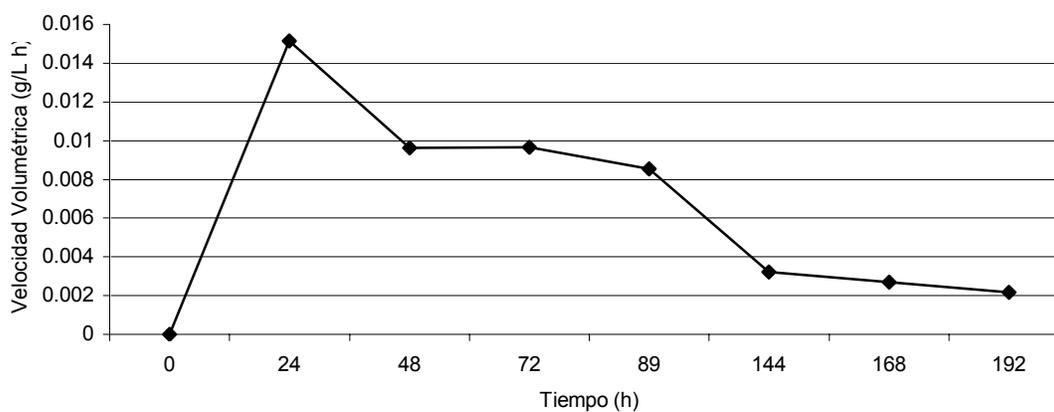


Fig. N°13: Gráfica de Velocidad volumétrica de producción de Ácido Glutámico (g/Lh) vrs Tiempo (h).

La Fig. N°13, describe la velocidad en la cual se produce el ácido glutámico por el microorganismo, en el medio de fermentación, durante el proceso.

En la gráfica, se muestra una velocidad máxima de producción de ácido glutámico desde las 24 horas, en este período es cuando inició el consumo de sustrato (Figura N°8).

La producción de aminoácido se mantiene durante toda la fase exponencial y disminuye en la fase estacionaria.

5.3.5 Velocidad Específica de formación de Ácido Glutámico⁽³⁾.

$$qP = \frac{1}{X} \times \frac{dP}{dt} \quad \text{donde:}$$

qP : Velocidad específica de producción de Ácido glutámico (g/L h)

dP/dt : velocidad volumétrica de producción de Ácido Glutámico

X : gramos de biomasa / litro de muestra analizada

para $t_2 = 24$ horas

$$qP = (1/4.95)(0.01516) \quad qP = 3.0626 \times 10^{-3} \text{ g / L h}$$

Tabla N° 14: RESULTADOS DE VELOCIDAD ESPECÍFICA DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO GLUTÁMICO.

Concentración (g/L)	qP (g/ L h)	Tiempo (h)
0.100	0.0000000	0
0.464	3.0626×10^{-3}	24
0.563	1.7929×10^{-3}	48
0.795	1.3187×10^{-3}	72
0.861	9.9546×10^{-4}	89
0.563	3.0388×10^{-4}	144
0.522	2.3455×10^{-4}	168
0.519	2.0279×10^{-4}	192

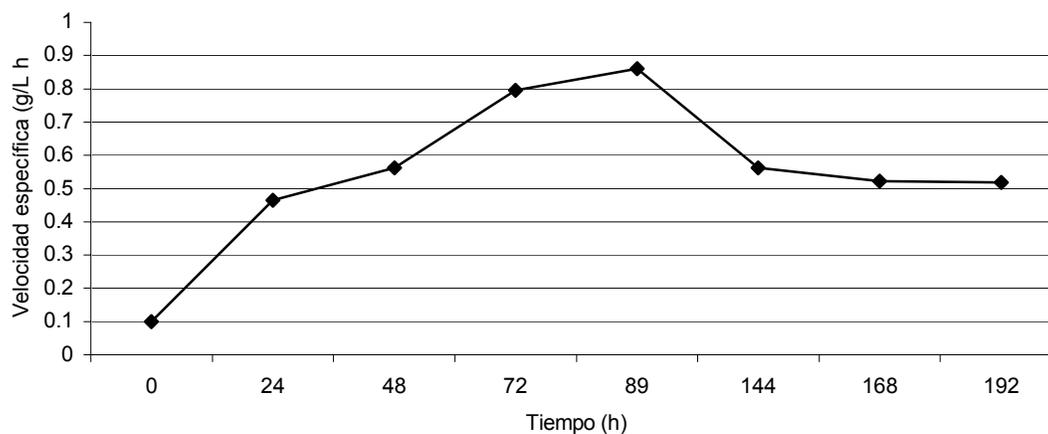


Fig. N°14: Gráfica de Velocidad específica de producción de Ácido Glutámico (g/Lh) vrs Tiempo (h).

La Fig. N°14, describe la rapidez a la que se va produciendo el ácido glutámico en un tiempo específico durante el proceso de fermentación.

En la gráfica se observa un aumento de velocidad específica en el rango de tiempo contemplado entre las cero y 24 horas. El punto máximo se alcanzó a las 89 horas, período que corresponde a la fase exponencial.

Al iniciar la fase estacionaria disminuyó la velocidad específica de producción de ácido glutámico. En el lapso de la fase estacionaria se observó un comportamiento constante.

5.4 Rendimiento en el Cultivo⁽³⁾.

$$Y_{p/s} = \frac{dP}{-dS}$$

donde:

Y_{ps}: gramos de ácido glutámico / gramos de sustrato consumido

dP: gramos de ácido glutámico

-dS: gramos de sustrato consumido

Para t₂ = 24 horas

$$Y_{ps} = (0.464 - 0.100) / -(0.2554 - 0.3154)$$

Y_{ps} = 6.067 g de producto / g de sustrato consumido

Tabla N°15: RENDIMIENTO DE ÁCIDO GLUTÁMICO EN EL CULTIVO

Tiempo (h)	g de Producto/ g de sustrato consumido	g/L de Producto (dP)	g/L de sustrato (dS)
0	0.000	0.000	0.000
24	6.067	0.364	-0.060
48	2.248	0.463	-0.206
72	3.294	0.695	-0.211
89	3.184	0.761	-0.239
144	1.937	0.463	-0.239
168	1.758	0.422	-0.240
192	1.746	0.419	-0.240

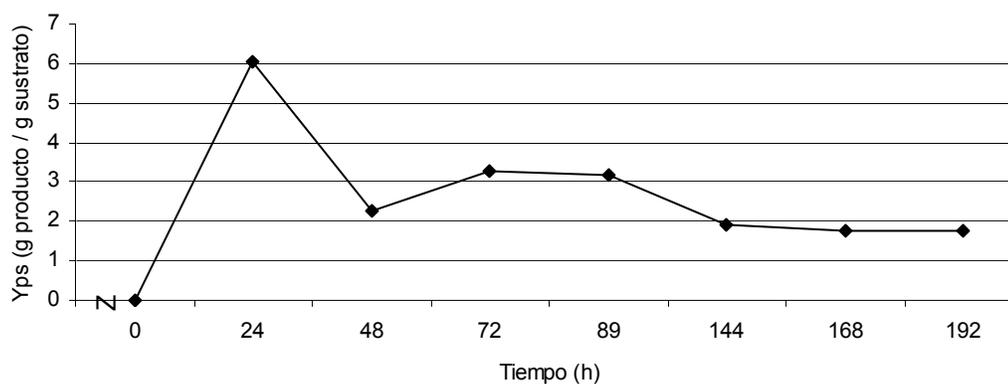


Fig. N°15: Gráfica de Rendimiento de Ácido Glutámico

La Fig. N°15 muestra la relación de producción de ácido glutámico y consumo de sustrato con respecto al tiempo.

En esta figura, se observa que en el período comprendido de las 0 a las 24 horas el microorganismo inició la producción de ácido glutámico y comenzó a disminuir la concentración de sustrato. Al final de la fase de latencia e inicio de la fase exponencial el consumo de sustrato fue mayor al igual que la producción de ácido glutámico.

El consumo de sustrato es inversamente proporcional a la producción de AG.

5.5 Determinación de Grados Brix⁽³⁾.

Tabla N°16: RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE GRADOS BRUX

Grados Brix	Tiempo (h)
4.0	0
3.3	24
2.9	48
2.3	72
1.8	89
1.6	144
1.4	168
1.3	192

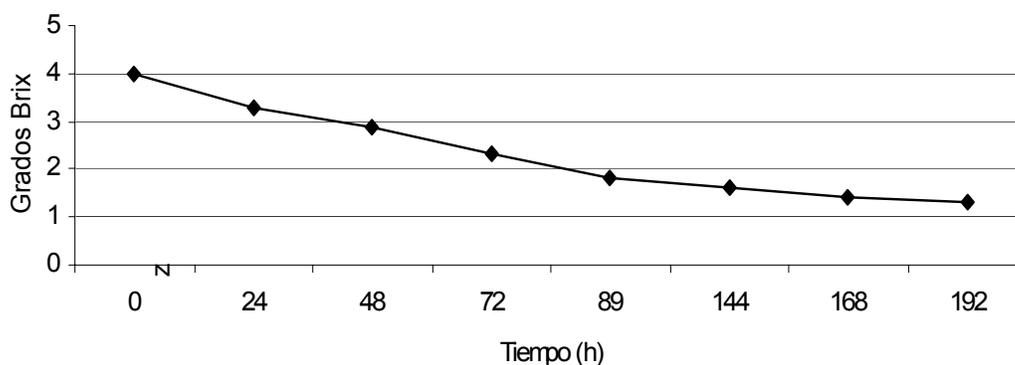


Fig. N°16: Gráfica de Grados Brix vrs tiempo(h).

La gráfica de grados Brix vrs tiempo (Fig. N°16), indica la cantidad de azúcares o sólidos consumidos en el medio de fermentación con respecto al tiempo.

La gráfica muestra una disminución de azúcares en todo el proceso fermentativo, a las 144 horas se observa el mayor consumo de azúcar al igual que en la gráfica correspondiente a figura N°8. Durante la fase estacionaria se observa un comportamiento constante aún cuando ya no había producción de ácido

5.6 Determinación de pH⁽³⁾.

Tabla N°17: RESULTADOS DE pH

pH	Tiempo (h)
4.73	0
4.69	24
4.63	48
4.59	72
4.49	89
4.45	144
4.37	168
4.32	192

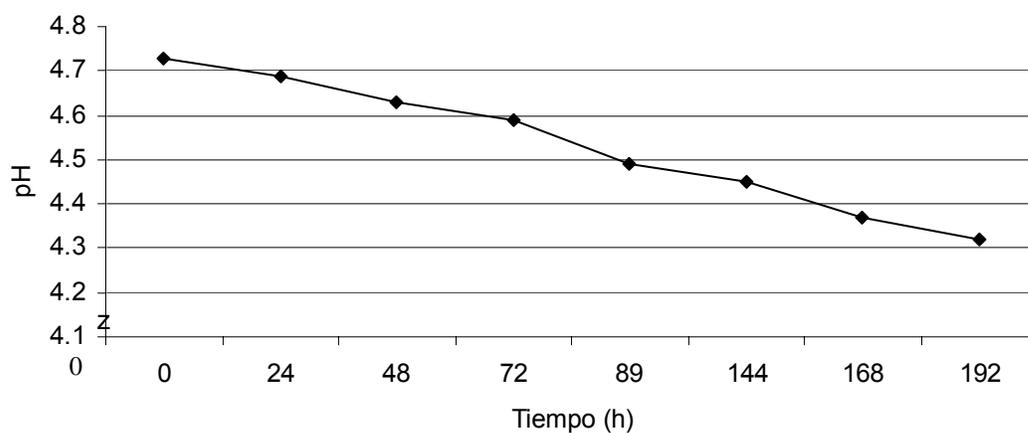


Fig. N°17: Gráfica de pH vs Tiempo (h).

La gráfica pH vs tiempo refleja el comportamiento del pH durante el proceso de fermentación. El pH disminuyó a medida avanzó el proceso fermentativo debido que el microorganismo liberó el ácido glutámico al medio. El pH continuó en disminución en la fase estacionaria ya que posiblemente el microorganismo produjo otros aminoácidos ácidos.

5.7 Modelo de Comportamiento del Ácido Glutámico con el Crecimiento Microbiano.

Los modelos matemáticos permiten predecir comportamientos y simular el efecto de variar las condiciones dentro de su rango de validez. La formulación de un modelo exige la clara definición de todos los factores.

El comportamiento del microorganismo durante el proceso fermentativo se evaluó mediante la determinación de los parámetros descritos en los numerales anteriores (5.1 –5.6), como: Biomasa, producto y sustrato, velocidades de crecimiento y producción.

Cuando el comportamiento del microorganismo es evaluado a través de la cuantificación de propiedades de cultivo como las mencionadas anteriormente, las cuales representan el comportamiento promedio de poblaciones de células, se dice que es un modelo cinético no estructurado.

Los modelos no estructurados son más simples y contienen menor número de constantes, por lo que se les utiliza como primera alternativa. En ocasiones estos modelos no son capaces de entregar la información requerida, o no pueden representar adecuadamente una situación de interés por no considerar los mecanismos celulares internos como lo hacen los modelos estructurados. ⁽⁶⁾

5.8 Ventajas en la Utilización del Medio 33 para la Obtención de Ácido Glutámico, para la Industria Alimenticia y Farmacéutica.

El medio de cultivo número 33, utilizado en el proceso de fermentación para la obtención de ácido glutámico, es un medio definido. Los medios químicamente definidos se preparan adicionando al agua destilada cantidades precisas de compuestos orgánicos o inorgánicos altamente purificados. Por ello se conoce la composición química exacta. Estos medios se formulan en base a compuestos puros (glucosa, fosfatos, sulfatos, extracto de carne, etc.), es decir, que contienen fuentes de cada elemento y nutrientes esenciales que son requeridos para el crecimiento del microorganismo. El Medio de Cultivo 33 es el adecuado para la investigación microbiológica, éste ha de contener como mínimo, carbono, nitrógeno, azufre, fósforo, y sales inorgánicas. Todas estas sustancias se suministran originalmente en forma de infusiones de carne, extractos de carne o extractos de levadura, las cuales, representan una fuente fácilmente asequible de nitrógeno y carbono ya que la mayoría de los microorganismos que no suelen utilizar directamente las proteínas naturales, tienen capacidad de atacar los aminoácidos y otros compuestos más simples de nitrógeno presentes en la peptona o extractos de carnes.

CAPÍTULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

6.1 La mayor producción de ácido glutámico durante el período fermentativo en la investigación, se desarrolló durante la fase exponencial, donde también hubo mayor consumo de sustrato, lo que hace que la relación de producción del metabolito ácido glutámico sea inversamente proporcional a la concentración de sustrato.

6.2 En la evaluación de los datos y gráficas obtenidos en el proceso de fermentación, se observó que una porción mayoritaria de sustrato (sacarosa) fue utilizada para la generación de biomasa y energía de mantención; las células microbianas utilizaron mayor cantidad de sustrato para generar energía diferente a la de las funciones relacionadas con el crecimiento, por lo que la cantidad de sustrato consumido fue mayor en comparación con la cantidad de Acido Glutámico obtenido.

6.3 El microorganismo *Aspergillus niger* empleado para el proceso de fermentación consumió el aminoácido ácido glutámico durante la fase estacionaria, por lo que, la producción de ácido glutámico disminuyó al finalizar la fase exponencial.

6.4 La evaluación de los parámetros cinéticos y gráficas para la medición de crecimiento microbiano (biomasa), consumo de nutrientes (sacarosa) y formación de producto (ácido glutámico), permitió clasificar a la cinética de fermentación desarrollada en el cultivo por lotes, como fermentación Tipo I, ya que el metabolito ácido glutámico fue producido durante el período de crecimiento exponencial del cultivo.

6.5 Desde el inicio del proceso de fermentación se observó que los valores de pH disminuyeron, debido a que, el ácido glutámico producido por el *Aspergillus niger* fue liberado al medio y también existió una producción de otros aminoácidos metabolizados por el mismo hongo.

6.6 Los resultados de análisis de grados Brix, según gráfica respectiva, muestran una tendencia directamente proporcional con la gráfica de consumo de sacarosa; los grados Brix son los sólidos o sacarosa presentes y disueltos en el medio de cultivo.

6.7 El crecimiento de microorganismos filamentosos como el *Aspergillus niger*, se dificulta debido a la viscosidad y naturaleza heterogénea del medio de cultivo 33, evitando de esta manera la producción óptima de metabolitos o aminoácidos.

6.8 El medio de cultivo 33, utilizado en el proceso de fermentación, es un medio adecuado para realizar una investigación microbiológica, ya que posee una composición química exacta (fuentes de Carbono y Nitrógeno) que ayuda a reunir las condiciones necesarias para la producción del ácido glutámico.

6.9 Los resultados obtenidos en el cultivo por lotes utilizado en el proceso de fermentación, revelan un bajo rendimiento de ácido glutámico durante el período evaluado; los resultados no son reproducibles para adaptarse a un laboratorio de escala industrial.

CAPÍTULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

- 7.1 Es necesario duplicar el tiempo de fermentación del proceso, Para lograr completar y observar todas las fases de crecimiento del microorganismo *Aspergillus niger*,
- 7.2 Emplear el método de Cultivo Continuo para incrementar el rendimiento de ácido glutámico, ya que al mantener constante la adición de un nutriente en el medio de cultivo 33, se puede mantener en un estado estacionario el crecimiento del *Aspergillus niger*, por lo tanto habría una producción indefinida de ácido glutámico.
- 7.3 Para poder evaluar un proceso fermentativo, es necesario desarrollar un tratamiento cuantitativo, que vaya respaldado por un estudio cinético de crecimiento microbiano, para lograr establecer estrategias para la obtención de una buena producción y optimización del proceso a nivel industrial.
- 7.4 Regular el pH y nutrientes del medio 33 con la adición de soluciones amortiguadoras y fuentes de Carbono y Nitrógeno respectivamente, que permitan incrementar la obtención de ácido glutámico, y de esta forma también evitar que el microorganismo consuma el metabolito como fuente de energía.

7.5 Aplicar otros microorganismos y medios de cultivos complejos (melaza, licor de maceración de maíz, extracto de levadura, y otros) para evaluar la eficiencia del método de fermentación (cultivo por lotes) utilizado y aplicarlo a un proceso industrial.

7.6 Debido a que el medio 33 reúne las condiciones de producción como fuentes de Carbono y Nitrógeno, puede utilizarse para los procesos de fermentación y obtención de aminoácidos, tales como el Ácido Glutámico, en cultivos continuos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alexopoulos C. J. Introducción a la micología, Primera edición. Editorial universitaria de Buenos Aires, Argentina. 1966.
2. Arce Mejía, A. M. y otros. Estudio preliminar de la capacidad de producción, comercialización y utilidad de 10 plantas medicinales cultivadas en el departamento de Morazán en la zona oriental de El Salvador. Junio 2004, Facultad de Química y Farmacia, C.A.
3. Cabello V., A. Microbiología Industrial: Manual de Laboratorio de Microbiología Industrial. Primera edición. Editorial Acribia, S.A . 1989.
4. Crueger, W. y otros. Biotecnología: manual de microbiología Industrial. Primera edición, España. Editorial Acribia, S.A. 1989.
5. García, M. y otros. Biotecnología Alimentaria, Primera edición. Editorial Noriega. México. 1993.
6. Illianes, A. Quinto curso latinoamericano de biotecnología: Cinética enzimática. Primera Edición, Chile: Escuela de Ingeniería Bioquímica. Universidad católica de Valparaíso. 1996.
7. Jagnow, G. D. W. Biotecnología: producción con experimentos modelos. Primera edición. Editorial Acribia S.A. España. 1991.
8. Lindsey, K.M.G.K. Biotecnología vegetal agrícola. Editorial Acribia S.A Zaragoza, España, 1989.

9. Ministerio de Economía de El Salvador. Dirección de comercio e inversión, departamento de información comercial. Diario oficial. Órgano ejecutivo. Sistema Arancelario CA SAC. 2002.
10. Scragg, A. Biotecnología para ingenieros: sistemas biológicos en procesos tecnológicos. Primera Edición. Editorial LIMUSA, Noriega editores. México 1996.
11. Alfonso H. 2003. Aminoácidos y proteínas (en línea). México. Consultado el 02 de Enero de 2005. Disponible en:
<http://www.monografias.com/trabajos10/amin/amin.html>
12. Corporación Ajinomoto. 2001. Sobre Glutamato monosódico (en línea). Japón. Consultado el 05 de Enero de 2005. Disponible en:
<http://www.ajinomoto.com>
13. Pedro F. Mateos .1999. Producción de metabolitos primarios (en línea). Madrid, España. Consultado el 5 de Enero de 2005. Disponible en :
<http://edicionmicro.usal.es/web/SEFIN/MI/tema07.html>
14. Laboratorio de tecnología educativa del departamento de microbiología y genética. 2004. Producción de aminoácidos (en línea). Universidad de Salamanca. España. Consultado el 02 de Febrero de 2005. Disponible en: <http://nostoc.usal.es>
15. Organización de agricultura de las Naciones Unidas. 2004. Sobre Glutamato Monosódico (en línea). Consultado el 03 de Febrero de 2005. Disponible en: <http://www.fao.org>

16. Servicio de información internacional sobre el Glutamato (SIIG). 2003. Información y servicios en línea sobre Glutamato (en línea). Australia. Consultado el 22 de Febrero de 2005. Disponible en:
<http://www.glutamato.org>
17. Sociedad de Argentina de nutrición. 2001. Ácido Glutámico, sus ventajas y desventajas. Argentina. Consultado el 23 de Febrero de 2005. Disponible en: <http://www.nutrar.com>
18. Universidad de Berlin. 2003. Proyecto Schimmel-schimmepilze (en línea). Berlín, Alemania. Consultado el 23 de Febrero de 2005. Disponible en:
<http://schimmelschimmepilze.de/shimmelpil2/aspergillus-niger.html>
19. Universidad de Concordia. 2003. Proyecto de genomas de la Universidad de Concordia (en línea). España. Consultado el 24 de Febrero de 2005. Disponible en:
<http://www.nostoc.usal.es/sefin/MI/temas07.html>

ANEXOS

ANEXO 1

Preparación de reactivos:

- Acetona 75% v/v

Preparación para 250ml: medir 187.5ml de Acetona GR en una probeta de 100 ml y adicionar a un balón volumétrico de 250ml, llevar a volumen con agua destilada. Homogenizar.

- Ninhidrina 5% con regulador de fosfatos 0.1M pH 7.0

Preparación para 100ml: pesar 5g de ninhidrina, transferir a un balón volumétrico de 100ml, adicionar 50ml de butanol y agitar hasta disolución, llevar a volumen con butanol. Pesar 2.39g de fosfato disódico y 0.91g de fosfato de potasio, adicionar a la solución anterior, y después agitar hasta disolución.

- Fenol al 80%:

Preparación para 10ml: pesar 8g de fenol en un beaker de 30ml y transferir a un balón volumétrico de 10ml, lavando con porciones de 2ml de agua destilada el beaker, agitar y llevar a volumen con agua destilada.

ANEXO 2

Material, equipo y reactivos

Material y Cristalería:

Matraces de 250 mL	Beaker de 50 mL
Portaobjetos	Placas de petri
Pipetas de Mohr 10 mL	Desecadores
Pipetas de Mohr de 20 mL	Pipetas Volumétricas de 5.0 mL
Papel filtros	Pipetas volumétricas de 1.0 mL
Embudos	Balones volumétricos de 100 mL
Beaker de 100 mL	Pipeteadores
Matraces de 125 mL	Microespátula
Tubos de ensayo con rosca	Gradillas
Matraz de 1000 mL	Baños María

Equipos:

Microscopio	Centrifugadora
Spectronic 20D	Refrigeradora
Brixómetro	Fuente de oxígeno para pecera
Agitador de propela	Cocina
Autoclave	Incubadora
pHmetro	Bioreactor

ANEXO 3

Tabla N°1: Preparación de Soluciones Estándar de Sacarosa

Tubo No.	mL de sln estándar	mL de Agua destilada	mL de fenol al 80%	mL H ₂ SO ₄
1	0.0	5.0	0.1	5.0
2	0.5	4.5	0.1	5.0
3	1.0	4.0	0.1	5.0
4	1.5	3.5	0.1	5.0
5	2.0	3.0	0.1	5.0
6	2.5	2.5	0.1	5.0
7	3.0	2.0	0.1	5.0
8	3.5	1.5	0.1	5.0
9	4.0	1.0	0.1	5.0
10	4.5	0.5	0.1	5.0
11	5.0	0	0.1	5.0

Nota: Colocar los tubos en un baño de hielo antes de adicionar el ácido sulfúrico.

ANEXO 4

Tabla N° 2: RESULTADOS TRIPLICADOS DE CURVA ESTÁNDAR DE SACAROSA

Tubo No.	mL de sln estándar	mg de estándar	Concentración (mg/ mL)	Absorbancia
1	0.0	0.0	0.00	0.00
1	0.0	0.0	0.00	0.00
1	0.0	0.0	0.00	0.00
2	0.5	0.1	0.02	0.08
2	0.5	0.1	0.02	0.07
2	0.5	0.1	0.02	0.08
3	1.0	0.2	0.04	0.22
3	1.0	0.2	0.04	0.23
3	1.0	0.2	0.04	0.21
4	1.5	0.3	0.06	0.36
4	1.5	0.3	0.06	0.37
4	1.5	0.3	0.06	0.36
5	2.0	0.4	0.08	0.49
5	2.0	0.4	0.08	0.48
5	2.0	0.4	0.08	0.49
6	2.5	0.5	0.10	0.63
6	2.5	0.5	0.10	0.62
6	2.5	0.5	0.10	0.61
7	3.0	0.6	0.12	0.76
7	3.0	0.6	0.12	0.77
7	3.0	0.6	0.12	0.76
8	3.5	0.7	0.14	0.89
8	3.5	0.7	0.14	0.89
8	3.5	0.7	0.14	0.88
9	4.0	0.8	0.16	0.97
9	4.0	0.8	0.16	0.97
9	4.0	0.8	0.16	0.97
10	4.5	0.9	0.18	1.05
10	4.5	0.9	0.18	1.06
10	4.5	0.9	0.18	1.05
11	5.0	1.0	0.20	1.35
11	5.0	1.0	0.20	1.35
11	5.0	1.0	0.20	1.34

ANEXO 5

Tabla N° 3: RESULTADOS TRIPLICADOS DE ANÁLISIS DE MUESTRAS DE SACAROSA

Tiempo (hrs)	Absorbancia
0.0	0.175
0.0	0.174
0.0	0.175
24.0	0.136
24.0	0.136
24.0	0.136
48.0	0.041
48.0	0.040
48.0	0.041
72.0	0.038
72.0	0.037
72.0	0.039
89.0	0.468
89.0	0.467
89.0	0.468
144.0	0.465
144.0	0.465
144.0	0.465
168.0	0.461
168.0	0.462
168.0	0.461
192.0	0.461
192.0	0.461
192.0	0.461

ANEXO 6

Tabla N°4: Preparación de Soluciones Estándar de Ácido Glutámico

Tubo No.	mL de sin estándar	mL de Agua destilada	mL de solución de ninhdrina	mL de acetona
1	0.0	5.0	1.0	7.0
2	0.5	4.5	1.0	7.0
3	1.0	4.0	1.0	7.0
4	1.5	3.5	1.0	7.0
5	2.0	3.0	1.0	7.0
6	2.5	2.5	1.0	7.0
7	3.0	2.0	1.0	7.0
8	3.5	1.5	1.0	7.0
9	4.0	1.0	1.0	7.0
10	4.5	0.5	1.0	7.0
11	5.0	0	1.0	7.0

Nota: Antes de adicionar la acetona, calentar cada tubo en un baño María a 80°C por 10 minutos y enfriar a temperatura ambiente.

ANEXO 7

Tabla N° 5: RESULTADOS TRIPLICADOS DE CURVA ESTÁNDAR DE ÁCIDO GLUTÁMICO

Tubo No.	mL de sln estándar	mg de estándar	Concentración (mg/ mL)	Absorbancia
1	0.0	0.0	0.00	0.00
1	0.0	0.0	0.00	0.00
1	0.0	0.0	0.00	0.00
2	0.5	0.1	0.02	0.39
2	0.5	0.1	0.02	0.39
2	0.5	0.1	0.02	0.39
3	1.0	0.2	0.04	0.61
3	1.0	0.2	0.04	0.62
3	1.0	0.2	0.04	0.61
4	1.5	0.3	0.06	0.79
4	1.5	0.3	0.06	0.79
4	1.5	0.3	0.06	0.78
5	2.0	0.4	0.08	0.91
5	2.0	0.4	0.08	0.92
5	2.0	0.4	0.08	0.90
6	2.5	0.5	0.10	1.10
6	2.5	0.5	0.10	1.11
6	2.5	0.5	0.10	1.10
7	3.0	0.6	0.12	1.27
7	3.0	0.6	0.12	1.27
7	3.0	0.6	0.12	1.27
8	3.5	0.7	0.14	1.45
8	3.5	0.7	0.14	1.44
8	3.5	0.7	0.14	1.45
9	4.0	0.8	0.16	1.61
9	4.0	0.8	0.16	1.61
9	4.0	0.8	0.16	1.62
10	4.5	0.9	0.18	1.73
10	4.5	0.9	0.18	1.74
10	4.5	0.9	0.18	1.73
11	5.0	1.0	0.20	1.98
11	5.0	1.0	0.20	1.98
11	5.0	1.0	0.20	1.98

ANEXO 8

Tabla N° 6: RESULTADOS TRIPLICADOS DE ANÁLISIS DE MUESTRAS DE ÁCIDO GLUTÁMICO

Tiempo (h)	Absorbancia
0.0	1.08
0.0	1.08
0.0	1.09
24.0	0.59
24.0	0.59
24.0	0.59
48.0	0.68
48.0	0.67
48.0	0.69
72.0	0.89
72.0	0.89
72.0	0.88
89.0	0.95
89.0	0.95
89.0	0.95
144.0	0.68
144.0	0.67
144.0	0.68
168.0	0.67
168.0	0.66
168.0	0.68
192.0	0.64
192.0	0.64
192.0	0.64

ANEXO 9

MEDIO DE FERMENTACIÓN PARA AMINOÁCIDOS: MEDIO 33

Preparación para 1000ml:

Materia prima

Glucosa.....20.0g

Peptona.....10.0g

Extracto de carne..... 5.0g

Cloruro de sodio..... 2.5g

Agua destilada csp.....1000ml

Preparación:

- Pesar en balanza granataria las materias primas: 20.0g de Glucosa, 10.0g de Peptona, 5.0g de Extracto de carne, 2.5g de Cloruro de Sodio.
- Adicionar las materias primas a un erlenmeyer de 2000ml con 1000ml de Agua destilada, agitar mecánicamente hasta completa disolución.
- Calentar en un Baño Maria hasta ebullición.
- Esterilizar en autoclave a 121°C por 30 minutos. Dejar enfriar.

ANEXO 10

MEDIO DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO DEL HONGO *Aspergillus*

níger: AGAR CZAPEK

Composición para 1000ml:

Agar Czapek	39g
Agua destilada csp	1000ml

Preparación:

- Pesar en balanza granataria 39.0g de Agar Czapek.
- Adicionar el Agar Czapek a un erlenmeyer de 2000ml que contiene 1000ml de Agua destilada. Calentar y Agitar mecánicamente hasta disolución completa, enfriar.
- Adicionar 15ml de Ninhidrina al 5%, homogenizar.
- Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos. Enfriar hasta temperatura de 40°C para verter en las placas de petri estériles.

ANEXO 11

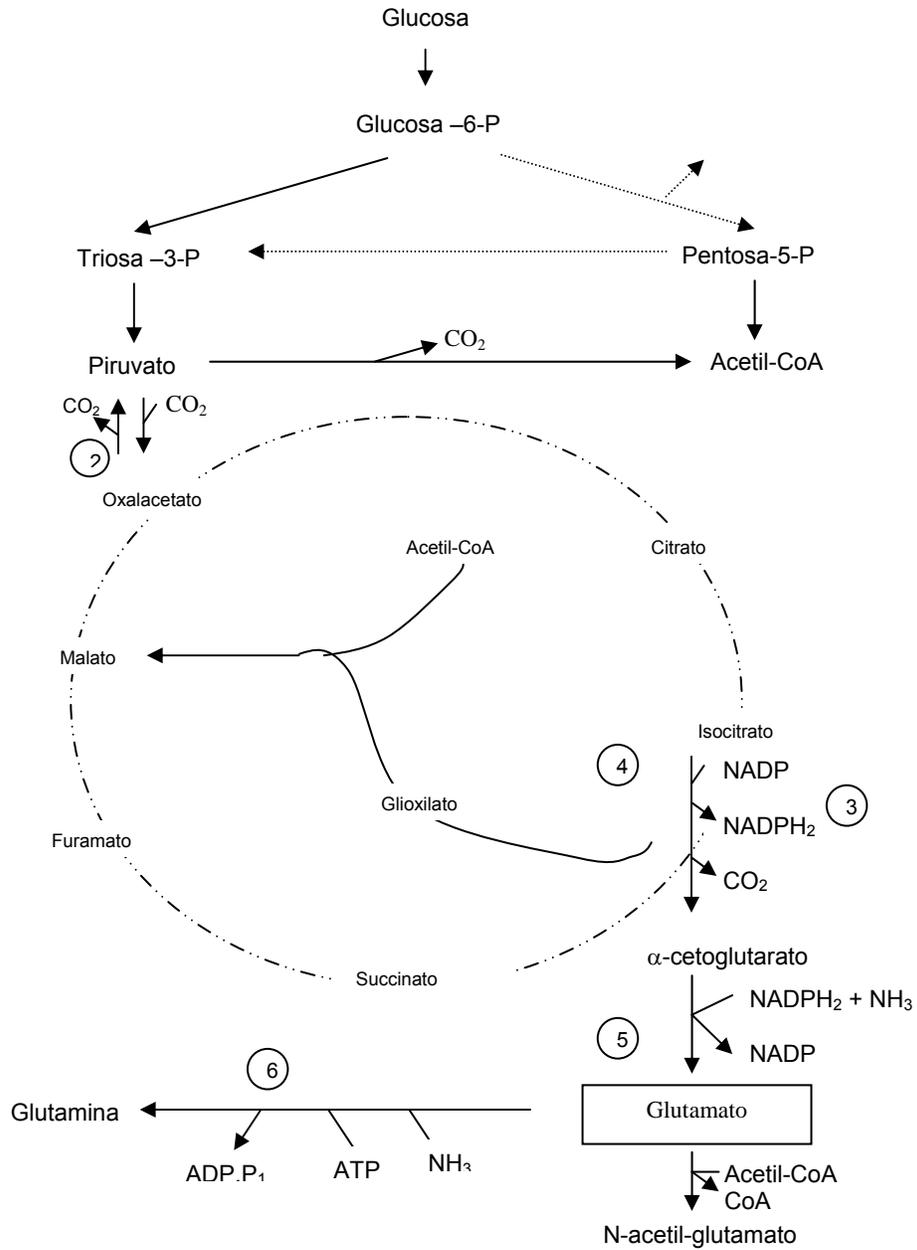
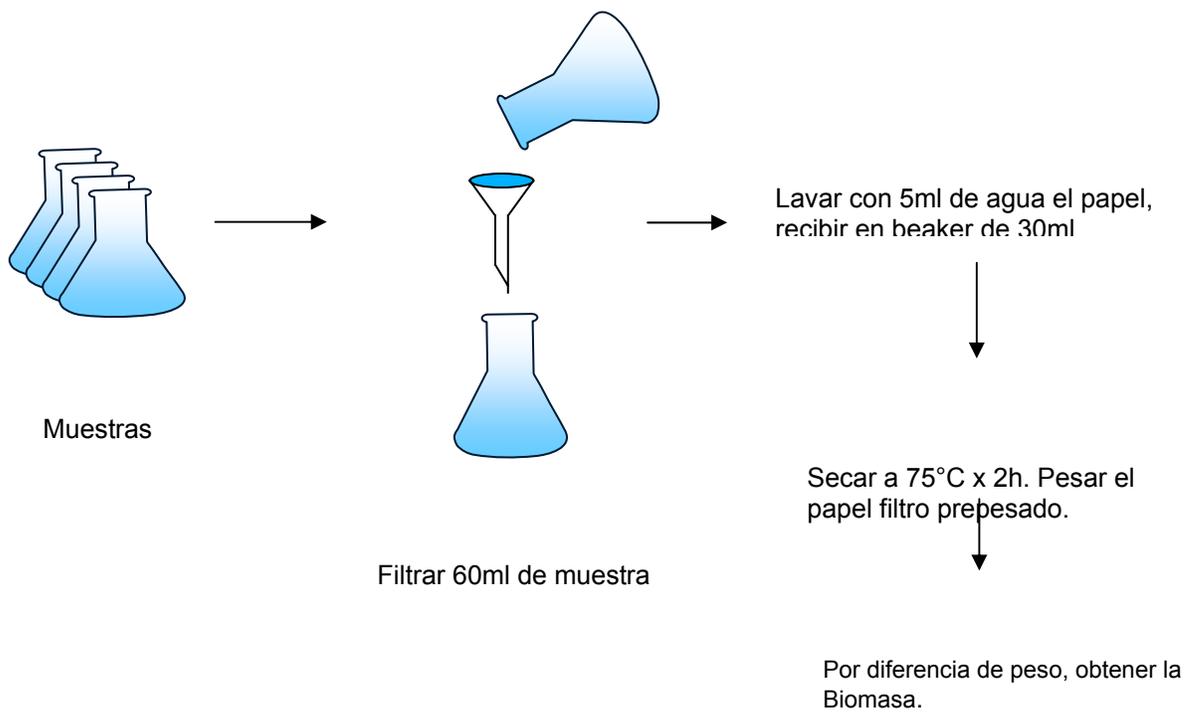


Fig. N°1: Biosíntesis de Ácido L-glutámico utilizando glucosa como fuente de carbono. 1. Enzima málica; 2. Oxalacetato carboxilasa; 3. Isocitrato deshidrogenasa; 4. Isocitrato liasa; 5. Ácido Glutámico deshidrogenasa; 6. Glutamina sintetasa.

ANEXO 12

DETERMINACIÓN DE BIOMASA POR EL MÉTODO DE PESO SECO



Nota:

Realizar el mismo procedimiento para muestras de 0, 24, 48, 72, 89, 144, 168, y 192h.

Fig. N°2: Determinación de Biomasa por el método de Peso Seco

ANEXO 13

DETERMINACIÓN DE AZÚCARES POR EL MÉTODO DE FENOL SULFÚRICO

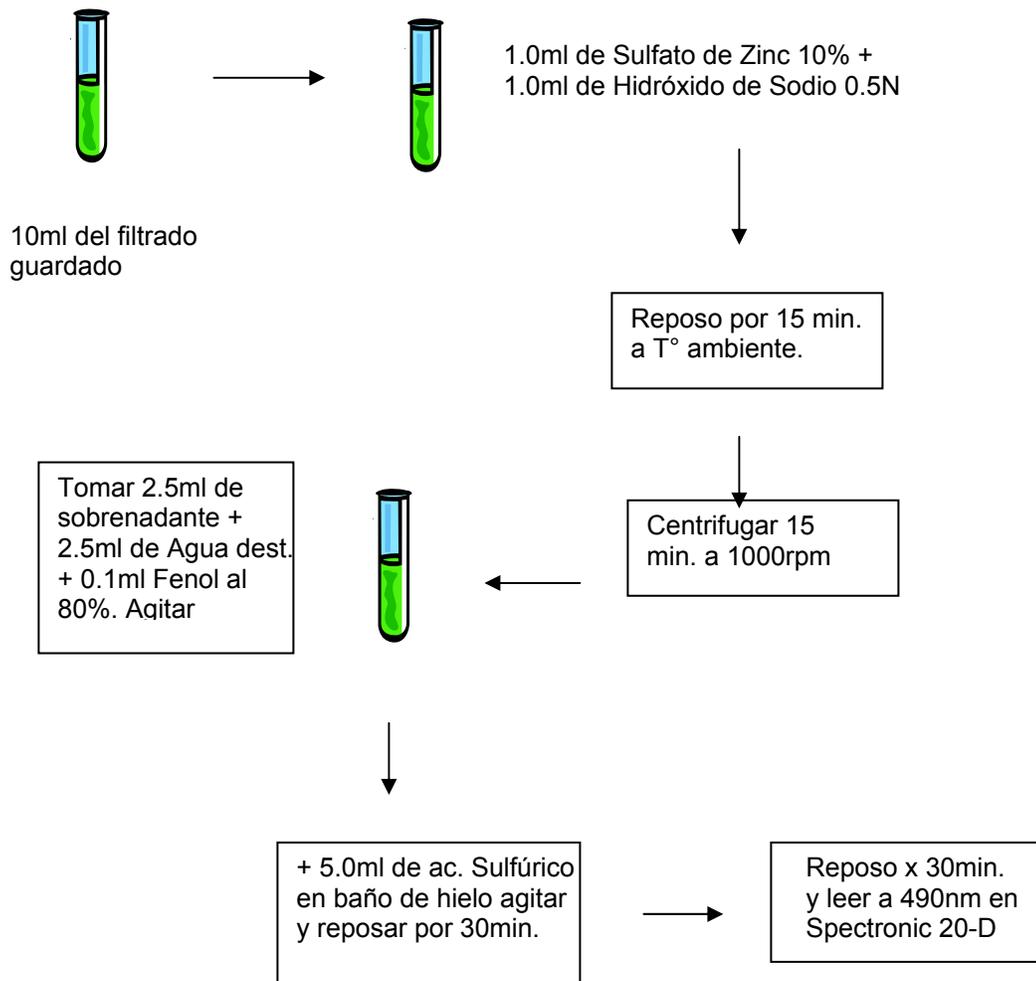


Fig. N°3: DETERMINACIÓN DE AZÚCARES POR EL MÉTODO DE FENOL SULFÚRICO

ANEXO 14

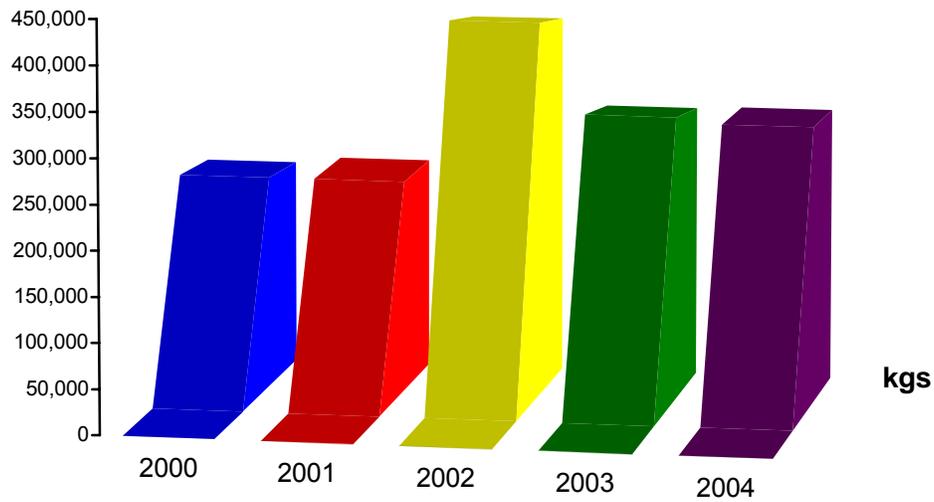


Fig. N°4: Importaciones de Ácido Glutámico El Salvador desde 2000 -2004

Tabla N°7: PAÍSES IMPORTADORES DE ÁCIDO GLUTÁMICO A EL SALVADOR

Año	Kilogramos de Ácido Glutámico	Costo en US \$
2000	223,563	231,817
2001	230,227	231,669
2002	393,140	411,387
2003	297,513	311,627
2004	299,687	305,128

ANEXO 15

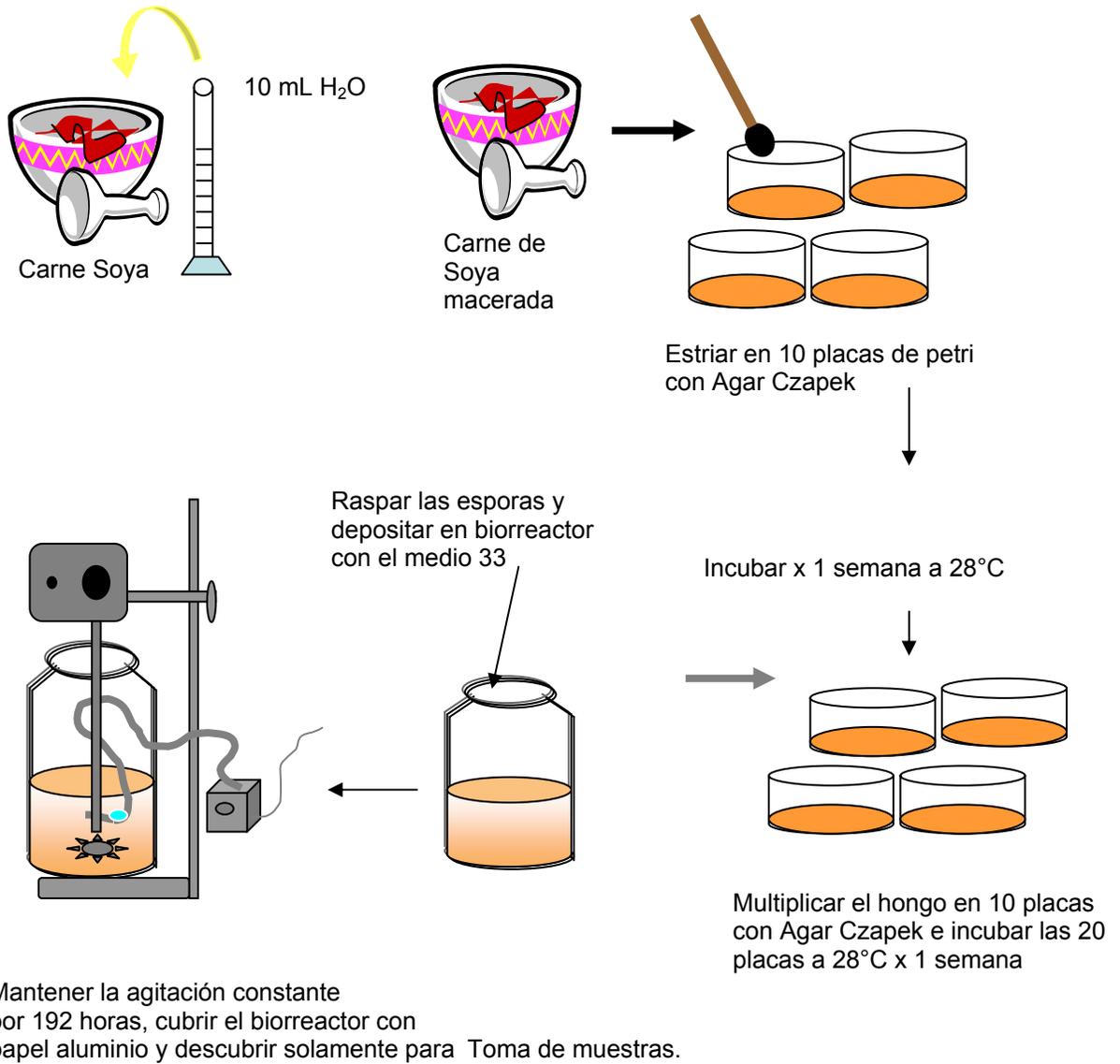


Fig. N°5: Proceso de Fermentación de Ácido Glutámico