

OBTENCIÓN, PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO GLUTÁMICO
EN FERMENTOS DE HIDROLIZADOS DE PAPA, PRODUCIDOS CON LA
BACTERIA *Corynebacterium glutamicum*

JAVIER IGNACIO MUÑOZ MARTÍNEZ
WILLIAM ALFREDO PÉREZ CABRERA

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS
PROGRAMA DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO
2006

OBTENCIÓN, PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO GLUTÁMICO
EN FERMENTOS DE HIDROLIZADOS DE PAPA, PRODUCIDOS CON LA
BACTERIA *Corynebacterium glutamicum*

JAVIER IGNACIO MUÑOZ MARTÍNEZ
WILLIAM ALFREDO PÉREZ CABRERA

Trabajo de Investigación presentado como requisito parcial
para optar al título de Químico

Director:

M.Sc JESÚS ADRIANO ROMO RAMOS

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS
PROGRAMA DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO
2006

“Las ideas y conclusiones aportadas en este trabajo de grado, son responsabilidad exclusiva de sus autores”

Artículo 1. Del acuerdo No. 324 de Octubre 14 de 1966, emanada del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación:

Director

Jurado

Jurado

San Juan de Pasto Marzo de 2006

Agradezco a Dios por darme la vida y poder culminar mi carrera, a mis padres Fanny Martínez y Servio Muñoz, por el amor y la educación que me han brindado, a mis hermanos Myriam, Hernán y Mayra, por creer en mí, a mi novia Claudia Lorena, por su incondicional apoyo, a mi tío Iván, por sus consejos y por estar junto a mí cuando más lo necesite, a mis profesores, amigos y compañeros por permitirme aprender de ellos y lograr forjarme como un gran profesional.

La vida está llena de constantes retos y cada día hay que vencerlos siempre buscando el bien. Llegaremos a ser mejores personas.

Javier Ignacio Muñoz Martínez

Aunque han sido muchos años de dedicación y amor al estudio los que me han llevado a cumplir el sueño de ser un profesional, nada se compara con el amor, esfuerzo, y sacrificio que realizaron mis padres Mariela y José por convertirme en un hombre de bien, y que hoy me permiten con orgullo dedicarles mi trabajo de grado.

También le agradezco a mis hermanitas, Katherin y Nathalia por todo ese inmenso cariño y paciencia conmigo. A mi novia Ana Patricia, por todo lo que he aprendido a su lado y por llegar a mi vida cuando más la necesitaba. A mis compañeros, quienes a pesar de muchos roles nunca me abandonaron. Y a todos los profesores del Dpto. de Química por los conocimientos compartidos.

Quien conoce el fin sin haber estado allí, y si no lo ha visto nunca, es por que su camino apenas empieza.

William Alfredo Pérez Cabrera.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos de manera especial al profesor Jesús A. Romo, por su asesoramiento en el desarrollo de este trabajo.

Benjamín Bolaños, Ph.D en Microbiología Clínica del Departamento de Ciencias Medicas de la Universidad de Puerto Rico, por su colaboración en la consecución del microorganismo usado en esta investigación.

Juan Carlos Quintero, Ph.D en Biotecnología, director del Grupo de Bioprocesos de la Universidad de Antioquia y Natalia Gómez, Magíster en Bioquímica, investigadora del Grupo de Bioprocesos de la Universidad de Antioquia, por sus enseñanzas en el área de biotecnología.

Ingeniero Aramid Suaza, Subsecretario de Desarrollo Agropecuario y Medio Ambiente de la secretaria de agricultura de la Gobernación de Nariño, por la gestión realizada en la financiación de esta investigación.

A todo el personal humano que trabaja en el área de laboratorios de Química, especialmente a Susana Calpa, por el apoyo incondicional, que nos permitió el trabajo constante en nuestra labor.

CONTENIDO

| | Pág. |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------|
| RESUMEN | 16 |
| INTRODUCCIÓN | 18 |
| 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 19 |
| 2. OBJETIVOS | 20 |
| 2.1 GENERAL | 20 |
| 2.2 ESPECÍFICOS | 20 |
| 3. MARCO TEÓRICO | 21 |
| 3.1 LOS AMINOÁCIDOS | 21 |
| 3.2 HISTORIA DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO GLUTÁMICO | 22 |
| 3.3 USO COMERCIAL DEL ÁCIDO GLUTÁMICO | 24 |
| 3.4 PRODUCCIÓN DE L-GLUTAMATO (ÁCIDO GLUTÁMICO) | 26 |
| 3.5 PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA | 28 |
| 3.6 PARÁMETROS MÁS IMPORTANTES DURANTE LA FERMENTACIÓN | 30 |
| 3.6.1 Concentración de amonio. | 30 |
| 3.6.2 Oxígeno disuelto. | 30 |
| 3.6.3 pH. | 30 |
| 3.6.4 Temperatura. | 30 |
| 3.6.5 Concentración de glucosa. | 31 |
| 3.6.6 Agitación y mezclado. | 31 |
| 3.7 EXTRACCIÓN DEL AMINOÁCIDO | 31 |
| 3.8 SUSTRATO | 32 |
| 3.8.1 Composición química del sustrato. | 33 |
| 3.8.2 Hidrólisis del almidón. | 33 |
| 4. METODOLOGÍA | 35 |
| 4.1 REACTIVACIÓN Y PRESERVACIÓN DE LA BACTERIA <i>Corynebacterium glutamicum</i> | 35 |

| | Pág. |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 4.1.1 Dotación del microorganismo. | 36 |
| 4.2 MUESTREO Y OBTENCIÓN DEL ALMIDÓN | 36 |
| 4.3 PRODUCCIÓN DEL HIDROLIZADO | 37 |
| 4.3.1 Variables de manejo. | 38 |
| 4.3.2 Determinación de azúcares totales. | 38 |
| 4.3.3 Saturación de almidón. | 38 |
| 4.3.4 Evaluación del método. | 38 |
| 4.4 PROCESO DE FERMENTACIÓN | 39 |
| 4.4.1 Preparación del inóculo. | 39 |
| 4.4.2 Cultivo en biorreactores. | 39 |
| 4.5 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ÁCIDO GLUTÁMICO | 42 |
| 4.5.1 Extracción de ácido glutámico. | 42 |
| 4.5.1.1 Concentración y precipitación de ácido glutámico. | 42 |
| 4.5.1.2 Extracción del aminoácido con resinas de intercambio iónico. | 42 |
| 4.5.2 Cuantificación del aminoácido. | 43 |
| 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 44 |
| 5.1 REACTIVACIÓN Y PRESERVACIÓN DE LA BACTERIA <i>Corynebacterium glutamicum</i> | 44 |
| 5.1.1 Tinción de Gram. | 44 |
| 5.1.2 Morfología de colonias en agar nutritivo. | 44 |
| 5.1.3 Morfología en agar telurito sódico. | 45 |
| 5.1.4 Cultivo en caldo nutritivo. | 46 |
| 5.2 CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS Y OBTENCIÓN DE ALMIDÓN | 46 |
| 5.2.1 Determinación de humedad y peso seco de la papa utilizada. | 46 |
| 5.2.2 Determinación de tiempo de licuado. | 47 |
| 5.3 PRODUCCIÓN DE HIDROLIZADOS | 48 |
| 5.3.1 Concentración de ácido sulfúrico. | 48 |
| 5.3.2 Tiempo de hidrólisis. | 50 |
| 5.3.3 Concentración de almidón. | 51 |

| | Pág. |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 5.4 PROCESO DE FERMENTACIÓN | 52 |
| 5.4.1 Esterilización de los nutrientes. | 52 |
| 5.4.2 Producción de ácido glutámico en los fermentos. | 53 |
| 5.5 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ÁCIDO GLUTÁMICO | 56 |
| 5.5.1 Proceso de extracción del ácido glutámico utilizando el método reportado por Kinoshita. | 56 |
| 5.5.2 Proceso de extracción por resinas de intercambio iónico reportado por Oi-Wah. | 56 |
| 5.6 RENDIMIENTO TOTAL DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO GLUTÁMICO | 57 |
| 6. CONCLUSIONES | 59 |
| RECOMENDACIONES | 60 |
| BIBLIOGRAFÍA | 61 |
| ANEXOS | 65 |

LISTA DE TABLAS

| | Pág. |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Tabla 1. Utilización de los aminoácidos en la industria. | 25 |
| Tabla 2. Características generales de la bacteria <i>Corynebacterium glutamicum</i> . | 26 |
| Tabla 3. Nutrientes utilizados en los caldos de cultivo. | 41 |
| Tabla 4. Humedad y peso seco de la papa utilizada. | 47 |
| Tabla 5. Tiempo de licuado y peso de almidón obtenido. | 47 |
| Tabla 6. Capacidad de hidrólisis de almidón en ácido sulfúrico. | 51 |
| Tabla 7. Cuantificación de carbohidratos totales y glucosa en los hidrolizados a partir de 250g de almidón en 1l de H ₂ SO ₄ al 1%. | 52 |
| Tabla 8. Glucosa consumida en las fermentaciones. | 53 |
| Tabla 9. Cuantificación de ácido glutámico producido en los fermentos. | 54 |
| Tabla 10. Rendimiento de aminoácido producido con respecto a la glucosa consumida. | 55 |
| Tabla 11. Recuperación de ácido glutámico de los caldos de fermentación a partir de un litro de fermento. | 56 |
| Tabla 12. Recuperación de ácido glutámico por resinas de intercambio iónico en T5. | 57 |

LISTA DE FIGURAS

| | Pág. |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Figura 1. Estructura del ácido glutámico. | 22 |
| Figura 2. Fotografía de <i>Corynebacterium glutamicum</i> tomada con un microscopio electrónico. | 24 |
| Figura 3. Esquema general de las reacciones en <i>Corynebacterium glutamicum</i> conectadas con el ciclo del ácido cítrico y la relevancia para la producción del L-Glutamato. | 28 |
| Figura 4. Hidrólisis de polímeros de anhidroglucopiranosas. | 34 |
| Figura 5. Diagrama de flujo seguido en la producción de hidrolizados. | 37 |
| Figura 6. Montaje del proceso de hidrólisis. | 39 |
| Figura 7. Montaje del proceso de fermentación. | 40 |
| Figura 8. Tinción de Gram para <i>Corynebacterium glutamicum</i> , observada a 1000X. | 44 |
| Figura 9. <i>Corynebacterium glutamicum</i> en agar nutritivo (Oxoid, Ref CM0003). | 45 |
| Figura 10. <i>Corynebacterium glutamicum</i> en agar de telurito sódico (Oxoid, Ref CM0275). | 45 |
| Figura 11. <i>Corynebacterium glutamicum</i> en caldo nutritivo Oxoid, Ref CM0001 | 46 |
| Figura 12. Comportamiento de la hidrólisis de almidones a diferentes tiempos y concentraciones de H ₂ SO ₄ . | 49 |
| Figura 13. Curva de hidrólisis ácida al 1% con rangos de tiempo menores. | 50 |

ANEXOS

| | Pág. |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Anexo A. Réplicas en la determinación de humedad y peso seco de papa. | 65 |
| Anexo B. Réplicas en la determinación de tiempo de licuado según la cantidad de almidón obtenido con una muestra de 200g. | 65 |
| Anexo C. Tabla de datos de hidrólisis a diferentes tiempos y concentraciones de H ₂ SO ₄ | 65 |
| Anexo D. Determinación cuantitativa de glucosa con el método de glucosa oxidasa GLUCOSTIX ® BAYER. | 68 |
| Anexo E. Reproducibilidad en la glucosa consumida en los tratamientos. | 69 |
| Anexo F. Comparación del ácido glutámico producido en las fermentaciones con el producido en los testigos en relación al uso de hidrolizados o glucosa. | 69 |
| Anexo G. Análisis de covarianza entre los datos de cada tratamiento (TRT) usado en la producción de ácido glutámico. | 70 |
| Anexo H. Contraste múltiple de rango entre las medias de cada tratamiento (TRT) usado en la producción de ácido glutámico. | 71 |
| Anexo I. Especificaciones técnicas del antiespumante usado en el tratamiento T5. | 72 |
| Anexo J. Formato de suscripción para Universidades a la American Types Culture Collection (ATCC). | 73 |

RESUMEN

Se obtuvo ácido glutámico a partir de hidrolizados de almidón de papa por procesos de fermentación utilizando la bacteria *Corynebacterium glutamicum* ATCC(13032). En una primera etapa se estandarizó el proceso de extracción de almidón de residuos de papa, logrando un rendimiento en la extracción del 14% de almidón sobre peso húmedo, para la variedad *Diacol capiro*; como segunda etapa, se estandarizó el proceso de hidrólisis del almidón obteniéndose un rendimiento del 91.3%, en la conversión a carbohidratos totales de los cuales un 79% correspondieron a glucosa. En la tercera etapa se fermentaron los carbohidratos obtenidos en la hidrólisis usando la bacteria *Corynebacterium glutamicum* ATCC(13032) presentando un rendimiento en la producción de ácido glutámico, para el mejor tratamiento del 45.5% con respecto a los azúcares consumidos.

El ácido glutámico obtenido en los fermentos, presentó gran afinidad con la matriz del fermento, dificultando su extracción sin embargo mediante la utilización de resinas de intercambio iónico, se logró su extracción y posterior purificación con un rendimiento del 69.2%.

ABSTRACT

The glutamic acid obtained to depart of hydrolyzed of potato starch for processes of fermentation utilizing the bacterium *Corynebacterium glutamicum* ATCC (13032). In a first stage was standardize the process of extraction of starch of residues of potato, achieving a performance in the extraction of 14 % of starch on humid weight, for variety *Diacol Capiro*; As second stage, was standardize the process of hydrolysis of starch obtaining a performance of the 91,3 % in the conversion to total carbohydrates which they repaid a 79 % of to glucose,. In the third stage became fermented the carbohydrates obtained in the hydrolysis using the bacterium *Corynebacterium glutamicum* ATCC (13032) presenting a performance in the production of glutamic acid, for the best treatment of the 45,5 % with respect to sugar them consumed.

The glutamic acid obtained in the ferments, It present great affinity with the ferment's womb, making his extraction difficult however intervening the utilization of resins of ionic interchange, itself achieve his extraction and later purification with performances of the 69,2 %.

INTRODUCCIÓN

La Biotecnología es una de las ciencias que en la actualidad está revolucionando la industria ya que se basa en la utilización o manipulación de organismos vivos, o de compuestos obtenidos de organismos vivos, con el fin de obtener productos de valor para los seres humanos. Los primeros organismos utilizados fueron microorganismos (como bacterias y hongos), aunque posteriormente se emplearon plantas y más recientemente animales. La biotecnología tradicional incluía procesos microbianos bien conocidos como la elaboración de la cerveza o el pan, la obtención de antibióticos o la depuración de aguas residuales. La biotecnología moderna utiliza organismos modificados genéticamente para obtener beneficios aún mayores, o incluso procedimientos completamente nuevos¹.

Actualmente, existen muchos productos químicos que se obtienen por fermentación (término técnicamente restringido a los procesos que ocurren en ausencia de aire). El ácido glutámico o glutamato es comercialmente uno de los aminoácidos más importantes producido por procesos de fermentación y el cual es utilizado ampliamente en la industria de alimentos, farmacéutica y de limpieza², presentando gran demanda por parte de las mismas. Debido a que hay pocas empresas en el mundo que cubran la demanda de L-Glutamato, se ha encaminado esta investigación hacia el desarrollo de su obtención a partir de una fuente económica y de gran producción como es la papa, y por lo tanto con el fin de que este proceso sea llevado a la industria, se hace necesario adaptar estas metodologías inicialmente a nivel de laboratorio como en el presente trabajo, el cual es un comienzo para la utilización de la biotecnología en el Departamento de Nariño y que permitirá aprovechar de mejor forma todas las fuentes agrícolas con la que cuenta nuestra región.

Un camino seguido por muchos investigadores para el mejoramiento del proceso de producción de este aminoácido, ha sido enfocado a la consecución de fuentes de materias primas baratas, la modificación de las condiciones fundamentales de la fermentación, y principalmente al uso de microorganismos especiales para este fin como es el caso de las cepas de *Corynebacterium* y *Brevibacterium* donde la más reconocida ha sido la *Corynebacterium glutamicum* utilizada en la producción industrial de ácido glutámico³.

¹ DOUGLAS, Eveligh. Elaboración Microbiológica de Productos Químicos Industriales. p. 1-11.

² TETSUYA, K. et. al. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Glutamic acid. By Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. DOI: 10.1002/14356007.a16_711. Junio. 2000. p. 4.

³ MATEOS, Pedro. Microorganismos de interés industrial. Mexico: UNAM, 2003. p. 124-150.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Anualmente en Nariño se pierden toneladas de biomasa, a causa de la escasa comercialización de ciertos productos agrícolas, lo que conduce a un desaprovechamiento de estos recursos, y que pueden convertirse en una alternativa energética y/o productiva, al ser utilizados como sustratos en la producción biotecnológica de compuestos económicamente más rentables.

Siendo Nariño una región altamente agrícola, se puede observar que la mayor parte de los ingresos a su economía, provienen de la comercialización de los diferentes productos agrícolas con el resto del país, en donde la estabilidad del mercado se ve sujeta a continuas variaciones debido a cambios climáticos que influyen en las cosechas, el cierre de las vías que dificultan el transporte, o cambios de oferta y demanda que desestabilizan los precios, entre otros; cada uno de estos factores no permite aprovechar el potencial agrícola, y relega al Departamento a ser un simple productor de materias primas.

Un caso particular se ve reflejado en la producción de la papa, que a pesar de ser uno de los principales productos de comercialización del Departamento, es afectado por los problemas ya planteados, ocasionando pérdidas económicas al campesinado nariñense. Una alternativa para el mejor aprovechamiento de este producto, es utilizarlo como sustrato en procesos de fermentación para la elaboración de productos biotecnológicos como por ejemplo: Etanol, utilizado en la fabricación del Vodka y como combustible en algunos países⁴, de igual forma para la fabricación de aminoácidos como es el ácido glutámico, el cual es un producto utilizado en la industria de saborizantes y en la industria farmacéutica siendo uno de los aminoácido de mayor demanda en el mercado⁵.

Por tanto una alternativa frente a la problemática descrita, radica en la utilización del almidón obtenido de residuos de papa como sustrato, para la generación de un producto económicamente más rentable y de amplia comercialización como es el ácido glutámico.

⁴ TÉLLES A.; ALVAREZ G. y ROA A. Diseño y puesta en marcha de un sistema semicontinuo en dos etapas: hidrólisis – fermentación para la producción de etanol a partir de almidón de papa usando simultáneamente *aspergillus niger* y *saccharomices cerevisiae*. Revista Colombiana de Química. 1997. Vol. 26. No 2.

⁵ AJINOMOTO, Glutamato monosódico [en línea], Perú: s.n. [citado, feb. 2005] p 8.1-6. Disponible en Internet: <<http://www.ajinomoto.com.pe/GMS.html>>.

2. OBJETIVOS

2.1 GENERAL:

Obtener, purificar y cuantificar ácido glutámico en fermentos de hidrolizados de papa producidos con la bacteria *Corynebacterium glutamicum*.

2.2 ESPECÍFICOS:

Estandarizar el proceso de hidrólisis ácida que permita la mayor conversión de almidón a azúcares fermentables.

Obtener ácido glutámico a partir de hidrolizados de almidón de papa por procesos de fermentación, utilizando la bacteria *Corynebacterium glutamicum*.

Determinar la técnica más apropiada de aislamiento de ácido glutámico producido en el proceso de fermentación.

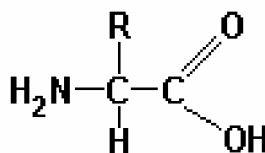
Ajustar la técnica de purificación de ácido glutámico para la obtención de un producto con la menor cantidad de impurezas.

Cuantificar la producción de ácido glutámico a partir de hidrolizados de papa en las condiciones y con los métodos utilizados.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 LOS AMINOÁCIDOS

Los aminoácidos son una clase importante de compuestos orgánicos que contienen un grupo amino (-NH₂) y un grupo carboxilo (-COOH). Veinte de estos compuestos son los constituyentes de las proteínas y se los conoce como alfa aminoácidos (α-aminoácidos) siendo los siguientes: alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, **ácido glutámico**, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina. Todos ellos responden a la fórmula general.



Donde los grupos amino y carboxilo se encuentran unidos al mismo átomo de carbono, llamado átomo de carbono alfa. Ligado a él se encuentra un grupo variable (R). Es en dichos grupos R donde las moléculas de los veinte alfa aminoácidos se diferencian unas de otras⁶. En la glicina, el más simple de los aminoácidos, el grupo R se compone de un único átomo de hidrógeno.

En otros aminoácidos el grupo R es más complejo, conteniendo carbono e hidrógeno, así como oxígeno, nitrógeno y azufre⁷. El ácido glutámico pese a no ser un aminoácido esencial es muy importante dentro de todos los organismos ya que es intermediario primordial en la transformación de la glucosa, para la producción de energía, de igual forma es una de las principales sustancias requeridas por el cerebro, para cumplir con sus funciones básicas y en la fijación de nitrógeno inorgánico a nitrógeno orgánico en plantas y otros microorganismos⁸.

⁶ LUQUE, Ernesto. Bioquímica Descriptiva. Colombia: Udenar, 1995. p. 39.

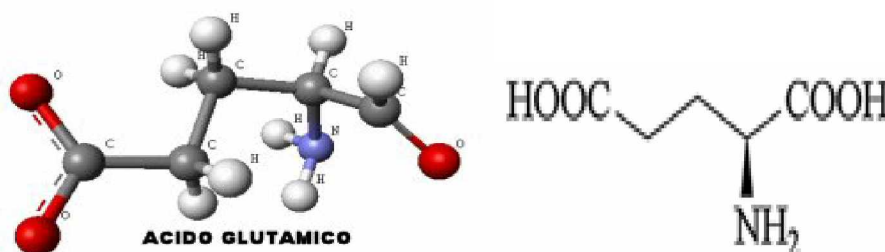
⁷ Ibid., p. 43,44.

⁸ RAYMOND, E. and DONALD, F. Enciclopedia de Tecnología Química. Proteínas e hidrolizados, España: Hispano-Americana. Tomo 13. p. 247.

El ácido glutámico posee las siguientes características⁹.

| | | |
|---------------------------|---|---------------------------------------------------------------------------------|
| Formula | : | C ₅ H ₉ NO ₄ |
| Peso Molecular | : | 147,13 g/mol |
| Rotación específica | : | $[\alpha]_{589,3 \text{ nm}}^{25} + 31.5^\circ$ en solución (HCl 5 M, a 20 °C), |
| Solubilidad | : | 0.864gH+/100gH ₂ O a 25°C |
| Punto de fusión. | : | 224 – 225 °C (descomposición) |
| Punto isoelectrico | : | 3.08 |
| Constantes de disociacion | : | pK ₁ 2.1, pK ₂ 4.07, pK ₃ 9.47 |

Figura 1. Estructura del ácido glutámico.



Fuente: Lehninger, A. Biochemistry 4ed. Barcelona. 2005. p. 79.

3.2 HISTORIA DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO GLUTÁMICO

A principios del siglo veinte el profesor Kikunae Ikeda, de la Universidad Imperial de Tokio, hacia esta reflexión 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 bien conocidos como el dulce, ácido, amargo y salado.”

En 1907, el Profesor Ikeda 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). El glutamato es un aminoácido y un ladrillo en la construcción de las proteínas el cual tiene un sabor diferenciado, distinto, de los sabores dulce, ácido, amargo y salado, siendo nombrado por el doctor Ikeda como "umami", cien gramos de kombu seco contienen aproximadamente un gramo de glutamato¹⁰.

⁹ KARLHEINZ, D. et. al. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Amino acids. By Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. DOI: 10.1002/14356007.a02_057.Marzo. 2001. p. 2.

¹⁰ INTERNATIONAL GLUTAMATE ORGANITATION, Glutamate. [en línea], s.l: s.f. [citado, feb. 2005]. p.1-8. Disponible en Internet: <<http://www.glutamate.org>>.

El Profesor Ikeda decidió elaborar un sazónador usando su recién aislado glutamato. Para ser usado como sazónador, el glutamato debía tener algunas de las mismas características que se encuentran, por ejemplo, en el azúcar y la sal: debía ser fácilmente soluble en agua, pero sin absorber la humedad ni solidificarse. El Profesor Ikeda observó que el glutamato monosódico tenía buenas propiedades de conservación y un fuerte sabor umami o sabroso. Resultó ser un sazónador ideal. Debido a que el glutamato monosódico carece de olor y de textura propia, se puede usar en muchos platos distintos, en los que potencia de manera natural el sabor original de los alimentos.

Existen dos formas de glutamato. El glutamato existe en la forma "ligada", formando parte de una proteína, junto a otros aminoácidos. También puede encontrarse en la forma "libre", en tejidos vegetales y animales. El glutamato libre es el que desempeña una función en el sabor y la aceptabilidad de los alimentos. Los alimentos que contienen altas concentraciones de glutamato libre, tales como el queso y los tomates maduros, se eligen con frecuencia debido a sus sabores diferentes y agradables¹¹.

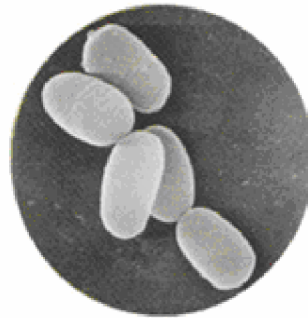
La producción de glutamato monosódico (MSG) fue pronto comercializada por la compañía Ajinomoto, basada en el aislamiento de proteínas vegetales como soya o proteína de maíz, desde entonces menos de 1Kg de MSG puede ser aislado a partir de 10Kg de material crudo, considerándose el proceso de bajo rendimiento y que ocasiona un desperdicio del material de partida. Otra opción de producción fue la síntesis química del D, L-Glutamato, la cual ha sido particularmente exitosa, pero de poco uso ya que se producía la sal de sodio del D-isómero que es de mal sabor.

La producción de MSG a gran escala se inició con el aislamiento de una bacteria específica, proceso realizado por el Dr. S. Udaka y el Dr. S Kinoshita en 1957. Ellos separaron los aminoácidos excretados por los microorganismos y descubrieron su modo de producción. Con la utilización de la bacteria 534 y el aumento de una sal mineral en el cultivo se obtenía una mayor producción de L-Glutamato a corto plazo, el cual era excretado al medio debido a la disminución del grosor de la capa lipídica que facilitaba su salida, esto se presentaba por la insuficiencia de biotina (vitamina H), la cual pertenece a un grupo de compuestos orgánicos que son indispensable para el crecimiento de numerosos microorganismos, interviniendo en la liberación de energía procedente de los hidratos de carbono y en la formación de ácidos grasos constituyentes de la membrana celular. Por tanto un número de bacterias con características iguales a la bacteria 534 fue aislado, las cuales hoy en día son conocidas con el nombre de *Corynebacterium glutamicum*¹² (Figura 2).

¹¹ INTERNATIONAL G. O. Op. cit. p. 1-8.

¹² EGGELING, L. and SHAM, H. L-Glutamato y L-Lisina, Productos tradicionales con impetuosos desarrollos. En: Journal Microbiology. Biotechnology. 1999. Vol. 52. p. 280-281.

Figura 2. Fotografía de *Corynebacterium glutamicum* tomada con un microscopio electrónico.



Fuente: http://gib.genes.nig.ac.jp/single/index.php?spid=Cglu_ATCC13032 visitada Diciembre del 2004.

La *Corynebacterium glutamicum* es una bacteria Grampositiva la cual puede ser aislada de la tierra junto con los *Streptomyces propionibacterium*, o *Arthobacter*, que también son una subdivisión de las bacterias Grampositivas. La gran comercialización de MSG ha sido impulsada por el uso de la *Corynebacterium glutamicum* en países asiáticos como Indonesia y Japón¹³.

3.3 USO COMERCIAL DEL ÁCIDO GLUTÁMICO

Los aminoácidos son usados para gran variedad de propósitos, la industria de la comida requiere L-glutamato como un saborizante acentuador y la glicina como un endulzador de jugos y otros, como se muestra en la Tabla 1. La industria química requiere aminoácidos, como precursores en la síntesis de proteínas, y diversos compuesto, la industria farmacéutica requiere aminoácidos, como infusiones en casos de falencias de aminoácidos esenciales, o para incluirlos en la dieta suplementaria y por último y no menos importante como aditivos en los suplementos alimenticios para los animales forrajeros.

Como se puede observar en la Tabla 1, el ácido glutámico es uno de los aminoácidos más utilizados comercialmente como saborizante, ya que se distingue entre los demás aminoácidos por su abundancia y por poseer un sabor exquisito al paladar, que tiene la propiedad de intensificar el sabor natural del producto con el que puede ir asociado, característica que los demás aminoácidos no presentan. Solamente el isómero natural (forma L) del ácido glutámico goza de esta propiedad intensificante de sabor, mientras que el isómero no natural (forma D) es relativamente fuerte y de mal sabor¹⁴.

¹³ RAYMOND, E. and DONALD, F. Enciclopedia de Tecnología Química. Ácido glutámico. España: Hispano-Americana, Tomo 2. p. 201.

¹⁴ EGGELING, and SHAM. Op. cit. p. 282.

Tabla 1. Utilización de los aminoácidos en la industria.

| Cantidad de aminoácidos producidos | | | |
|------------------------------------|-------------------|--------------------------------|----------------------|
| Producción Toneladas/ año | Aminoácido | Método de producción preferido | Uso más común |
| 800000 | L-Ácido Glutámico | Fermentación | Saborizante |
| 350000 | L-Lisina | Fermentación | Aditivo para purinas |
| 350000 | D,L-Metionina | Síntesis química | Aditivo para purinas |
| 10000 | L-Aspartato | Catálisis enzimática | Edulcorante |
| 10000 | L-Fenilalanina | Fermentación | Edulcorante |
| 15000 | L-Treonina | Fermentación | Aditivo para purinas |
| 10000 | Glicina | Síntesis química | Aditivo para comida |
| 3000 | L-Cisteina | Reducción de cistina | Aditivo para comida |
| 1000 | L-Arginina | Fermentación, Extracción | Farmacéutico |
| 500 | L-Leucina | Fermentación, Extracción | Farmacéutico |
| 500 | L-Valina | Fermentación, Extracción | Pesticidas |
| 300 | L-Triptófano | Proceso celular | Farmacéutico |
| 300 | L-Isoleucina | Fermentación, Extracción | Farmacéutico |

Fuente: Eggeling L. and Sham, H (1999). Producción biotecnológica de aminoácidos. Appl. Microbiol. Biotechnol, Pág. 283.

La mayor parte del ácido L-glutámico usado en la industria es convertido en la sal monosódica (MSG) que se emplea mucho como condimento en la preparación de conservas de pescado, de carne, en sopas enlatadas, y tiene creciente aceptación como sazónador en la preparación de comidas en los restaurantes. Otras aplicaciones de este aminoácido son la sal sódica de ácido piroglutámico, la cuál es obtenida por la deshidratación de ácido glutámico seguido por la neutralización con hidróxido de sodio, es muy higroscópica y es utilizada como un componente natural para la fabricación de cosméticos humectantes¹⁵. También se utiliza en la fabricación de un polímero de glutamato de metilo el cual es usado como un agente que recubre la piel sintética¹⁶. Además un condensado de ácido glutámico con formaldehído es útil como un agente para retardar el secado del yeso (sulfato de calcio hidratado) utilizado en la construcción y la escultura¹⁷. El compuesto N-Acilado producido por la reacción con una cadena larga de ácido graso es un surfactante aniónico y sirve popularmente para la industria de limpiadores cutáneos y de cabello debido a que no causa ningún daño¹⁸. La dibutilamida de éste ácido N-acilglutámico gelatiniza aceites poco polares que pueden ser usados como un agente para recobrar aceite derramado en el mar¹⁹.

¹⁵ LADEN, K.; SPITZER, R. and COSMET, J. Chem. Vol. 19. 1967. p. 351 – 360.

¹⁶ WAKASA, R. et al. Asahi Chemical Industry. 1963. Japan 68–23 (360).

¹⁷ KUNTZE, R. Domtar Ltd., USA.. Patent No 3 451 832, 1965.

¹⁸ TAKEHARA, M.; YOSHIDA, R. and YOSHIKAWA, M. Cosmet. Toiletries. 1979. No. 94. p. 31 – 39.

¹⁹ HONMA, M.; KEDA, T. and KAGAKU, I, No Ryouiki. 1982. Vol. 36. p. 697 – 701.

El glutamato es producido en el organismo humano y desempeña una función fundamental en el metabolismo. Además, el glutamato se encuentra en abundancia en la leche materna, a concentraciones casi diez veces mayor que en la leche de vaca. Una persona promedio consume entre 10 y 20 gramos de glutamato ligado, y un gramo de glutamato libre a través de los alimentos que ingiere diariamente. El glutamato de los alimentos no tiene ninguna diferencia con el sintetizado biotecnológicamente y su producción por este proceso se debe a que es muy importante en la industria como ya se mencionó anteriormente. El organismo humano crea diariamente 50 gramos de glutamato libre donde la mayor parte se metaboliza rápidamente y se utiliza como fuente de energía. Desde una perspectiva nutricional, el glutamato es un aminoácido no esencial, ya que nuestro organismo puede fabricar su propio glutamato a partir de otras fuentes proteicas²⁰.

3.4 PRODUCCIÓN DE L-GLUTAMATO (ÁCIDO GLUTÁMICO)

El ácido glutámico fue el primer aminoácido producido a gran escala gracias al uso exclusivo de la bacteria *Corynebacterium glutamicum* la cual es comercializada por la American Type Culture Collection, que es una de las bibliotecas microbiológicas más grandes del mundo, ubicada en USA la cual vende las bacterias en forma liofilizada. En la Tabla 2 se referencian las características principales del microorganismo utilizado en la industria para la producción biotecnológica del ácido glutámico.

Tabla 2. Características generales de la bacteria *Corynebacterium glutamicum*.

| | |
|----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ATCC Numero | 13032 |
| Organismo | <i>Corynebacterium glutamicum</i> (Kinoshita et al.) Abe et al. En forma de <i>Micrococcus glutamicus</i> |
| Designación | 534 [NCIB 10025] |
| Nivel de Bioseguridad | 1 |
| Forma de envío | Deshidratación en frío |
| Condiciones de crecimiento | ATCC medio: 3 (Agar Nutritivo o caldo Nutritivo) |
| Temperatura | 37.0 °C |
| Permisos de manipulación | Además del MTA pueden requerirse permisos de la ATCC, y/o otros permisos para el traslado de este material de la ATCC. Cualquier material de la ATCC adquirido es responsabilidad de los compradores. |

Fuente: AMERICAN Type Culture Collection. *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 [en línea]. Manassas, VA 20108 USA: ATCC. [citado en junio 2004]. Disponible en Internet: <<http://www.atcc.org/SearchCatalogs/directdetail.cfm?collection=ba&atccNum=13032>>.

²⁰ ZELLO Ga, et al. Recent advances in methods of assessing dietary amino acid requirements for adult humans. Journal Nutrition 1995. Vol. 12. No 5. p. 290.

Las rutas metabólicas utilizadas por el *Corynebacterium glutamicum* en la producción de ácido L-Glutámico son la: glucólisis, el camino de síntesis de pentosas fosfato y el ciclo del ácido cítrico para generar metabolitos precursores y nucleótidos pirimidínicos reducidos como el NADH + H⁺ y el NADPH + H⁺, indispensables para la formación del L-glutamato. En algunos casos la bacteria muestra una especial afinidad a las reacciones anapleróticas del ciclo del ácido cítrico (ver Fig.3), y teniendo en cuenta que el L-Glutamato es un derivado directo del α -cetoglutarato, una alta replicación del ciclo del ácido cítrico asegura una gran producción de ácido glutámico.

Originalmente se asumió que solo la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) esta presente como una enzima carboxilante dentro de las reacciones anapleróticas en la producción de oxalacetato, pero a medida que las investigaciones moleculares junto con estudios con marcación de ¹³C y análisis de flujo se iban realizando, mostraban que otra reacción de carboxilación debía estar presente; la búsqueda de esta actividad permitió obtener la enzima piruvato carboxilasa (PyrC) la cual no fue detectada por una medición directa ya que es muy inestable en extractos crudos, por tanto se requirió de un análisis *in situ* de la enzima, usando cuidadosamente la permeabilidad de la célula para la extracción de los compuestos intermediarios y su posterior análisis en el planteamiento de la ruta metabólica. Además la *Corynebacterium glutamicum* posee la piruvato deshidrogenasa (PyrDH) la cual produce Acetil Coenzima A, que dentro del ciclo del ácido cítrico y conjuntamente con las enzimas mencionadas anteriormente, proveen el citrato esencial para producir el L-Glutamato²¹.

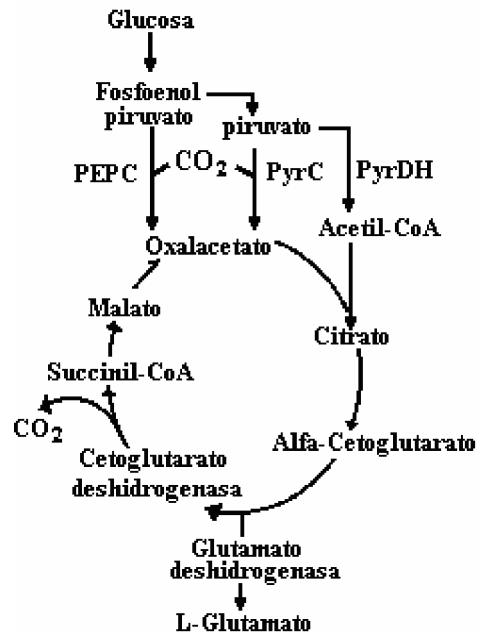
La clonación de los genes precursores junto con estudios mutagénicos, mostraron que las dos carboxilasas, fosfoenolpiruvato y la piruvato carboxilasa, pueden básicamente remplazar una a la otra, en la conversión de glucosa en oxalacetato, por eso el *Corynebacterium glutamicum* al poseer ambas enzimas tiene una enorme flexibilidad para suministrar los intermediarios en el ciclo del ácido cítrico, mejorando notablemente la producción del ácido glutámico.

La aminación reductiva de α -cetoglutarato para producir L-Glutamato es catalizada por la glutamato deshidrogenasa, por tanto el L-glutamato esta presente en la célula en concentraciones altas de 150 mM. En contraste, otros aminoácidos presentan concentraciones intracelulares usualmente por debajo de 10mM. Las altas concentraciones suplen el propósito de síntesis de L-Glutamato requerido por la célula y también suplementan los grupos amino en las reacciones de transaminación en gran variedad de reacciones intracelulares. Como máximo el 70% de los grupos amino son suministrados por el L-Glutamato²².

²¹ ZHANG, Chengyan, et al. On-line prediction of products concentrations in glutamate fermentation using metabolic network model and linear programming. En: Journal Biochemical Engineering. 2005. Vol. 25. p. 101.

²² Ibid. p. 106-108.

Figura 3. Esquema general de las reacciones en *Corynebacterium glutamicum* conectadas con el ciclo del ácido cítrico y la relevancia para la producción del L-Glutamato.



Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), Piruvato Carboxilasa (PyrC), Piruvato deshidrogenada (PyrDH).

Fuente: Eggeling L. and Sham, H. Producción biotecnológica de aminoácidos. Appl. Microbiol. Biotechnol, 1999. Pág. 286.

3.5 PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA

Para la producción biotecnológica de L-Glutamato, el aminoácido sintetizado intracelularmente debe ser retirado de la célula, esto por supuesto no es tan fácil, ya que la carga eléctrica del aminoácido hace que este sea retenido por la bacteria debido a la característica apolar de la membrana celular; sin embargo por circunstancias especiales se ha descubierto que en la *Corynebacterium glutamicum*, el L-Glutamato se excreta con mayor facilidad cuando la Biotina (vitamina H) se encuentra en pequeñas cantidades, ya que esta deficiencia ocasiona en la bacteria los siguientes cambios:

- Se presenta un transporte activo, hacia la excreción del L-glutamato al exterior de la célula.
- Ocasiona una disminución en la cantidad de fosfolípidos de la bicapa lipídica en la membrana celular, lo que facilita la excreción del ácido glutámico.

Además se requiere la adición de un compuesto específico el cual anula la carga iónica del aminoácido permitiendo el escape de este por la membrana celular junto con otros iones y metabolitos, igualmente una activa exportación permite a la célula transportar el L-glutamato de concentraciones internas de 0.15M hacia concentraciones muy altas de 1M en el exterior, alcanzadas en los caldos de cultivo por procesos de fermentación.

Sin embargo, para propósitos prácticos es importante tener en cuenta unas condiciones moleculares apropiadas de la membrana citoplasmática, que permitan iniciar una exportación activa de las moléculas de L-Glutamato a través de la misma. Los iniciadores para desarrollar estas condiciones son diversos y se indican a continuación²³:

El crecimiento bajo limitantes biológicas

La adición de anestésicos locales

La adición de penicilina

La adición de surfactantes

El uso de ácido oleico auxótrofo

El uso de glicerol auxótrofo

Estos factores conllevan a la excreción del L-glutamato, a pesar de esto, todavía no se conocen bien los mecanismos que causan este fenómeno, ni los efectos biológicos, aunque el efecto clásico de la biotina en el camino de la excreción del L-glutamato es bien conocido. La biotina es un cofactor de la Acetil coenzima A carboxilasa, la cual, en limitada cantidad reduce la actividad enzimática y consecuentemente la síntesis de grasas; efecto que conduce a una disminución en la cantidad de fosfolípidos y por ende una disminución en la bicapa lipídica de la membrana celular como consecuencia del cambio en concentración de ácidos grasos. Se ha evidenciado que bajo una limitación de biotina el contenido de fosfolípidos será drásticamente reducido de 32 a 17 mmol mg⁻¹ sobre peso seco. Igualmente el contenido de ácido oleico insaturado se incrementa relativamente en relación al ácido palmítico saturado en un 45%, lo cual representa una severa alteración de los estados físicos de la membrana que se ve significativamente alterada haciéndola más fluida y ocasionando la fácil salida del L-glutamato.

Otro factor que permite la extracción del aminoácido es la exposición de la *Corynebacterium glutamicum* a la acción de penicilina o drogas surfactantes que reducen la actividad de la alfa cetoglutarato deshidrogenasa a un 10% de su actividad normal, impidiendo una conversión del excedente de alfa-cetoglutarato a succinil-Co A, mientras que la actividad de la glutamato deshidrogenasa es afectada en forma mínima, favoreciendo su conversión a L-Glutamato²⁴.

²³ EGGELING, and SHAM, Op. Cit., p. 286.

²⁴ Ibid. p. 287.

3.6 PARÁMETROS MÁS IMPORTANTES DURANTE LA FERMENTACIÓN

3.6.1 Concentración de amonio. Aunque el uso de una gran cantidad de amonio en el proceso de fermentación es ideal para la conversión de azúcares a L-Glutamato, ya que suministra los grupos amino esenciales para la formación del aminoácido, también es preciso decir que un exceso de la concentración en los caldos de cultivo inhibe la síntesis del mismo, por tanto el amonio es agregado en bajas concentraciones al principio de la fermentación siendo adicionado con cuidado en el transcurso de ésta a medida que los microorganismos lo vayan consumiendo²⁵.

3.6.2 Oxígeno disuelto. La concentración de oxígeno debe ser controlada puesto que si las condiciones son insuficientes con valores entre el 0% y el 10% de O₂ disuelto, la producción de L-Glutamato es pobre y la presencia de ácido láctico se ve favorecida junto con la producción de ácido succínico, en cambio, un exceso de oxígeno disuelto mayor al 40%, ocasiona la presencia de alfa cetoglutarato el cual puede ser acumulado como producto, por tanto son recomendadas concentraciones de O₂ disuelto entre el 10% y el 40% para una buena producción de ácido glutámico²⁶.

3.6.3 pH. La producción fermentativa de ácido L-glutámico es sustancialmente afectada por el pH del medio durante el curso de la fermentación, ya que la acumulación de ácidos orgánicos producidos por el metabolismo de carbohidratos del microorganismo tienden a volver el medio ácido, el control de pH se debe mantener entre un rango de 6 a 9, y preferiblemente entre 7 y 8.5, por la continúa adición de amoniaco o hidróxido de sodio, lo cual favorece la producción de ácido glutámico²⁷.

3.6.4 Temperatura. La temperatura es otro de los parámetros importantes para el éxito de la fermentación; por lo tanto a medida que la temperatura aumenta, se aumenta la velocidad de las reacciones enzimáticas y por lo tanto el crecimiento de los microorganismos se hace más rápido. Sin embargo, por encima de ciertas temperaturas se produce la desnaturalización de las proteínas y la descomposición de los componentes celulares esenciales para mantener la vida de los microorganismos. Para cada microorganismo existe una temperatura mínima por debajo de la cual no presentan crecimiento, una temperatura óptima que permite un crecimiento más rápido del microorganismo y una temperatura máxima donde no hay crecimiento bacteriano. A fin de obtener rendimientos óptimos las fermentaciones se deben llevar a cabo en un margen estrecho de

²⁵ EGGELING, and SHAM, Op. Cit., p. 287-289.

²⁶ ZHANG, Op. Cit., p. 99-100.

²⁷ KINOSHITA, Shukuo; TANAKA, Katsunobu and AKITA, Sadao. Microbiological production of amino acid by reductive amination. USA: Patented Number 3.220.929 Nov. 30, 1965.

temperatura, y de ser posible constante. Las fermentaciones que se realizan para el *Corynebacterium glutamicum* deben estar dentro del rango mesófilo entre 20 y 45°C preferiblemente entre 30 y 33°C²⁸.

3.6.5 Concentración de glucosa. La concentración de sustrato es una de las limitantes del crecimiento bacteriano y por ende de la producción del aminoácido, donde concentraciones de glucosa cercanas a 350g/l provocan un nulo crecimiento del microorganismo y bajas concentraciones limitan su crecimiento, presentándose como concentraciones óptimas de sustrato 50 y 100 g/l donde se obtiene el mayor crecimiento bacteriano y por ende una adecuada producción del aminoácido²⁹.

3.6.6 Agitación y mezclado. La agitación y aireación en biorreactores afectan la distribución de oxígeno y nutrientes esenciales para un óptimo crecimiento de los microorganismos. Las fuerzas hidrodinámicas asociadas con agitación y el colapso de las burbujas forzan la estructura de la pared celular lo que puede resultar en productividad microbiana no óptima, a causa de un desvío³⁰ en las rutas metabólicas bacterianas y en los cambios de tamaño y forma de los microorganismos, recomendando agitaciones alrededor de 200rpm^{31,32}.

3.7 EXTRACCIÓN DEL AMINOÁCIDO.

Después del precultivo, el tratamiento de las excreciones de L-Glutamato se da mediante la concentración por la adición de antiespumantes de polioxietileno sorbitan monopalmitato (Tween 40), obteniendo un rendimiento del 60 al 70% con respecto a la glucosa utilizada. El fin de la fermentación llega cuando el caldo de cultivo contiene un exceso de L-Glutamato en forma de sales de amonio³³, procediendo a la separación de las células del caldo mediante centrifugación. Aunque la recuperación del ácido glutámico puede realizarse de forma sencilla concentrando el caldo y precipitando el aminoácido a bajas temperaturas, el método más utilizado en la actualidad es el de resinas de intercambio iónico, la

²⁸ DELAUNAY, S., et al. An improved temperature-triggered process for glutamate production with *Corynebacterium glutamicum*. En: Journal Enzyme and Microbial Technology. 1999. Vol. 25. p. 762-768.

²⁹ KHAN, Noor; MISHRA, Indra, et al. Modeling the growth of *Corynebacterium glutamicum* under product inhibition in L-glutamic acid fermentation. En: Journal Biochemical Engineering. 2005. Vol. 25. p. 173-175.

³⁰ FOWLER, J. and ROBERTSON, C. Metabolic Behaviour of Immobilized Aggregates of *Escherichia coli* of varying mechanical stress. En: Environ. Microbiology. 1991. No. 57. p. 93-101.

³¹ WASE, D. and PATEL, Y. Variations in the volumes of microbial cells with changes in the agitation rate of chemostat cultures. En: Journal of General Microbiology. 1985. No. 131. p. 725-728.

³² ILLING, Suzi y HARRISON, Susan. The Kinetics and mechanism of *Corynebacterium glutamicum* aggregate breakup in bioreactors. En: Chemical Engineering Science, 1999. Vol. 54. p. 441-454.

³³ KUNUKI, Kino and TETSUYA, Abe. Method for producing L-amino acids by fermentation, USA: Patented 6.706517 Mar 16 2004.

cual retiene los iones de las sales de amonio y que posteriormente pueden ser retirados³⁴. El amonio puede ser recuperado por destilación para ser nuevamente utilizado. La elusión de la fermentación es tratada con NaOH con la cual se extrae el ácido glutámico en forma de MSG el cual se cristaliza y se vende como un producto de alta calidad³⁵.

3.8 SUSTRATO

El sustrato es la fuente de carbono y en algunos casos de nitrógeno, del cual se alimentan las bacterias, cumpliendo con algunos requisitos básicos como: ser económico, y estar en una forma asimilable para el microorganismo. Entre los sustratos más usados en fermentación se encuentran los almidones, los cuales hacen parte de una extensa variedad de plantas, como es el caso de las papas, maíz y cereales³⁶ etc.

El almidón de papa es producido en grandes cantidades en Europa, especialmente en Holanda, Polonia, y Alemania, el cual es generalmente aislado de papas en mal estado o excedentes de las cosechas³⁷ donde los rendimientos de la extracción de almidón están entre el 12 y 19% basado en el producto crudo.

En Nariño se producen un total de 201838.5 toneladas³⁸ de papa semestralmente, de las cuales un 80% se dispone en el mercado, un 15% restante es usado como semilla para nuevas cosechas y un 5% se pierde por mal estado. Cabe resaltar que del 80% comercializado solo un 50% cumple con los requerimientos mínimos de calidad exigidos para este producto, el otro 50% del producto es papa de muy baja calidad que se vende a un precio muy inferior, lo que ofrece pocas ganancias para los productores; por tanto si se considera un 3% de papa no comercializable, entonces se tendría alrededor de 6055 toneladas de papa residual en cada semestre, pudiendo ser utilizada en la producción 1211 toneladas de almidón, que por procesos de hidrólisis ácida rendirían aproximadamente 1000 toneladas de azúcares fermentables, con los cuales se obtendrían por fermentación un total de 690.27 toneladas de ácido glutámico que hoy en día presenta gran demanda y poca oferta dentro del mercado mundial con un precio promedio de

³⁴ OI-WAH, Lau and CHUEN-SHING, Mok. Indirect conductometric detection of amino acids after liquid chromatographic separation Part II. determination of monosodium glutamate in foods. En: Analytica Chimica. 1995. Acta 302. p. 45-52.

³⁵ AJINOMOTO. Op. Cit. p. 8.

³⁶ WIKIPEDIA, la enciclopedia libre. Almidón [en línea]: sn. [citado en enero 2005]. Disponible en Internet: <<http://es.wikipedia.org/wiki/Almid%C3%B3n>>

³⁷ MORENO, Dilmer. Calidad de la papa para usos industriales. Santa Fe de Bogota CORPOICA, 2001. p. 1.

³⁸ GONZÁLEZ, A. Consolidado agropecuario (Julio – Diciembre) 2003. Nariño: Ministerio de agricultura y desarrollo rural; Gobernación de Nariño; Secretaria de agricultura y medio ambiente, 2003. Cap. 3. p. 19-20.

400pesos/g³⁹, siendo éste uno de los más utilizados dentro del grupo de aminoácidos, y solamente producido en países altamente industrializados.

3.8.1 Composición química del sustrato. Dentro de los componentes nutritivos, el que se encuentra en mayor porcentaje es el agua, que constituye el 80% del total del peso de la papa, le siguen los carbohidratos que constituyen el 16-20% aunque en algunos muestreos de la Colección Central Colombiana de papa este valor oscila entre 13% y un 30%, observándose que esta variación está influenciada por factores climáticos, tipo de suelo, fertilización, riego, temperaturas diurnas y nocturnas en estado de maduración, etc. En este último grupo de componentes hay que destacar el grupo de los almidones que son polisacáridos y que se absorben como glucosa previa hidrólisis enzimática.

En Nariño la papa con mayor cantidad de almidón es la variedad *Diacol capiro* que presenta un porcentaje del 60% - 80% de almidón sobre la materia seca, siendo la más utilizada actualmente, debido a la buena oferta que presenta durante la mayor parte del año y a que su producción se adelanta generalmente cerca de las plantas de producción de papas fritas convirtiéndose en la variedad más usada por la industria a nivel nacional⁴⁰.

La fibra alimentaria representa del 1 al 2% del total de la papa y se encuentra preferentemente en la cáscara. La concentración de azúcares sencillos es baja, entre el 0 y el 5%, siendo los más importantes la glucosa, fructosa y sacarosa. Es importante controlar la concentración de azúcares de la papa con objeto de prevenir las reacciones de pardeamiento no enzimático o reacciones de Maillard. Este tipo de reacciones indeseables puede aparecer cuando se alcanzan concentraciones del 2% de azúcares reductores debido a la elevación de la temperatura de almacenaje. De igual forma la papa contiene otros compuestos en muy bajo porcentaje⁴¹.

3.8.2 Hidrólisis del almidón. Los polisacáridos deben ser hidrolizados hasta monosacáridos para poder ser utilizados por los microorganismos. La hidrólisis de un enlace glucosídico se lleva a cabo mediante la disociación de una molécula de agua del medio. El hidrógeno del agua se une al oxígeno del extremo de una de las moléculas de azúcar y el OH se une al carbono libre del otro residuo de azúcar. El resultado de esta reacción, es la liberación de un monosacárido y el resto de la molécula que puede ser un monosacárido si se trataba de un

³⁹ VITAMIN House's. venta de vitaminas y aminoácidos. [en línea]. "Lugar de publicación desconocido": s.n.[citado en Julio 2004]. P.1. Disponible en Internet. <www.vitaminhouses.com/tienda/catalog/popup_image.php/pID/370>.

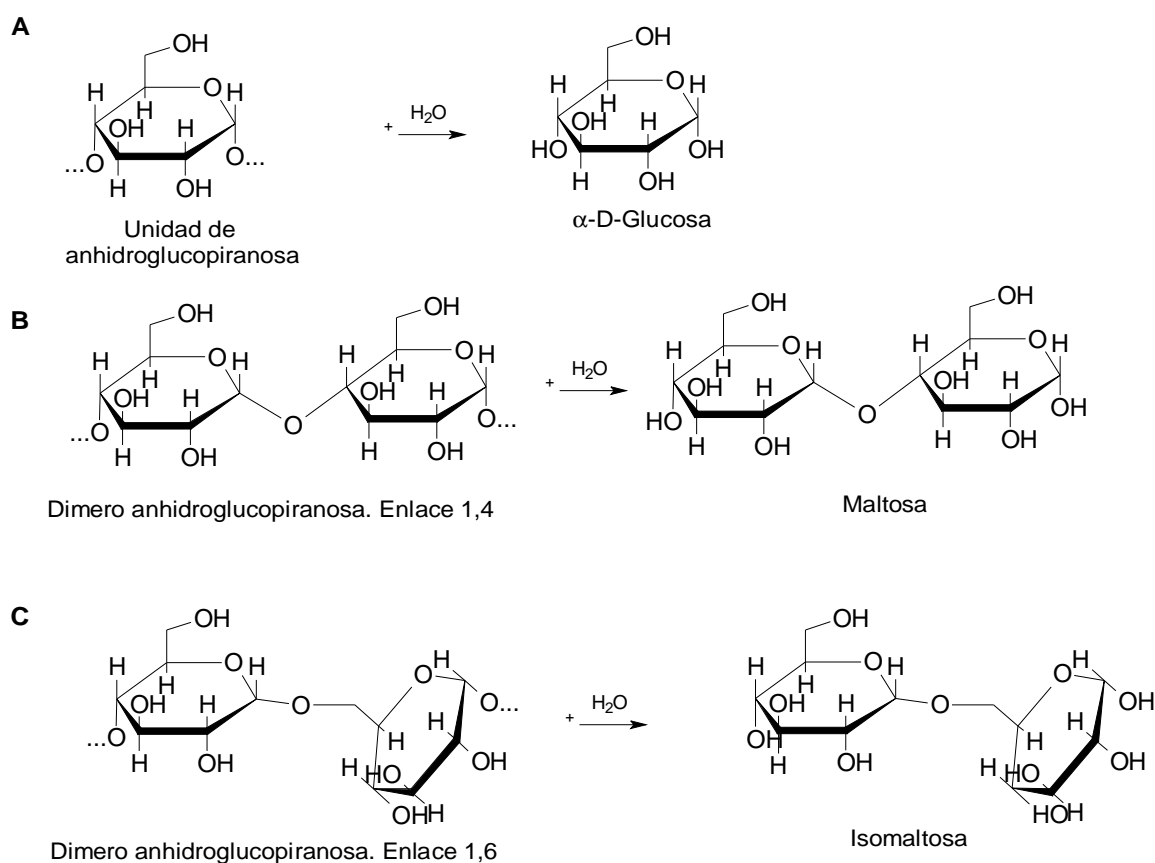
⁴⁰ MORENO, D. Op. Cit. P. 5.

⁴¹ WOOLFE. Comparación del contenido de macronutrientes de la papa (cruda y referido a peso seco) con otros alimentos vegetales. 1987. p. 4.

disacárido o bien del polisacárido restante si se trataba de un polisacárido más complejo.

La hidrólisis de los almidones ocurre cuando los enlaces de las unidades de anhidroglucopiranosas son rotos catalíticamente por el uso de ácidos o de las enzimas α -amilasa (1 \rightarrow 4) y glucosidasas (1 \rightarrow 6) con la adición de agua, presentándose la formación del monómero (D-glucosa) y de los dímeros α -1,4- (maltosa) o α -1,6- (isomaltosa)⁴² Figura 4.

Figura 4. Hidrólisis de polímeros de anhidroglucopiranosas.



Fuente: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* Copyright ©. by Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. All rights reserved. 2002.

⁴² NELSON, J. Rapid determination of Starch: An index to maturity in starchy vegetables. *En: Journal of industrial and Engineering Chemistry*. 1963. Vol. 15. No. 3.

4. METODOLOGÍA

La investigación comprendió cinco etapas:

Activación y preservación de la bacteria *Corynebacterium glutamicum*.
Muestreo y obtención de almidón.
Producción del hidrolizado.
Procesos de fermentación.
Extracción y cuantificación del ácido glutámico.

4.1 ACTIVACIÓN Y PRESERVACIÓN DE LA BACTERIA *Corynebacterium glutamicum*

Ésta se llevó a cabo en tres etapas:

Etapas 1: El liofilizado del microorganismo *Corynebacterium glutamicum* (ATCC 13032) fué adquirido de las bibliotecas microbiológicas de la American Type Culture Collection (ATCC), mediante la colaboración del Departamento de Ciencias Médicas de la Universidad de Puerto Rico, donde 0.5g de este liofilizado se hidrató con 1.5ml de caldo nutritivo Oxoid Ref. CM0001, se agitó la solución y se agregó 2ml más de caldo.

Etapas 2: De la solución madre se tomaron cuatro alícuotas de 0.5ml y se mezclaron con 0.5ml de una solución al 50% de glicerol y 50% caldo nutritivo (Oxoid Ref. CM0001) en microtubos separados de 1.5ml; dos de los cuales se llevaron a congelación a -4°C, y los otros dos a refrigeración a 4°C para la conservación del microorganismo⁴³.

Etapas 3: De la solución madre y utilizando un asa estéril se realizaron 5 siembras por agotamiento de la bacteria *Corynebacterium glutamicum* (ATCC 13032) en cajas petri en medio de cultivo sólido, Agar nutritivo (Oxoid Ref. CM0003), todo previamente esterilizado en autoclave. Los cultivos se llevaron a incubadora de coliformes a 37°C durante una semana⁴⁴. Al final de ésta se compararon las características morfológicas de las colonias con las reportadas en el manual de Bergey's; además se realizaron las pruebas de tipificación primarias para el

⁴³ AMERICAN Type Culture Collection. Instructions for rehydrating Freeze-Dried Cultures. Manassas, VA 20108 USA: ATCC. 2005. p 1-2.

⁴⁴ NEREIDA, Armando y MONTIEL, Edie. Utilización de la metodología de superficie de respuesta de la optimización de un medio de cultivo para la producción de l-lisina por *Corynebacterium glutamicum*. *Instituto de Biología Experimental; **Instituto de Zoología Tropical; Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. En: Agronomía Tropical 2000. Vol. 50. No 2. p. 167-188.

microorganismo que fueron: crecimiento en medio líquido, crecimiento en medio sólido de telurito sódico y tinción de Gram⁴⁵.

4.1.1 Dotación del microorganismo. Para las distintas pruebas, la bacteria se mantuvo por repique, de la muestra original en agar nutritivo (Oxoid Ref. CM0003) cada dos semanas. Para disminuir la tasa de crecimiento de las bacterias, los cultivos se mantuvieron a temperatura ambiente⁴⁶.

4.2 MUESTREO Y OBTENCIÓN DEL ALMIDÓN

Se realizó un muestreo al azar de residuos de papa de la variedad *Diacol capiro*, la cual no cumplía con los requerimientos de comercialización con un diámetro menor a 6 cm y morfología irregular⁴⁷. Este muestreo fue llevado a cabo en los municipios de Túquerres, Aldana y Pupiales por su gran producción de papa⁴⁸ de cada uno de los cuales se obtuvo 10kg de muestra para un total de 30Kg. El material recolectado se descascaró eliminando residuos de tierra presentes en la superficie irregular de la papa, que dificultan la limpieza del almidón. Se tomó una muestra representativa de cada uno de los tres sectores de 200g c/u, colocándolos a 50°C durante 24 horas y se determinó humedad y peso seco por diferencia de pesos, proceso que se realizó por triplicado (Anexo A).

El material ya lavado se picó en trozos y se homogenizó la muestra obtenida de los diferentes lugares, de los cuales se tomaron 5 muestras de 200g para someterlos a diferentes tiempos de licuado (1,3,5,7 y 10min) a 2500rpm, obteniendo la mejor relación de tiempo para la mayor cantidad de almidón extraído, este proceso realizado por triplicado (Anexo B).

Una vez obtenidas las mejores condiciones se trituró una muestra de 15kg en un molino eléctrico Nossen hasta tener un tamaño de partícula fino, posteriormente se licuó en una licuadora industrial Javar de 15L, por cinco minutos, liberando la mayor cantidad de almidón posible; la pulpa obtenida se lavó con 3 volúmenes de agua revolviéndola constantemente durante 1 minuto, los almidones se separaron de la materia orgánica por precipitación, retirándose en cada lavado el líquido oscuro causado por la oxidación de algunos azúcares y solaninas⁴⁹, este último proceso se repitió 4 veces hasta obtener un líquido de lavado claro.

⁴⁵ BERGEY'S., Manual de determinación bacteriológica, 7 ed. p. 1274.

⁴⁶ HIBINO, Wataru; YOSHIHARA, Yuhiko and SUGIMOTO, Masakazu. Method for producing L-glutamic acid by fermentation. USA: Patented number 6.852.516 Feb 8 2005.

⁴⁷ MORENO, D. Op. Cit. P. 5.

⁴⁸ GONZÁLEZ, Op. Cit. p.18.

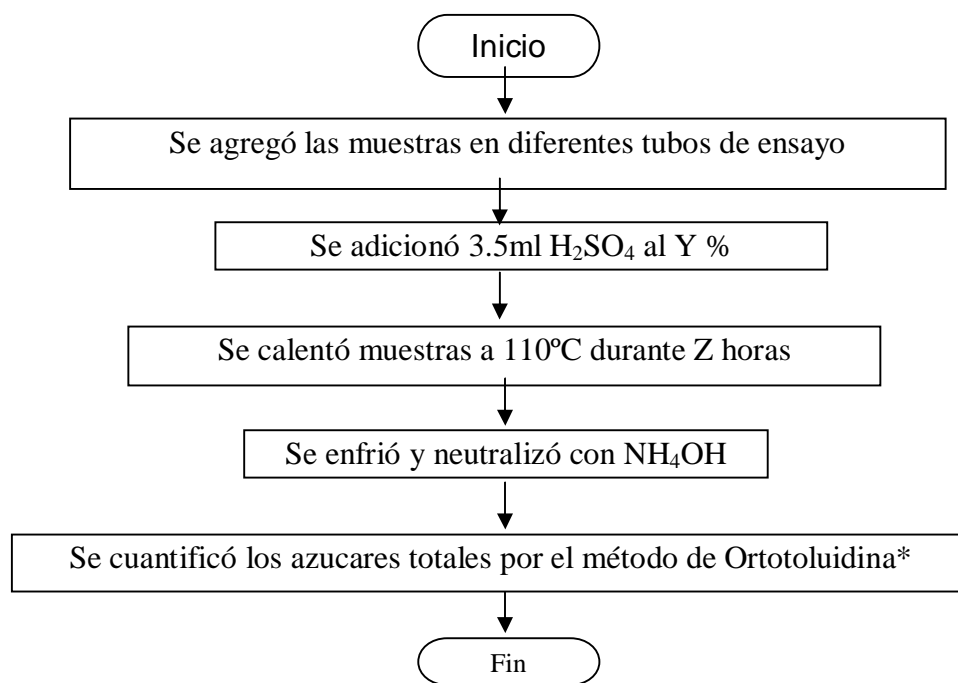
⁴⁹ AARHUS, Park.. Memorandum Técnico en la producción de almidón de papa. Dinamarca: International Starch Institute Science, 1996. p.1-13.

En el último lavado y utilizando un tamiz fino, se separó la materia orgánica residual de los almidones, hasta que éstos ya precipitados tomaron una textura compacta a la compresión y un color blanco puro en el fondo del recipiente; se retiró la mayor cantidad de agua de lavado del recipiente con el almidón y se lo secó entre 35 y 40°C en estufa⁵⁰. El almidón ya seco y de textura granular se molió nuevamente con un mortero obteniendo un polvo fino manejable.

4.3 PRODUCCIÓN DEL HIDROLIZADO

Del almidón obtenido se extrajeron 25 muestras de 25mg cada una y se les aplicó el tratamiento indicado en la figura 5, con el cual se logró la estandarización de las condiciones de hidrólisis^{51,52,53}.

Figura 5. Diagrama de flujo seguido en la producción de hidrolizados.



(Y) Concentración de H₂SO₄. (Z) Tiempo de hidrólisis. *⁵⁴.

⁵⁰ BELLO, Luis, et al. Isolation and partial characterization of banana starches. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1999. Vol. 47. p. 855

⁵¹ Ibid., p. 854-857.

⁵² RAYMOND, E. and DONALD, F. Enciclopedia de Tecnología Química, Hidrólisis con ácidos en almidones, España: Hispano-Americana. Tomo 1, p. 753.

⁵³ TÉLLES Op. Cit. p.2-6.

⁵⁴ HYAVARINER, A. and NIKKITA, E. Specific determination of blood glucose with o-toluidine. En: Clinical Chemistry, 1966. Vol 7. p.140-143.

4.3.1 Variables de manejo:

Y = Concentración de H_2SO_4 en la hidrólisis de los almidones con valores del 1% - 2% - 3% - 4% y 5%. En esta fase se evaluó el rendimiento de la hidrólisis ácida a diferentes concentraciones.

Z = Tiempo en el cual se dejó actuar el ácido para que hidrolice los enlaces glucosídicos de los almidones, sus valores fueron de: 4h – 8h – 12h – 16h y 20h.

Con este tratamiento se obtuvo un total de 25 ensayos, los cuales se realizaron por triplicado para ver la reproducibilidad de los datos indicados en el Anexo C.

4.3.2 Determinación de azúcares totales. Los azúcares totales incluida la glucosa, se determinaron por el método de ortotoluidina⁵⁵, cuantificándose en cada uno de los hidrolizados realizados con las variables ya descritas, leyendo su absorbancia a 635nm.

4.3.3 Saturación de almidón. Utilizando las mejores condiciones de concentración de ácido y tiempo de hidrólisis se realizaron pruebas de saturación de almidón en la reacción, evaluando concentraciones de almidón del 20%, 35% y 45% (w/v), encontrándose la mejor relación de la cantidad de almidón frente al volumen de ácido.

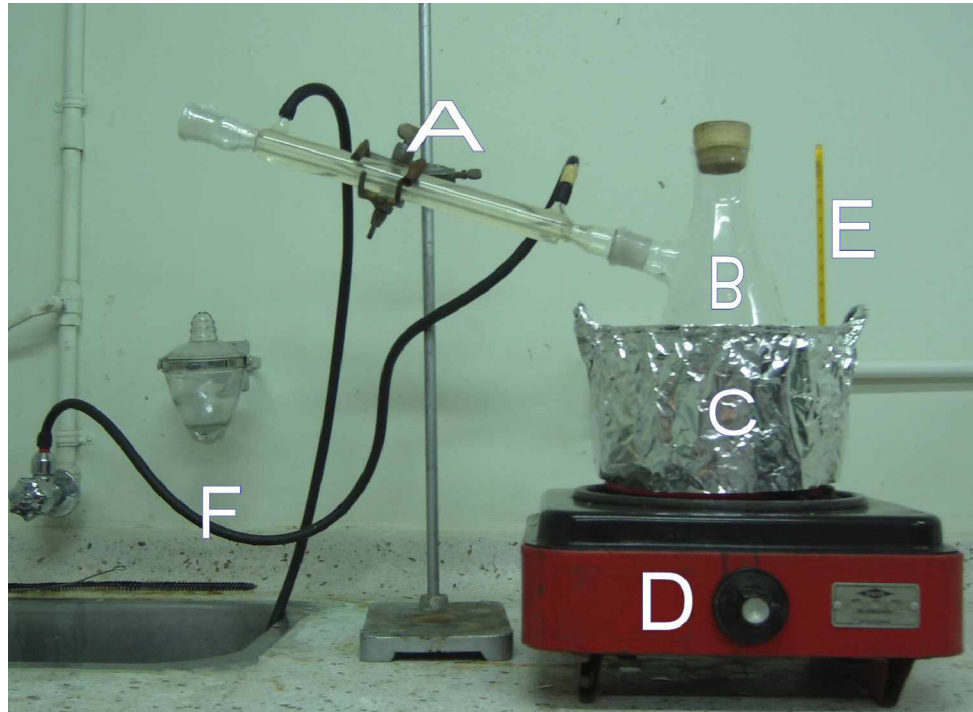
4.3.4 Evaluación del método. Determinadas las condiciones óptimas del proceso de hidrólisis se pesó 250g de almidón y se diluyó en 1l de H_2SO_4 al 1%, calentándose a 110°C en baño salmuera por un periodo de 8 a 10 horas en reflujo, montaje indicado en la Figura 6, tiempo en el cual se retiró, se enfrió y se filtró eliminando los sólidos no hidrolizados, los cuales se secaron a 40°C evaluando el rendimiento por diferencia de pesos, en el filtrado se cuantificaron los azúcares reductores con el método de antrona⁵⁶ a 525nm y glucosa total según glucosa oxidasa⁵⁷ (Anexo D).

⁵⁵ ALEMANY, Lamana y FONT, Sebarroja. Practicas de bioquímica. España: Alambra 1983. p. 32-212.

⁵⁶ Ibid., p. 81.

⁵⁷ BAYER, Glucostix de Bayer No 2 [en línea]. Chile: © Bayer S.A. [citado marzo 2005]. Disponible en Internet: <http://www.ascensia.cl/productos_servicios/glucostix/glucostix.asp>

Figura 6. Montaje del proceso de hidrólisis.



A) Condensador B) Reactor C) Baño salmuera D) Fuente de calentamiento
E) Termómetro F) Entrada y salida de agua

4.4. PROCESO DE FERMENTACIÓN

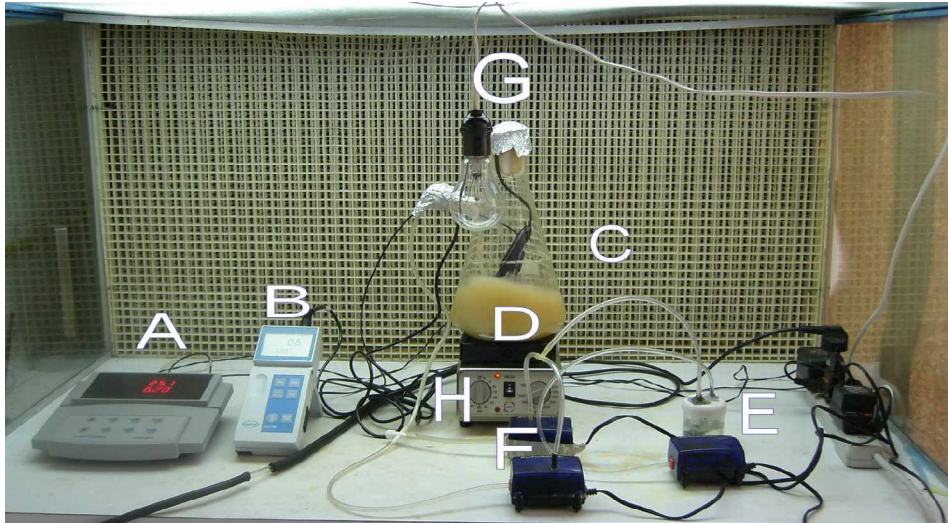
4.4.1 Preparación del inóculo. Se esterizaron 100ml de caldo nutritivo (Oxoid Ref. CM0001) en un erlenmeyer de 300ml, inoculándose con una colonia bacteriana de 0.3cm de diámetro del microorganismo *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, tomada del medio sólido preparado en la etapa tres de la preservación bacteriana. El inóculo se cultivó a 31°C con agitación rotatoria a 200 rpm durante 24 horas, en las cuales se alcanzó una concentración de 10^8 cel/ml aproximadamente, cuantificadas en cámara de Neubauer⁵⁸.

4.4.2 Cultivo en biorreactores. El biorreactor utilizado en el proceso de fermentación (Figura 7), consta de un erlenmeyer de 2 litros, el cual contiene a la mitad de su altura un desprendimiento lateral, que junto con su boca principal fueron los lugares de acceso sensores para el control de pH, T°, porcentaje de O₂ y el suministro de aire, realizado mediante un difusor de acuario conectado a una trampa de hipoclorito para prevenir contaminación.

⁵⁸ KINOSHITA, Shukuo; UDAKA, Shiego and AKITA, Sadao. Method of producing L-glutamic acid by fermentation. USA: Patented Number 3.003.925 Oct. 10, 1961.

Las fermentaciones se realizaron dentro de una cámara de flujo laminar No 2, permitiendo mantener la temperatura (30°C - 31.5°C), y disminuyendo la contaminación a la hora de controlar pH (6.5-7.5) en el fermentador, lo cual se realizó agregando NH₄OH al 26%⁵⁹.

Figura 7. Montaje para del proceso de fermentación.



A) pHmetro WWR Scientific 8010. B) Oxímetro Hach DO175. C) Reactor. D) Sensores. E) Trampa de hipoclorito. F) Bombas de aire AirTech. G) Bombilla incandescente. H) Agitador rotatorio Schott.

Los nutrientes se esterilizaron en autoclave a 120°C por 20 min, cada nutriente en diferente recipiente evitando posibles reacciones por las altas temperaturas, y los equipos se esterilizaron con luz ultravioleta por un periodo de 4 horas. Una vez ubicados los nutrientes en el montaje de la fermentación, se inoculó con el precultivo ya preparado, dejando fermentar bajo condiciones estándar de pH y T^o. Algunos nutrientes y condiciones de agitación y aireación se variaron, con base en los tratamientos reportados en bibliografía, T1⁶⁰, T2⁶¹, T3⁶², T4⁶³, T5⁶⁴, por sus excelentes rendimientos en la producción de ácido glutámico, e indicados en la Tabla 3.

⁵⁹ HIBINO, Op. cit. p. 2.

⁶⁰ KINOSHITA. 1965. Op. cit. p11.

⁶¹ TSUCHIDA, Takayasu and HARUO, Uchibori. Process of producing L-aminoacid by fermentation. USA: Patented Number 5.705.370 Ene. 6 1998. p. 8.

⁶² KINOSHITA. 1961. Op. cit. p8.

⁶³ ZHANG, Op. cit. p. 6.

⁶⁴ KHAN, Op. cit. p. 174.

Tabla 3. Nutrientes utilizados en los caldos de cultivo.

| Nutrientes | T 1 | T 2 | T 3 | T4 | T 5 |
|-------------------------------------------------|-----------|-----------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Hidrolizado de almidón | 100g | 100g | 100g | 50g | 50g |
| * Glucosa | 100g | 100g | 100g | 50g | 50g |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 2g | 10g | | | |
| Úrea | 5g | | 15g | 3g | 5g |
| KH ₂ PO ₄ | 1g | 2g | 1g | 1g | 1g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0.5g | 1g | 0.25g | 0.6g | 0.4g |
| FeSO ₄ .H ₂ O | 0.02g | 0.01g | 5mg | 0.002g | 0.01g |
| MnSO ₄ .7H ₂ O | 0.02g | 0.01g | 0.01g | 0.002g | 0.01g |
| Soya | 1.25g | 1.25g | 5g | 15g | 1.25g |
| Tiamina | 500 µg | 500 µg | 500 µg | 500 µg | 80 µg |
| Biotina | 5 µg | 5 µg | 5 µg | 5 µg | 5 µg |
| Antiespumante | | | | | 0.5g |
| Inoculo | 100ml | 100ml | 100ml | 100ml | 100ml |
| Condiciones | | | | | |
| pH | 6.5-7.5 | 6.5-7.5 | 6.5-7.5 | 6.5-7.5 | 6.5-7.5 |
| Temperatura | 30-31.5°C | 30-31.5°C | 30-31.5°C | 30-31.5°C | 30-31.5°C |
| Aireación | 500ml/min | 500ml/min | 30% O ₂ | 30% O ₂ | 30% O ₂ |
| Agitación | 220rpm | 1200rpm | 220rpm | 200rpm | 120rpm |
| Tiempo | 72horas | 48horas | 96horas | 48horas | 48horas |

*Glucosa: sustrato utilizado en las fermentaciones testigo

Hidrolizado de almidón: sustrato utilizado en los procesos de fermentación

Cada tratamiento se realizó inicialmente con un testigo de glucosa pura, ya que es el sustrato reportado en los artículos, y posteriormente se realizaron fermentaciones utilizando como sustrato hidrolizado de almidón, estas últimas se realizaron por triplicado. En cada uno de los caldos de fermentación correspondientes a los tratamientos indicados en la Tabla 3 se cuantificaron glucosa consumida según el método de glucosa oxidasa⁶⁵, y ácido glutámico producido con el método de ninhidrina⁶⁶ a 570nm (Anexo E).

⁶⁵ BAYER, Op. cit.

⁶⁶ ALEMANY, Op. cit. p. 209.

4.5 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ÁCIDO GLUTÁMICO.

Finalizada la fermentación, se aumentó el pH del medio a 9.7 con NaOH en granallas, y se procedió a eliminar la biomasa del medio utilizando centrifugación a 10.000 rpm por 10min a 4°C; al líquido sobrenadante se le agregó HCl 1N hasta un pH de 7, se tomaron muestras de cada uno de los líquidos centrifugados cuantificándose glucosa residual mediante glucosa oxidasa a un pH de 7.0, y concentración de ácido glutámico mediante espectrofotometría utilizando reactivo de ninhidrina, a un pH de 3.2⁶⁷. Se cuantificó el rendimiento de producción de ácido glutámico en los líquidos de fermentación, con respecto a la glucosa consumida por los microorganismos.

4.5.1 Extracción de ácido glutámico. La extracción del ácido glutámico de los caldos de fermentación se realizó utilizando el proceso de concentración y precipitación en los tratamientos T1, T2, T3 y T4 como metodología de ensayo, y resinas de intercambio iónico en el tratamiento T5 como metodología alternativa.

4.5.1.1 Concentración y precipitación de ácido glutámico. Eliminadas las células de los caldos de fermentación, el líquido con un pH neutro se concentró a 1/5 del volumen inicial a una temperatura de 60°C, seguidamente se refrigeró la solución por 24 horas, tiempo en el cual precipitaron cristales de ácido glutámico junto con residuos de la fermentación que fueron separados por continuos lavados y filtraciones al vacío⁶⁸.

4.5.1.2 Extracción del aminoácido con resinas de intercambio iónico. Se rellenó una columna corta (1.2 cm x 10cm) con 10g de resina Dowex50-x2 (H⁺) la cual primero se lavó con 100ml de ácido clorhídrico 4M seguido por un lavado con 100ml de agua hasta que el eluyente presentó un pH neutro. Inmediatamente se transfirió en forma lenta a la columna, utilizando una bureta, 50ml del sobrenadante de la fermentación con un pH de 9.7 y una velocidad de flujo del eluyente ajustado a 0.5ml/min. Terminado la elusión de todo el líquido, se cambió el recipiente de recepción y se lavó la columna con 5ml de agua, posteriormente con 10ml de HCl 0.8M manteniendo la velocidad de flujo, regulando la llave de la bureta, y después agregando 18ml de HCl 1M, con una velocidad ajustada a 1.5ml/min, eluyendo el glutamato monosódico en forma de ácido glutámico de la columna, finalmente se agregó 5ml de agua para lavar la columna⁶⁹. El líquido recolectado se concentró a una quinta parte del volumen inicial mediante calentamiento a 40°C, y se llevó a refrigeración por 12 horas, obteniéndose cristales de ácido glutámico, separados por filtración al vacío.

⁶⁷ TSUCHIDA, Op. cit. p. 4.

⁶⁸ KINOSHITA, Op. cit. p. 2.

⁶⁹ OI-WAH and CHUEN-SHING, Op. cit. p. 47.

4.5.2 Cuantificación del aminoácido. Los cristales se secaron a 40°C, se pesaron y se determinó su rendimiento con respecto al aminoácido cuantificado en los caldos de fermentación, previamente se identificaron mediante cromatografía en capa fina⁷⁰, y se determinaron sus propiedades transformándolo en glutamato monosódico por adición de suficiente cantidad de NaOH 1N (ó 0.272g) por cada gramo de ácido glutámico puro, y comparándolo con un reactivo de glutamato monosódico puro.

⁷⁰ ALEMANY, Op. cit. p. 209.

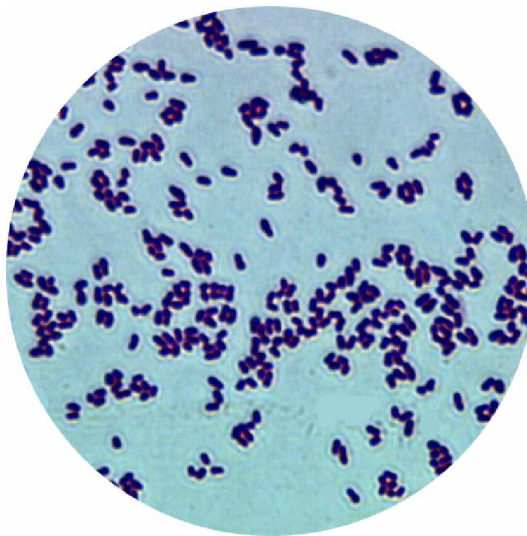
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 ACTIVACIÓN Y PRESERVACIÓN DE LA BACTERIA *Corynebacterium glutamicum*.

Obtenida una buena dotación del microorganismo en cajas petri con agar nutritivo se procedió a realizar las siguientes pruebas:

5.1.1 Tinción de Gram. Con esta prueba debido al color violeta presentado se logró caracterizar la bacteria dentro del grupo de Bacilos ovoides Gram positivos no flagelados, característico del microorganismo *Corynebacterium glutamicum*. Figura 8.

Figura 8. Tinción de Gram para *Corynebacterium glutamicum*, Observada a 1000X.



5.1.2 Morfología de colonias en agar nutritivo. Las colonias fueron: lisas, enteras, circulares, ligeramente aplanadas con brillo, de color amarillo pálido, idénticas a las reportadas en el manual de Bergey'S⁷¹. Figura 9

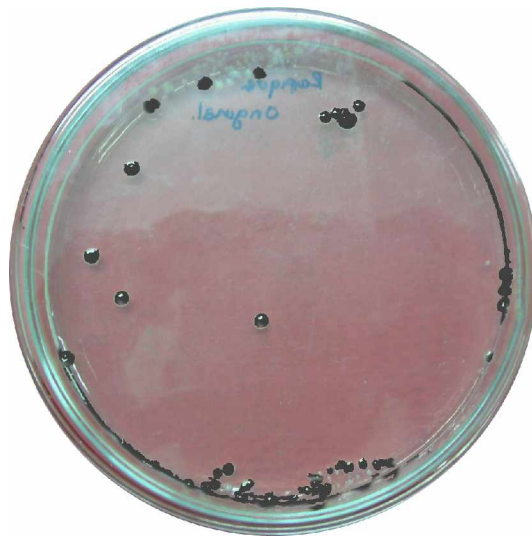
⁷¹ BERGEY'S. Op. cit. p. 1274.

Figura 9. *Corynebacterium glutamicum* en agar nutritivo (Oxoid, Ref CM0003).



5.1.3 Morfología en agar telurito sódico. (Oxoid, Ref CM0275). Las colonias fueron: circulares, enteras, de color gris oscuro similares a las reportadas en el manual de Bergey'S⁷², Figura 10.

Figura 10. *Corynebacterium glutamicum* en agar de telurito sódico (Oxoid, Ref CM0275).



⁷² BERGEY'S. Op. cit. p. 1274.

5.1.4 Cultivo en caldo nutritivo. (Oxoid, Ref CM0001). El microorganismo presentó una moderada turbidez con sedimento flocular. Figura 11

Figura 11. *Corynebacterium glutamicum* en Caldo nutritivo (Oxoid, Ref CM0001).



Según los resultados obtenidos con las pruebas realizadas se confirmó que el microorganismo adquirido de la American Type Culture Collection (ATCC), corresponde con la bacteria *Corynebacterium glutamicum* (ATCC 13032), ya que las pruebas realizadas coinciden con las publicadas en el listado de especies del Manual de Bergey's 7th ed., por tanto no se hizo necesario realizar más pruebas de tipificación.

5.2 CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS Y OBTENCIÓN DEL ALMIDÓN

Las muestras de papa recolectadas en los tres municipios, tenían una forma irregular con un diámetro no mayor a los 6 centímetros, la cual en su mayoría es utilizada para consumo de los mismos obreros, comercializada a menor costo, o como semilla en posteriores cultivos, y en algunos casos dependiendo de su cantidad, se utiliza como alimento para cerdos.

5.2.1 Determinación de humedad y peso seco de la papa utilizada. La variación de humedad en la variedad de papa *Diacol capiro* es mínima entre cada municipio (Anexo A), obteniéndose un promedio total de humedad del 80.31%, y un promedio en peso seco del 19.69%, porcentajes que se encuentran dentro del rango reportado para las diferentes variedades de papa⁷³, con valores de humedad entre el 63,0% y el 87,0% y en peso seco entre el 13% y el 37%.

⁷³ MARÍN, A. y FLORES, A. Extracción de almidones totales en siete variedades experimentales de papa para la producción de etanol por fermentación. Universidad Distrital Francisco José de Caldas, 2005.

Tabla 4. Humedad y peso seco de la papa utilizada.

| Municipio | Parámetro | |
|-----------|-----------|-------------|
| | % Humedad | % Peso seco |
| Túquerres | 79.61 | 20.39 |
| Aldana | 80.02 | 19.98 |
| Pupiales | 81.30 | 18.70 |
| Media | 80.31 | 19.69 |

5.2.2 Determinación de tiempo de licuado. El tiempo de licuado es un factor a tener en cuenta en la extracción de almidón, ya que si éste es muy prolongado la materia orgánica tiende a descomponerse en partículas muy pequeñas que se mezclan fácilmente con el almidón, dificultando y extendiendo su purificación, mientras que un tiempo muy corto impide que se libere todo el almidón.

Para esta determinación se homogenizaron las muestras de los tres municipios con un peso de cada muestra de 200g, obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 5. Tiempo de licuado y peso de almidón obtenido.

| Tiempo licuado (min) | Almidón obtenido (g) |
|----------------------|----------------------|
| 1 | 18.44 |
| 3 | 14.10 |
| 5 | 28.44 |
| 7 | 23.50 |
| 10 | 18.60 |

La mayor obtención de almidón se logró en un tiempo de licuado de 5min, valor presentado en cada réplica (Anexo B), debido a que en los tiempos inferiores, el almidón no fue liberado en su totalidad y en tiempos superiores al reportado, la materia orgánica tomó un tamaño de partícula muy fino, mezclándose fácilmente con el almidón; como consecuencia se realizaron más lavados que ocasionaron pérdida del producto. En este proceso se necesitan grandes volúmenes de agua para limpiar el almidón de sus contaminantes como las solaninas, materia orgánica, y azúcares reductores, por tanto, encontrar un tiempo de licuado adecuado es necesario para ahorrar recursos como lo es el agua y energía.

Una variable que no se tuvo en cuenta, sin embargo presentó gran importancia, fue la temperatura de secado, donde el almidón obtenido se secó a una temperatura menor de 45°C, permitiendo obtener un producto harinoso y fácil de manejar, en cambio temperaturas mayores contribuyen a una cristalización no adecuada del almidón y un difícil manejo por su gran dureza.

El total de almidón extraído, utilizando las anteriores variables, a partir de 15 kg de papa fue de 2.1 kg con un rendimiento del 14% sobre peso total húmedo,

porcentaje muy inferior al reportado en bibliografía para la variedad de papa *Diacol capiro* con un 30% de almidón sobre peso total húmedo⁷⁴. Debido a que la cantidad de almidón es dependiente de muchos factores, puede variar considerablemente de semestre a semestre o de finca a finca por las condiciones climáticas que afectan cada región, tipo de suelo, fertilización, riego, temperaturas diurnas y nocturnas en estado de maduración, entre otras; lo que no permiten una comparación directa del almidón obtenido en este trabajo con el reportado en la bibliografía, pero si con respecto a la materia seca ya que se obtuvo un rendimiento del 71.1% de almidón sobre peso seco, valor encontrado dentro del rango reportado en bibliografía entre 60% y el 80% de almidón sobre peso seco⁷⁵.

5.3 PRODUCCIÓN DE HIDROLIZADOS.

En la producción de los hidrolizados se determinó que los factores más influyentes en el proceso de hidrólisis fueron:

Concentración de ácido sulfúrico.

Tiempo de hidrólisis.

Concentración de almidón.

5.3.1 Concentración de ácido sulfúrico. Aunque en la bibliografía se reportan hidrólisis a concentraciones de ácido muy altas (entre el 5 y el 75%)⁷⁶, para el caso de este trabajo se logró determinar que estas concentraciones no son las más adecuadas. Según las pruebas realizadas representadas en la Figura 12; en la cual utilizando la prueba semicuantitativa de orto-toluidina⁷⁷ donde la medida de la absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de azúcares reductores, se observó el comportamiento de la hidrólisis ácida durante el tiempo comparando los diferentes tratamientos propuesto en la metodología.

En la Figura 12 la curva de hidrólisis con ácido al 1% permite obtener la mayor cantidad de carbohidratos a un tiempo de 16 horas de hidrólisis, con una absorbancia igual a 2.6, siendo la de mayor relación tiempo frente a la cantidad de azúcares producidos. A una concentración de H₂SO₄ al 2% la producción máxima de azúcares se presentó a un tiempo de 12 horas, siendo más corta que la hidrólisis al 1%, pero presentando una ligera disminución en la producción de hidrolizados con una absorbancia de 2.2.

⁷⁴ _____ . La papa. Universidad austral de Chile. Escuela de agronomía. 2005. p.1-25.

⁷⁵ Ibid. p. 10.

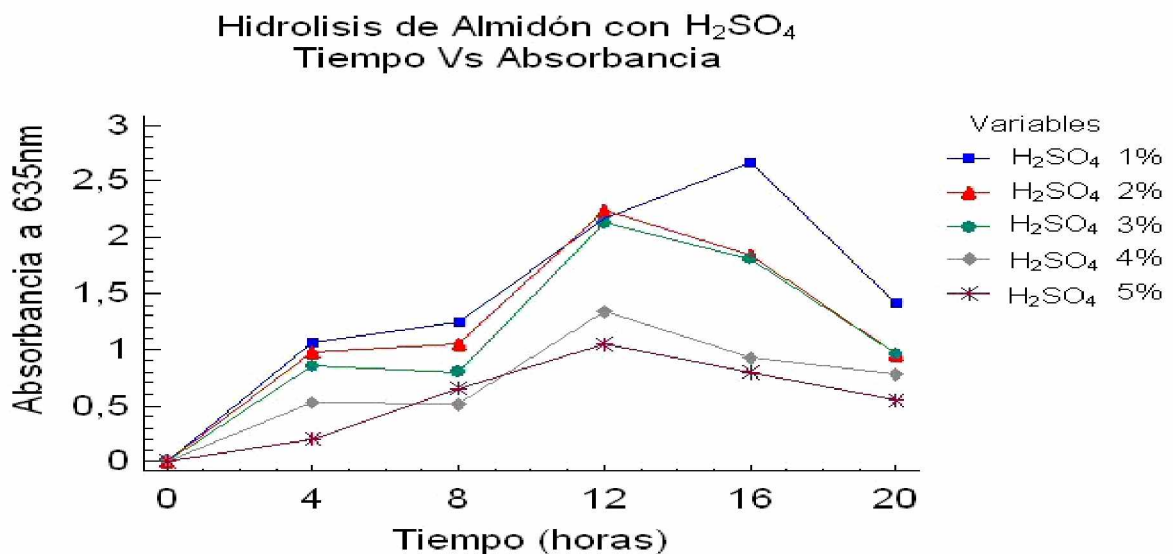
⁷⁶ MARÍN, Op. cit. p. 2.

⁷⁷ HYAVARINER, Op. cit. p.142.

Con una concentración de H_2SO_4 al 3% se observa una mayor producción de carbohidratos a un tiempo de 12 horas, sin embargo la concentración de azúcares sigue teniendo una leve disminución con una absorbancia de 2.1. Además se observa que los puntos inferiores marcan concentraciones más bajas que en las curvas al 1% y 2% (Figura 12). Para una concentración del 4% de H_2SO_4 , se puede observar que la mayor concentración de azúcares, se sigue presentando a un tiempo de 12 horas pero su concentración sigue disminuyendo ampliamente con una absorbancia máxima de 1.3.

La curva de hidrólisis a un 5% en H_2SO_4 presenta la mayor cantidad de azúcares a un tiempo de 12 horas, aunque el periodo de hidrólisis es más corto, la concentración de azúcares disminuyó notablemente al presentar una absorbancia máxima igual a 1.0.

Figura 12. Comportamiento de la hidrólisis de almidones a diferentes tiempos y concentraciones de H_2SO_4 .



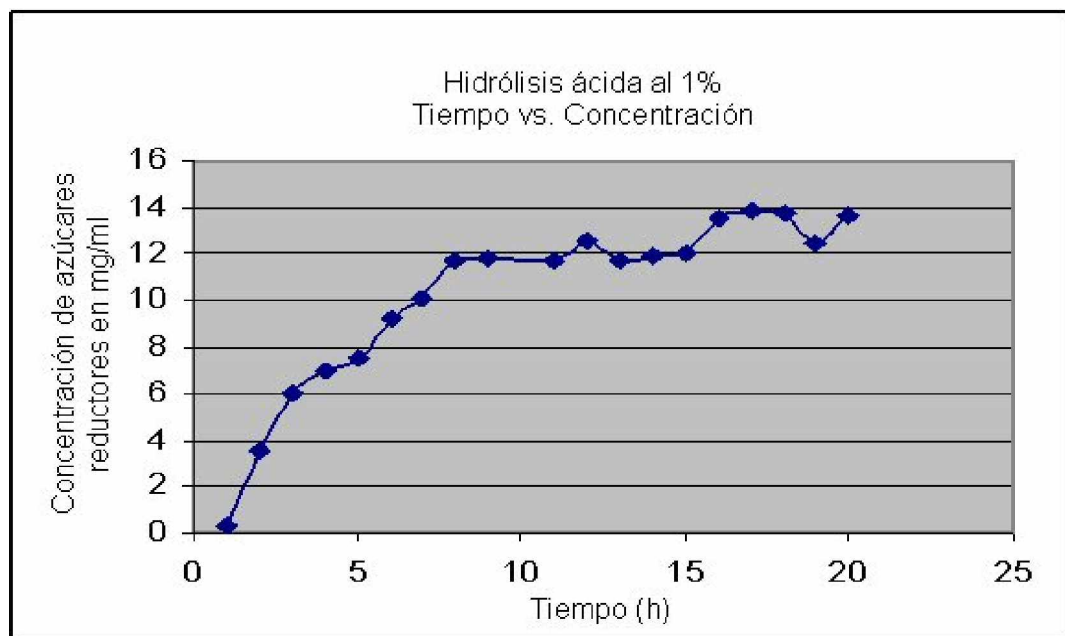
La Figura 12, muestra que al aumentar la concentración del ácido disminuye el tiempo de hidrólisis, factor muy importante en un proceso donde se utilizan recursos como energía y agua para el desarrollo del proceso generando un ahorro a tiempos menores, sin embargo, a pesar de que un aumento de ácido ocasiona una disminución del tiempo del proceso, este también ocasiona la disminución en la cantidad de carbohidratos reductores, esto debido a que la concentración de la glucosa aumenta por encima de la concentración de almidón, permitiendo al ácido atacarla mas fácilmente que al almidón, convirtiéndola en carbón⁷⁸ lo que reduce su concentración en solución, siendo inservible como fuente de alimento para los microorganismos.

⁷⁸ ALEMANY, Op. cit. p. 226.

Además, concentraciones tan altas de H_2SO_4 como en el caso de las curvas al 4% y 5%, también exigen el uso de una mayor cantidad de agente neutralizante que no es conveniente económicamente, por tanto el uso de concentraciones bajas como al 1% utilizado en este trabajo, permitió obtener una eficiente producción de azúcares fermentables (91.36% sobre peso de almidón hidrolizado), además de requerir cantidades muy bajas de agentes neutralizantes y disminuyendo el riesgo que implica manejar concentraciones muy altas de ácido sulfúrico.

5.3.2 Tiempo de hidrólisis. Según las pruebas realizadas para la determinación de la concentración de ácido, se determinó, que la hidrólisis alcanzaba su más alto rendimiento entre las 10 y 16 horas independientemente de la concentración, con estos datos se procedió a realizar una hidrólisis mejor controlada a estas condiciones, cuantificándose los azúcares reductores mediante el método de antrona⁷⁹ obteniendo los resultados indicados en la Figura 13.

Figura 13. Curva de hidrólisis ácida al 1% con rangos de tiempo menores.



En la Figura 13, se puede observar claramente que la cantidad de carbohidratos producidos aumenta notablemente hasta un periodo de 8 horas, después de las cuales el proceso sufre un estancamiento, en donde la concentración de carbohidratos tiende a mantenerse estable con un leve aumento en la concentración de los mismos, esto debido a que después de este tiempo los productos superaban a los reactivos haciendo mas factible que el ácido ataque a las moléculas de glucosa que a las de almidón, degradando a carbono la glucosa

⁷⁹ ALEMANY, Op. cit. p. 81.

obtenida como ya se mencionó anteriormente, proceso que se evidenció con el oscurecimiento de la solución.

Según lo anterior, aunque se puede obtener un mejor rendimiento con un tiempo de hidrólisis superior a las 8 horas, el aumento de glucosa no es representativo como para continuar la hidrólisis, lo que implicaría mayores costos. Además el color obtenido después de las 8 horas dificulta el manejo del medio en procesos de fermentaciones, como es el caso de mediciones espectrofotométricas para cuantificar el producto obtenido.

5.3.3 Concentración de almidón. En esta parte se evaluó la capacidad máxima de hidrólisis de almidón, por parte de un volumen fijo de ácido sulfúrico al 1%, obteniéndose los resultados indicados en la Tabla 6.

Tabla 6. Capacidad de hidrólisis de almidón en ácido sulfúrico.

| H ₂ SO ₄ 1% (ml) | Almidón (g) | Observaciones |
|----------------------------------------|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 100 | 25 | La solución tomó un color claro y el almidón se solubilizó rápidamente en la primera hora de calentamiento, permitiendo una buena agitación y presentando un proceso de hidrólisis más homogéneo. |
| 100 | 50 | La solución se espesó un poco más en la primera hora de calentamiento dificultando su agitación, y por ende el proceso. En la cuarta hora tomo un color amarillo translúcido, continuando la hidrólisis por un periodo de tiempo más largo. |
| 100 | 70 | La solución se sobresaturó de almidón dificultando la agitación durante la primera hora y tomando un color amarillo pardo a partir de la segunda, lo que condujo a un daño del almidón carbonizándose por la acción de la alta temperatura suministrada en el proceso. |

Se determinó que la mejor relación de almidón frente al ácido para la hidrólisis, correspondió a un 20.8% w/v (Tabla 6), ya que concentraciones muy altas saturan la solución dificultando la movilidad del almidón, el cual se empieza a quemar después de 2 horas en calentamiento, en cambio concentraciones inferiores a la encontrada no aprovecharían el potencial de hidrólisis del proceso con el volumen de ácido utilizado.

Con las condiciones óptimas del proceso se hidrolizaron 2kg de almidón en cantidades separadas de 250g, donde se cuantificaron carbohidratos totales, usando el método de antrona con un coeficiente de correlación de $R^2 = 0.994$ y el

método de glucosa oxidasa con un coeficiente de correlación de $R^2 = 0.992$ obteniendo los siguientes resultados. Tabla 7

Tabla 7. Cuantificación de carbohidratos totales y glucosa en los hidrolizados a partir de 250g de almidón en 1l de H_2SO_4 al 1%.

| Hidrolizado | Azúcares totales según Antrona (g) | Glucosa total según Glucosa Oxidasa (g) | Peso seco de residuos insolubles (g) |
|-------------|------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------|
| 1 | 225.4 | 198.7 | 24.0 |
| 2 | 231.5 | 207.1 | 17.8 |
| 3 | 222.7 | 195.3 | 26.5 |
| 4 | 240.6 | 208.4 | 8.6 |
| 5 | 237.1 | 190.0 | 11.5 |
| 6 | 220.5 | 194.9 | 28.9 |
| 7 | 229.7 | 201.9 | 19.1 |
| 8 | 219.8 | 185.6 | 28.3 |
| Media | 228.4 | 197.7 | 20.58 |
| Rendimiento | 91.36% | 79.08% | 8.23% |

Con los datos obtenidos (Tabla 7), se logró determinar que los rendimientos no presentan gran variación, concertándose alrededor del 91.3% en producción de carbohidratos totales y en un 79.0% de glucosa total, además después del proceso de hidrólisis el líquido fue filtrado, con el fin de eliminar las dextrinas y algunos residuos de almidón que no alcanzaron a ser hidrolizados, el papel filtro se secó a 40°C durante 24 horas y se pesó la cantidad de material sobrante obteniéndose un promedio del 8.2% de producto no hidrolizado.

5.4 PROCESO DE FERMENTACIÓN.

5.4.1 Esterilización de los nutrientes. Antes de realizar las fermentaciones, se realizaron pruebas de solubilidad y reactividad de los micronutrientes agregados, obteniéndose los siguientes resultados:

Al esterilizar los hidrolizados con cualquiera de los demás compuestos, éstos se oscurecen dificultando los procesos de cuantificación y extracción del aminoácido, por tanto se esterilizaron individualmente, manteniendo el color amarillo translúcido presentado en el proceso de hidrólisis.

Los hidrolizados para los tratamientos T 1 y T 2 tuvieron que ser esterilizados antes de ser neutralizados con NH_4OH al 26%, ya que la neutralización provoca la formación de $(NH_4)_2SO_4$ (Ecuación 1), el cual a altas temperaturas y en presencia de glucosa, reacciona causando la reducción del ion sulfato a sulfito provocando

un color oscuro y el daño de los nutrientes que intervienen en el proceso de fermentación.



Ecuación 1

Para los tratamientos T3, T4 y T5 se optó por neutralizar los hidrolizados con CaCO_3 , (Ecuación 2) ya que éstos no requerían la presencia de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fuente de nitrógeno, sino úrea.



Ecuación 2

Las sales como el MgSO_4 , FeSO_4 y MnSO_4 por efecto del ion común no reaccionan y se mantienen como iones en el momento de esterilización para después ser consumidos por los microorganismos.

La fuente de fósforo KH_2PO_4 se esterilizó por aparte ya que por ser de carácter ácido reacciona con los cationes de las demás sales provocando su precipitación en forma de una sal doble al momento de su esterilización.

5.4.2 Producción de ácido glutámico en los fermentos. En las fermentaciones el objetivo principal fue el control de la producción del aminoácido mediante la cuantificación de glucosa consumida (método de glucosa oxidasa), cualificación del aminoácido⁸⁰ y cuantificación del ácido glutámico (método espectrofotométrico con reactivo de ninhidrina). Los resultados de las fermentaciones se indican en las Tablas 8 y 9.

Tabla 8. Glucosa consumida en las fermentaciones.

| Tratamientos | Glucosa consumida en los fermentos (g) | Glucosa consumida en el testigo (g) |
|--------------|----------------------------------------|-------------------------------------|
| T 1 | 72.5 | 72.0 |
| T 2 | 56.6 | 56.6 |
| T 3 | 88.2 | 89.1 |
| T 4 | 30.0 | 30.7 |
| T 5 | 28.6 | 28.6 |

Se evidenció que un mayor suministro de glucosa no siempre asegura una alta concentración del producto deseado (Anexo E), debido a que el factor de conversión del mismo depende más de factores fisicoquímicos, como son: oxígeno disuelto, agitación, temperatura, entre otras⁸¹ y que podemos compararlos con los

⁸⁰ ALEMANY, Op. cit. p. 212.

⁸¹ ILLING, S. Op. Cit. p.445.

rendimientos presentados en la producción de ácido glutámico (Tabla 9), donde los tratamientos T4 y T5 obtuvieron mejores relaciones de producción de aminoácido respecto a la glucosa consumida.

La glucosa consumida por los cinco tratamientos (Tabla 8), donde el alto consumo de glucosa en las fermentaciones T1 y T3 se relaciona directamente con el tiempo de fermentación, el cual fue de 72 y 96 horas respectivamente, esta similitud se puede apreciar más claramente en la relación de ácido glutámico producido con respecto a la glucosa consumida por el microorganismo con rendimientos de 25.5% para T1 y 26.7% para T3 (Tabla 10), en donde la diferencia entre las medias de estos tratamientos no es significativa al nivel de confianza del 95.0% según el análisis de Contraste múltiple de rango entre las medias de cada tratamiento (Anexo F), según esto podemos afirmar que usando los tratamientos T1 y T3 se obtienen rendimientos cercanos, a pesar de las variaciones en los nutrientes y condiciones en cada tratamiento.

Tabla 9. Cuantificación de ácido glutámico producido en los fermentos.

| Tratamientos | Ácido glutámico (g) | Ácido glutámico Testigo (g) |
|--------------|---------------------|-----------------------------|
| T 1 | 18.5 | 19.5 |
| T 2 | 16.9 | 17.8 |
| T 3 | 23.5 | 25.6 |
| T 4 | 12.0 | 12.3 |
| T 5 | 13.0 | 13.2 |

En la Tabla 9 se observa que los tratamientos T1, T2, y T3 presentan los mayores valores de ácido glutámico cuantificado, sin embargo esto contrasta con la gran cantidad de glucosa consumida por los mismos (Tabla 8), observando un bajo desempeño en el uso del sustrato. Además, como se puede observar los testigos de glucosa pura no presentan gran variación con respecto a las fermentaciones con hidrolizados de almidón, al realizar la prueba de Comparación de una media con un valor conocido con una confiabilidad del 95.0% (Anexo G) en donde los valores de t para la comparación de cada una de las medias experimentales de la fermentación (Tabla 10) con un valor conocido no exceden el valor límite para $P = 0.05$ que es de 4.3, esto indica que el comportamiento de las rutas metabólicas del *Corynebacterium glutamicum* no se ven afectadas por el uso de esta fuente de carbono.

Tabla 10. Rendimiento de aminoácido producido con respecto a la glucosa consumida.

| | T 1 % | T 2 % | T 3 % | T 4 % | T 5 % |
|-----------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| * Valor teórico | 32.0 | 40.1 | 34.9 | 48.0 | 48.0 |
| Testigo | 27.1 | 31.4 | 28.8 | 40.2 | 46.0 |
| Fermentación 1 | 24.3 | 28.3 | 25.8 | 38.3 | 46.9 |
| Fermentación 2 | 25.5 | 31.2 | 26.1 | 40.9 | 44.0 |
| Fermentación 3 | 26.7 | 30.1 | 28.1 | 41.8 | 45.7 |
| Media | 25.5 | 29.9 | 26.7 | 40.3 | 45.5 |

* Valores teóricos reportados bibliográficamente.

Los valores teóricos, se reportan bajo condiciones técnicas no mencionadas en la bibliografía como el tipo de agitación, el tipo de fermentador, el tamaño del difusor o el grado de pureza de aire usado en las fermentaciones. De acuerdo con lo anterior y mediante la comparación de las medias experimentales de los valores obtenidos con el valor teórico reportado (Anexo H) no se lograron replicar las condiciones para los tratamientos T1, T2, T3 y T4 (ver Tabla 10) ya que estos exceden el valor observado de $|t|$ para el valor crítico de $|t|$ 4.3 ($P = 0.05$) para 2 grados de libertad.

Lo anteriormente mencionado indica que existieron fallas de tipo técnico o sistemático que impidieron que se lograsen los rendimientos teóricos. En el caso del tratamiento T5, el valor de $|t|$ observado fue de 2.9, menor que el valor crítico de 4.3 (Anexo H), por tanto se logró replicar las condiciones reportadas en el tratamiento 5, esto se ve reflejado en el porcentaje de ácido glutámico conseguido con respecto a la glucosa consumida que fue del 45.5%. (Tabla 10).

Entre las principales diferencias del tratamiento T5 con respecto a los tratamientos T1, T2, T3 y T4, se puede señalar el uso de un antiespumante (Anexo I) el cual es un cofactor para la excreción de ácido glutámico al exterior de las célula⁸², que permitió un mayor control del oxígeno en el proceso de fermentación al evitar la producción de espuma.

⁸² EGGELING. Op. cit. 287.

5.5 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ÁCIDO GLUTÁMICO.

Teniendo en cuenta la baja solubilidad del ácido glutámico (0.864g/100ml de H₂O), inicialmente se optó por utilizar el método reportado por Kinoshita⁸³, donde una reducción a 1/5 del volumen inicial de los caldos de fermentación permitiría la suficiente concentración de ácido en el medio líquido, logrando su precipitación, sin embargo, teniendo en cuenta que en los caldos de fermentación además de obtenerse el aminoácido, también se presentan glucosa residual y algunos otros productos, la evaporación del caldo de fermentación permitió concentrar cada uno de los compuestos existentes en los caldos, obteniéndose una solución espesa que después de ser llevada a refrigeración ocasionó la precipitación de diferentes productos, dificultando la extracción y purificación del ácido glutámico, la cual se logró después de realizar varios lavados y cristalizaciones del producto utilizando filtraciones al vacío.

5.5.1 Proceso de extracción del ácido glutámico utilizando el método reportado por Kinoshita⁸⁴. Este fue llevado a manera de ensayo en los caldos de fermentación de los tratamientos T1, T2, T3 y T4, presentándose los resultados indicados en la Tabla 11.

Tabla 11. Recuperación de ácido glutámico de los caldos de fermentación a partir de un litro de fermento.

| | T1 g/l | T2 g/l | T3 g/l | T4 g/l |
|----------------|--------|--------|--------|--------|
| Testigo | 1.22 | 0.81 | 0.45 | 0.44 |
| | | | | |
| Fermentación 1 | 1.10 | 0.35 | 0.95 | 0.34 |
| Fermentación 2 | 0.92 | 0.00 | 0.70 | 0.52 |
| Fermentación 3 | 0.73 | 0.50 | 1.03 | 0.00 |
| Media | 0.92 | 0.28 | 0.89 | 0.29 |

De acuerdo con los resultados obtenidos en la recuperación de ácido glutámico (Tabla11), se concluye que el método de extracción no fue eficiente por sus bajos rendimientos, en donde el gran número de repeticiones tanto en los lavados como en las filtraciones llevó a obtener una mínima cantidad del aminoácido, por tal motivo este proceso no fue utilizado en el tratamiento T5.

5.5.2 Proceso de extracción por resinas de intercambio iónico reportado por Oi-Wah⁸⁵. Este proceso se llevó a cabo con el tratamiento T5, donde las resinas permitieron la separación del ácido glutámico de los diferentes compuestos

⁸³ KINOSHITA. 1961. Op. cit. p. 4.

⁸⁴ Ibid., p. 4.

⁸⁵ OI-WAH. Op. cit. p. 47.

existentes en los caldos de fermentación, haciendo más fácil la concentración de ácido glutámico y su posterior precipitación en frío. Esto condujo a obtener los resultados indicados en la Tabla 12.

Tabla 12. Recuperación de ácido glutámico por resinas de intercambio iónico en T5.

| | g/l |
|----------------|------|
| Testigo | 9.00 |
| Fermentación 1 | 9.24 |
| Fermentación 2 | 8.75 |
| Fermentación 3 | 9.03 |
| Media | 9.01 |

El método de extracción de ácido glutámico con resinas de intercambio iónico permitió obtener mayor cantidad del aminoácido (Tabla 12), presentando un rendimiento promedio del proceso igual al 69.2%, valor obtenido al dividir la media de ácido glutámico extraído (9.01) utilizando resinas de intercambio iónico, entre la media de ácido glutámico cuantificado en los caldos del tratamiento T5 (13.0), multiplicado por 100. El porcentaje obtenido es considerablemente alto al obtenido en los tratamientos T1, T2, T3 y T4. Por tanto para un proceso productivo el uso de resinas de intercambio iónico en la separación de aminoácidos permite obtener mejores rendimientos.

Los cristales finalmente obtenidos fueron reconocidos como de ácido glutámico, debido a los RF presentados en las corridas cromatográficas en capa fina, con un valor de 0.34, igual al reportado bibliográficamente⁸⁶ además con el fin de determinar sus propiedades organolépticas el ácido glutámico fue disuelto en agua con suficiente cantidad de hidróxido sódico (0.272g de NaOH por cada gramo de ácido glutámico puro) convirtiéndose en glutamato monosódico, según la Ecuación 3, el cual fue de sabor agradable similar al reactivo puro.



Ecuación 3.

⁸⁶ ALEMANY. Op. cit. p. 212.

5.6 RENDIMIENTO TOTAL DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO GLUTÁMICO

Utilizando las mejores condiciones obtenidas durante el desarrollo del presente trabajo, se puede realizar un balance general de la producción de ácido glutámico a partir de la papa utilizada, basándonos en los rendimientos obtenidos en cada proceso; donde, a partir de 15kg de papa se lograron obtener 2.1kg de almidón con un 14% de rendimiento, este almidón se hidrolizó obteniéndose 1.66 kg de glucosa con un rendimiento del 79%, la cual utilizando el tratamiento de fermentación T5, con un rendimiento de conversión del 45.5%, se puede obtener la producción de 755.3g de ácido glutámico en los caldos de fermentación, la cantidad de aminoácido final obtenida después de su extracción con resinas de intercambio iónico, con un rendimiento del proceso del 69.2%, sería de 522.6g, el cual en el mercado presenta un precio promedio de \$400 el gramo⁸⁷. Según lo anterior utilizando los procesos reportados en el presente trabajo con los rendimientos obtenidos, la obtención de ácido glutámico a partir de residuos de papa es económicamente factible, aunque para poder obtener una verdadera rentabilidad es necesario realizar un estimativo económico total del proceso a un nivel industrial, en donde deben incluirse los costos de reactivos, bacterias, personal y equipos.

⁸⁷ VITAMIN. Op. cit.

6. CONCLUSIONES

Se logró la producción, purificación y cuantificación de ácido glutámico a partir de hidrolizados de almidón de papa (Variedad *Diacol capiro*) por procesos de fermentación utilizando la bacteria *Corynebacterium glutamicum* (ATCC 13032), donde los residuos de papa se presentaron como una excelente fuente de carbohidratos fermentables, los cuales permitieron la producción del aminoácido.

A pesar de la obtención de ácido glutámico, en todos los tratamientos utilizados en este trabajo, no se alcanzó un rendimiento significativo para los tratamientos T1, T2, T3 y T4 ya que según los métodos estadísticos, no se lograron obtener los rendimientos reportados, con los métodos y materiales trabajados.

Se logró satisfactoriamente la producción de ácido glutámico en el tratamiento 5 con rendimiento significativo del 45.5%, cercano al reportado en bibliografía que es del 48%, de acuerdo a este resultado el tratamiento T5 puede ser utilizado como referencia en futuras investigaciones del tema.

Se determinaron las condiciones óptimas en laboratorio para el desarrollo del proceso de hidrólisis ácida de almidones de papa, usando una concentración baja de ácido sulfúrico al 1%, que hace posible su manejo a gran escala, un tiempo adecuado de hidrólisis de 8 a 10 horas, usando una concentración del 20% en relación peso volumen del almidón hidrolizar. Con las condiciones anteriormente descritas se obtuvo excelentes resultados, con un rendimiento en la conversión de almidón a carbohidratos fermentables del 91.3%, y del 79% en la conversión de los mismos a D-glucosa.

Se adecuaron reactores a nivel de laboratorio donde se lograron controlar las condiciones óptimas de agitación, temperatura, pH y aireación, para la producción de ácido glutámico en el tratamiento T5.

La extracción directa del ácido glutámico utilizando el método reportado por Kinoshita no fue eficiente debido a la presencia de subproductos, que modificaban el medio y dificultaban la extracción de ácido glutámico.

El método de resina de intercambio iónico, permitió la separación de ácido glutámico de los demás residuos presentes en los caldos de fermentación logrando una adecuada recuperación del aminoácido con un rendimiento del 69.2%

7. RECOMENDACIONES

Realizar un estudio más minucioso y detallado del contenido de almidones en los residuos de cosechas de papa, yuca, y maíz en el departamento de Nariño, teniendo en cuenta factores climáticos, variedades entre otros, con el fin de observar la factibilidad económica en el montaje a nivel industrial de una planta de hidrólisis de almidones.

Mejorar la técnica de producción de ácido glutámico en fermentaciones de hidrolizados de almidón de papa, con el fin de lograr los rendimientos industriales que permitan que el proceso sea rentable y una alternativa económica para quienes estén interesados en invertir en el desarrollo de esta tecnología.

Actualmente en la universidad de Nariño no se cuenta con un cepario que sirva de albergue a posibles fuentes biológicas de productos de interés industrial. Por tanto se hace necesario su creación conjuntamente con el apoyo a los grupos de investigación, los cuales realizan un gran esfuerzo en traer, adaptar y desarrollar tecnologías de países industrializados.

Desarrollar los convenios con otras universidades como la Universidad Nacional o la Universidad de Antioquia y los grupos de investigación de biotecnología lo cual facilitaría el avance y mejor desarrollo en este tipo de estudio, haciendo posibles la transferencia de conocimientos y por ende el aumento de investigaciones de este tipo.

Vincular a la Universidad de Nariño a entidades encargadas de preservar el recurso biológico mundial como lo hace la American Types Culture Collection facilitando la negociación directa en la comercialización de microorganismos para la investigación. Se anexa formulario de inscripción del mismo (Anexo J).

BIBLIOGRAFÍA

_____. La papa. Universidad austral de Chile. Escuela de agronomía. 2005. p.1-25

AARHUS, Park.. Memorandum Técnico en la producción de almidón de papa. Dinamarca: International Starch Institute Science, 1996. p.1-13.

AJINOMOTO, Glutamato monosódico [en línea], Perú: s.n. [citado, feb. 2005] p 8.1-6. Disponible en Internet: <<http://www.ajinomoto.com.pe/GMS.html>>.

ALEMANY, Lamana y FONT, Sebarroja. Practicas de bioquímica. Epaña: Alambra 1983. p. 32-212.

AMERICAN Type Culture Collection. *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 [en línea]. Manassas, VA 20108 USA: ATCC. [citado en junio 2004]. Disponible en Internet:<<http://www.atcc.org/SearchCatalogs/directdetail.cfm?collection=ba&atccNum=13032>>.

AMERICAN Type Culture Collection. Instructions for rehydrating Freeze-Dried Cultures. Manassas, VA 20108 USA: ATCC. 2005. p 1-2.

BAYER, Glucostix de Bayer No 2 [en línea]. Chile: © Bayer S.A. [citado marzo 2005]. Disponible en Internet: <http://www.ascensia.cl/productos_servicios/glucoStix/glucoStix.asp>.

BELLO, Luis, et al. Isolation and partial characterization of banana starches. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1999. Vol. 47. p. 854-857.

BERGEY'S., Manual de determinación bacteriológica, 7 ed. p. 1274.

DELAUNAY, S., et al. An improved temperature-triggered process for glutamate production with *Corynebacterium Glutamicum*. En: Journal Enzyme and Microbial Technology. 1999. Vol. 25. p. 762-768.

DOUGLAS, Eveligh. Elaboración Microbiológica de Productos Químicos Industriales. p. 1-11.

EGGELING, L. and SHAM, H. L-Glutamato y L-Lisina, Productos tradicionales con impetuosos desarrollos. En: Journal Microbiology. Biotechnology. 1999. Vol. 52. p. 280-281.

RAYMOND, E. and DONALD, F. Enciclopedia de Tecnología Química, Hidrólisis con ácidos en almidones, España: Hispano-Americana. Tomo 1, p. 753.

RAYMOND, E. and DONALD, F. Enciclopedia de Tecnología Química. Ácido glutámico. España: Hispano-Americana, Tomo 2. p. 201.

RAYMOND, E. and DONALD, F. Enciclopedia de Tecnología Química. Proteínas e hidrolizados, España: Hispano-Americana. Tomo 13. p. 247.

FOWLER, J. and ROBERTSON, C. Metabolic Behaviour of Immobilized Aggregates of *Escherichia coli* of varying mechanical stress. En: Environ. Microbiology. 1991. No. 57. p. 93-101.

GONZÁLEZ, A. Consolidado agropecuario (Julio – Diciembre) 2003. Nariño: Ministerio de agricultura y desarrollo rural; Gobernación de Nariño; Secretaria de agricultura y medio ambiente, 2003. Cap. 3. p. 19-20.

HIBINO, Wataru; YOSHIHARA, Yuhiko and SUGIMOTO, Masakazu. Method for producing L-glutamic acid by fermentation. USA: Patented number 6.852.516 Feb 8 2005.

HONMA, M.; KEDA, T. and KAGAKU, I, no Ryouiki. 1982. Vol. 36. p. 697 – 701.

HYAVARINER, A. and NIKKITA, E. Specific determination of blood glucose with o-toluidine. En: Clinical Chemistry, 1966. Vol 7. p.140-143.

ILLING, Suzi y HARRISON, Susan. The Kinetics and mechanism of *Corynebacterium glutamicum* aggregate breakup in bioreactors. En: Chemical Engineering Science, 1999. Vol. 54. p. 441-454.

INTERNATIONAL GLUTAMATE ORGANIZATION, Glutamate. [en línea], s.l: s.f. [citado, feb. 2005]. p.1-8. Disponible en Internet: <<http://www.glutamate.org>>.

KARLHEINZ, D. et. al. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Amino acids. By Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. DOI: 10.1002/14356007.a02_057. Marzo. 2001. p. 2.

KHAN, Noor; MISHRA, Indra, et al. Modeling the growth of *Corynebacterium glutamicum* under product inhibition in L-glutamic acid fermentation. En: Journal Biochemical Engineering. 2005. Vol. 25. p. 173-178.

KINOSHITA, Shukuo; TANAKA, Katsunobu and AKITA, Sadao. Microbiological production of amino acid by reductive amination. USA: Patented Number 3.220.929 Nov. 30, 1965.

KINOSHITA, Shukuo; UDAKA, Shiego and AKITA, Sadao. Method of producing L-glutamic acid by fermentation. USA: Patented Number 3.003.925 Oct. 10, 1961.

KUNTZE, R. Domtar Ltd., USA.. Patent No 3 451 832, 1965.

KUNUKI, Kino and TETSUYA, Abe. Method for producing L-amino acids by fermentation, USA: Patented 6.706517 Mar 16 2004.

LADEN, K.; SPITZER R. and COSMET, J. Chem. Vol. 19. 1967. p. 351 – 360.

LUQUE, Ernesto. Bioquímica Descriptiva. Colombia: Udenar, 1995. p. 39-60.

MARÍN, A. y FLORES, A. Extracción de almidones totales en siete variedades experimentales de papa para la producción de etanol por fermentación. Universidad Distrital Francisco José de Caldas, 2005.

MATEOS, Pedro. Microorganismos de interés industrial. Mexico: UNAM, 2003. p. 124-150.

MORENO, Dilmer. Calidad de la papa para usos industriales. Santa Fe de Bogota CORPOICA, 2001. p. 1-10.

NELSON, J. Rapid determination of Starch: An index to maturity in starchy vegetables. En: Journal of industrial and Engineering Chemistry. 1963. Vol. 15. No. 3.

NEREIDA, Armando y MONTIEL, Edie. Utilización de la metodología de superficie de respuesta de la optimización de un medio de cultivo para la producción de l-lisina por *Corynebacterium glutamicum*. *Instituto de Biología Experimental; Instituto de Zoología Tropical; Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. En: Agronomía Tropical 2000. Vol. 50. No 2. p. 167-188.

OI-WAH, Lau and CHUEN-SHING, Mok. Indirect conductometric detection of amino acids after liquid chromatographic separation Part II. determination of monosodium glutamate in foods. En: Analytica Chimica. 1995. Acta 302. p. 45-52.

TAKEHARA, M.; YOSHIDA, R. and YOSHIKAWA, M. Cosmet. Toiletries. 1979. Vol. 94. p. 31 – 39.

TÉLLES, A.; ALVAREZ G. y ROA A. Diseño y puesta en marcha de un sistema semicontínuo en dos etapas: hidrólisis – fermentación para la producción de etanol a partir de almidón de papa usando simultáneamente *Aspergillus niger* y *Saccharomices cerevisiae*. Revista Colombiana de Química. 1997. Vol. 26. No 2 p1-11.

TETSUYA, K. et. al. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Glutamic acid. By Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. DOI: 10.1002/14356007.a16_711. Junio. 2000. p. 4.

TSUCHIDA, Takayasu and HARUO, Uchibori. Process of producing L-aminoacid by fermentation. USA: Patented Number 5.705.370 Ene. 6 1998

VITAMIN House's. venta de vitaminas y aminoácidos. [en línea]. "Lugar de publicacion desconocido": s.n.[citado en Julio 2004]. P.1. Disponible en Internet. <www.vitaminhouses.com/tienda/catalog/popup_image.php/pID/370>.

WAKASA, R. *et al.* Asahi Chemical Industry. 1963. JP 68–23 (360).

WASE, D. and PATEL, Y. Variations in the volumes of microbial cells with changes in the agitation rate of chemostat cultures. En: Journal of General Microbiology. 1985. No. 131. p. 725-728.

WIKIPEDIA, la enciclopedia libre. Almidón [en línea]: sn. [citado en enero 2005]. Disponible en Internet: <<http://es.wikipedia.org/wiki/Almid%C3%B3n>>

WOOLFE. Comparación del contenido de macronutrientes de la papa (cruda y referido a peso seco) con otros alimentos vegetales. 1987.

ZELLO Ga, et al. Recent advances in methods of assessing dietary amino acid requirements for adult humans. Journal Nutrition 1995. Vol. 12. No 5. p. 290.

ZHANG, Chengyan, et al. On-line prediction of products concentrations in glutamate fermentation usig metabolic network model and linear programming. En: Journal Biochemical Engineering. 2005. Vol. 25. p. 99-108.

ANEXOS

Anexo A. Replicas en la determinación de humedad y peso seco de papa.

| Municipio | Túquerres | | Aldana | | Pupiales | |
|-------------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|
| Peso Muestra 200g | % Humedad | % Peso seco | % Humedad | % Peso seco | % Humedad | % Peso seco |
| Análisis 1 | 78.50 | 21.5 | 75.42 | 24.58 | 82.13 | 17.87 |
| Análisis 2 | 79.11 | 20.89 | 82.15 | 17.85 | 82.24 | 17.76 |
| Análisis 3 | 81.22 | 18.78 | 82.49 | 17.51 | 79.53 | 20.47 |
| Promedio | 79.61 | 20.39 | 80.02 | 19.98 | 81.30 | 19.70 |

Anexo B. Replicas en la determinación de tiempo de licuado según la cantidad de almidón obtenido con una muestra de 200g.

| Análisis | Tiempos de licuado | | | | |
|----------|--------------------|--------|--------|--------|--------|
| | 1min | 3min | 5min | 7min | 10min |
| 1 | 17.30g | 15.20g | 27.10g | 24.00g | 17.80g |
| 2 | 18.10g | 13.30g | 28.72g | 22.90g | 19.10g |
| 3 | 19.92g | 13.80g | 29.50g | 23.60g | 18.90g |
| Promedio | 18.44g | 14.10g | 28.44g | 23.50g | 18.60g |

Anexo C: Tabla de datos de hidrólisis a diferentes tiempos y concentraciones de ácido.

| [H ₂ SO ₄] | Tiempo hidrólisis (h) | Replicas | Absorbancia | Promedio |
|-----------------------------------|-----------------------|----------|-------------|----------|
| 1% | 4 | 1 | 0,987 | 1,065 |
| | | 2 | 1,354 | |
| | | 3 | 0,854 | |
| | 8 | 1 | 1,025 | 1,243 |
| | | 2 | 1,402 | |
| | | 3 | 1,302 | |
| | 12 | 1 | 2,221 | 2,167 |
| | | 2 | 1,984 | |
| | | 3 | 2,296 | |
| | 16 | 1 | 2,441 | 2,671 |
| | | 2 | 2,88 | |
| | | 3 | 2,692 | |
| 20 | 1 | 1,642 | 1,414 | |
| | 2 | 1,121 | | |
| | 3 | 1,479 | | |

| [H ₂ SO ₄] | Tiempo hidrólisis (h) | Replicas | Absorbancia | Promedio |
|-----------------------------------|-----------------------|----------|-------------|----------|
| 2% | 4 | 1 | 1,027 | 0,971 |
| | | 2 | 0,845 | |
| | | 3 | 1,041 | |
| | 8 | 1 | 1,111 | 1,05 |
| | | 2 | 0,947 | |
| | | 3 | 1,092 | |
| | 12 | 1 | 2,089 | 2,235 |
| | | 2 | 2,447 | |
| | | 3 | 2,169 | |
| | 16 | 1 | 1,648 | 1,838 |
| | | 2 | 1,901 | |
| | | 3 | 1,965 | |
| 20 | 1 | 0,748 | 0,964 | |
| | 2 | 0,879 | | |
| | 3 | 1,265 | | |
| 3% | 4 | 1 | 0,902 | 0,858 |
| | | 2 | 0,888 | |
| | | 3 | 0,784 | |
| | 8 | 1 | 0,748 | 0,802 |
| | | 2 | 0,875 | |
| | | 3 | 0,783 | |
| | 12 | 1 | 1,985 | 2,139 |
| | | 2 | 2,126 | |
| | | 3 | 2,306 | |
| | 16 | 1 | 1,645 | 1,798 |
| | | 2 | 1,874 | |
| | | 3 | 1,875 | |
| 20 | 1 | 0,847 | 0,953 | |
| | 2 | 1,245 | | |
| | 3 | 0,767 | | |
| 4% | 4 | 1 | 0,399 | 0,534 |
| | | 2 | 0,541 | |
| | | 3 | 0,662 | |
| | 8 | 1 | 0,41 | 0,519 |
| | | 2 | 0,555 | |
| | | 3 | 0,592 | |
| | 12 | 1 | 1,289 | 1,337 |
| | | 2 | 1,3 | |
| | | 3 | 1,422 | |
| | 16 | 1 | 0,887 | 0,925 |
| | | 2 | 1,221 | |
| | | 3 | 0,667 | |

| | | | | |
|-----------------------------------|-----------------------|----------|-------------|----------|
| | | 1 | 0,773 | 0,775 |
| | 20 | 2 | 1,004 | |
| | | 3 | 0,548 | |
| [H ₂ SO ₄] | Tiempo hidrólisis (h) | Replicas | Absorbancia | Promedio |
| 5% | 4 | 1 | 0,183 | 0,201 |
| | | 2 | 0,147 | |
| | | 3 | 0,273 | |
| | 8 | 1 | 0,715 | 0,663 |
| | | 2 | 0,542 | |
| | | 3 | 0,732 | |
| | 12 | 1 | 1,004 | 1,047 |
| | | 2 | 0,952 | |
| | | 3 | 1,185 | |
| | 16 | 1 | 0,741 | 0,805 |
| | | 2 | 0,699 | |
| | | 3 | 0,975 | |
| | 20 | 1 | 0,411 | 0,545 |
| | | 2 | 0,427 | |
| | | 3 | 0,797 | |

ANOVA Factorial - Absorbancia Promedio según STATGRAPHICS Plus 5.1

Resumen del Procedimiento

Variable dependiente: Absorbancia Promedio

Factores:

Acido

Horas

Replica

Número de casos completos: 75

Este procedimiento realiza un análisis multifactorial de la varianza para Absorbancia Promedio. Realiza varios tests y gráficos para determinar qué factores tienen un efecto estadísticamente significativo en Absorbancia Promedio. Teniendo datos suficientes, también analiza las interacciones significativas entre los factores. Los F-tests en la tabla ANOVA le permitirán identificar los factores significantes. Para cada factor significativo.

Continuación Anexo C.

Análisis de la Varianza para Absorbancia Promedio - Sumas de Cuadrados de Tipo III

| Fuente | Suma de cuadrados | GL | Cuadrado Medio | Cociente-F | P-Valor |
|----------------------|-------------------|----|----------------|------------|---------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A:Acido | 11,4476 | 4 | 2,86191 | 61,82 | 0,0000 |
| B:Horas | 13,8413 | 4 | 3,46033 | 74,74 | 0,0000 |
| C:Replica | 0,0 | 2 | 0,0 | 0,00 | 1,0000 |
| RESIDUOS | 2,96297 | 64 | 0,0462964 | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | | | | | |
| | 28,252 | 74 | | | |

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de Glucosa Promedio en las contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha elegido la suma de cuadrados Tipo III (valor por defecto), se ha medido la contribución de cada factor eliminando los efectos del resto de los factores. Los P-valores comprueban la importancia estadística de cada uno de los factores. Dado que 2 p-valores son inferiores a 0,05, estos factores tienen efecto estadísticamente significativo en Absorbancia Promedio para un 95,0%.

Anexo D. Determinación cuantitativa de glucosa con el método de glucosa oxidasa GLUCOSTIX® BAYER

Se prepara una serie de patrones de glucosa pura de 4, 8, 12, 16, 20mM respectivamente. Se toman 5 cintas Glucostix® y se depositan 50µL de cada solución patrón en la parte reactiva de las cintas de Glucostix® Las cuales después de un periodo de 30s se secan con papel filtro, y se dejan secar 20s a temperatura ambiente, terminado el tiempo las tiras son introducidas en el equipo Glucometer II® previamente calibrado según la altitud sobre el nivel del mar y el parámetro de las cintas, se leen las lecturas correspondientes.

Tras establecer la recta patrón, las lecturas obtenidas en las muestras problema a un pH de 7.0, se intrapolan, obteniéndose los valores correspondientes a la concentración de glucosa.

Anexo E. Reproducibilidad en la glucosa consumida en los tratamientos.

| | T 1 (g) | T 2 (g) | T 3 (g) | T 4 (g) | T 5 (g) |
|----------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Testigo | 72.0 | 56.6 | 89.1 | 30.7 | 28.6 |
| Fermentación 1 | 74.5 | 57.8 | 90.5 | 30.4 | 27.4 |
| Fermentación 2 | 70.7 | 53.2 | 88.1 | 31.0 | 28.4 |
| Fermentación 3 | 72.3 | 58.9 | 86.0 | 28.5 | 29.9 |
| Promedio | 72.5 | 56.6 | 88.2 | 30.0 | 28.6 |

Repetibilidad en la cuantificación de ácido glutámico producido en los fermentos.

| | T 1 (g) | T 2 (g) | T 3 (g) | T 4 (g) | T 5 (g) |
|----------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Testigo | 19.5 | 17.8 | 25.6 | 12.3 | 13.2 |
| Fermentación 1 | 18.1 | 16.3 | 23.3 | 11.6 | 12.9 |
| Fermentación 2 | 18.0 | 16.6 | 23.0 | 12.6 | 12.5 |
| Fermentación 3 | 19.3 | 17.7 | 24.2 | 11.9 | 13.6 |
| Promedio | 18.5 | 16.9 | 23.5 | 12.0 | 13.0 |

Anexo F. Contraste múltiple de rango entre las medias de cada tratamiento (TRT) usado en la producción de ácido glutámico, según STATGRAPHICS Plus 5.1.

Método: 95.0 porcentaje LSD

| | Frec. | Media | Grupos homogéneos |
|-------|-------|---------|-------------------|
| TRT 1 | 3 | 25.5 | X |
| TRT 3 | 3 | 26.6667 | X |
| TRT 2 | 3 | 29.8667 | X |
| TRT 4 | 3 | 40.3333 | X |
| TRT 5 | 3 | 45.5333 | X |

| Contraste | Diferencias | +/- Límites |
|---------------|-------------|-------------|
| TRT 1 - TRT 2 | *-4.36667 | 2.64557 |
| TRT 1 - TRT 3 | -1.16667 | 2.64557 |
| TRT 1 - TRT 4 | *-14.83333 | 2.64557 |
| TRT 1 - TRT 5 | *-20.03333 | 2.64557 |
| TRT 2 - TRT 3 | * 3.2 | 2.64557 |
| TRT 2 - TRT 4 | *-10.46667 | 2.64557 |
| TRT 2 - TRT 5 | *-15.66667 | 2.64557 |
| TRT 3 - TRT 4 | *-13.66667 | 2.64557 |
| TRT 3 - TRT 5 | *-18.86667 | 2.64557 |
| TRT 4 - TRT 5 | *-5.2 | 2.64557 |

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras. La mitad inferior de la salida muestra la diferencia estimada entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 9 pares, indica que éstos muestran diferencias estadísticamente significativas a un nivel de confianza 95.0%. En la parte superior de la página, se identifican 4 grupos homogéneos según la alineación del signo X en la columna. Dentro de cada columna, los niveles que tienen signo X forman un grupo de medias entre las cuales no hay diferencias estadísticamente significativas. El método actualmente utilizado para discernir entre las medias es el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD). Con este método, hay un 5.0% de riesgo de considerar cada par de medias como significativamente diferentes cuando la diferencia real es igual a 0.

Tabla ANOVA para la relación entre los tratamientos (TRT) reportados
Análisis de la Varianza

| Fuente | Sumas de cuad. | Gl | Cuadrado Medio | Cociente-F | P-Valor |
|---------------|-------------------|----|-------------------|------------|---------|
| Entre grupos | 946.077 | 4 | 236.519 | 111.85 | 0.0000 |
| Intra grupos | 21.1467 | 10 | 2.11467 | | |
| Total (Corr.) | 967.224 | 14 | | | |

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio, que en este caso es igual a 111.847, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0.05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los 5 tratamientos a un nivel de confianza del 95.0%.

Anexo G. Comparación del ácido glutámico producido en las fermentaciones con el producido en los testigos en relación al uso de hidrolizados o de glucosa.

Para decidir si la diferencia es significativa, entre la media muestral (\bar{x}) del porcentaje de ácido glutámico producido con los hidrolizados en los tratamientos T1, T2, T3, T4, y T5 y el porcentaje producido en los testigos (μ = valor verdadero) con glucosa, se usó la prueba de significación de comparación de una media experimental con un valor conocido. (Millar, J. C. Estadística para química Analítica. 2ed. USA: Addison-Wesley. 1993. p. 40).

$$\mu = \bar{x} \pm (ts/\sqrt{n})$$

En donde n es el tamaño muestral, s es la desviación estándar, y t es el valor también puede escribirse así:

$$t = (\bar{x} - \mu)\sqrt{n/s}$$

Relación del uso de hidrolizados con respecto a glucosa pura (valor crítico 4.3 (P=0.05))

| Tratamiento | (\bar{x}) | (μ) | n | t |
|-------------|---------------|-----------|-----|------|
| 1 | 25.5 | 21.7 | 3 | 2,31 |
| 2 | 29.9 | 31.4 | 3 | 1,81 |
| 3 | 26.7 | 28.8 | 3 | 2,95 |
| 4 | 40.3 | 40.2 | 3 | 0,13 |
| 5 | 45.5 | 46.0 | 3 | 0,55 |

Según la tabla anterior no existe diferencia significativa en el uso de los hidrolizados de almidón y el uso de glucosa en la producción de ácido glutámico ya que ningún valor de t excede el valor crítico 4.3 (P=0.05).

Anexo H: Análisis de covarianza entre los datos de cada tratamiento (TRT) usado en la producción de ácido glutámico.

El %CV no excede el 5% por tanto los datos son homogéneos.

| TRT | Fermentación | Ácido Glutámico | Promedio | Desviación | % CV |
|-----|--------------|-----------------|----------|------------|------|
| 1 | F1 | 24.3 | 25.5 | 1.20 | 4.71 |
| | F2 | 25.5 | | | |
| | F3 | 26.7 | | | |
| 2 | F1 | 28.3 | 29.9 | 1.46 | 4.90 |
| | F2 | 31.2 | | | |
| | F3 | 30.1 | | | |
| 3 | F1 | 25.8 | 26.7 | 1.25 | 4.69 |
| | F2 | 26.1 | | | |
| | F3 | 28.1 | | | |
| 4 | F1 | 38.3 | 40.3 | 1.82 | 4.51 |
| | F2 | 40.9 | | | |
| | F3 | 41.8 | | | |
| 5 | F1 | 46.9 | 45.5 | 1.46 | 3.20 |
| | F2 | 44.0 | | | |
| | F3 | 45.7 | | | |

El tratamiento del anexo G, se aplicó para comparar las medias obtenidas en las fermentaciones (\bar{x}) con las reportadas en las respectivas bibliografías (μ).

Relación del porcentaje de glucosa obtenido con respecto al valor reportado en bibliografía (valor crítico 4.3 (P=0.05))

| Tratamiento | (\bar{x}) | (μ) | n | t |
|-------------|---------------|-----------|-----|-------|
| T1 | 25.5 | 32 | 3 | 9,37 |
| T2 | 29.9 | 40,1 | 3 | 12,09 |
| T3 | 26.7 | 34,9 | 3 | 11,39 |
| T4 | 40.3 | 48 | 3 | 7,30 |
| T5 | 45.5 | 48 | 3 | 2,93 |

Según la tabla anterior existe diferencia significativa en la producción de ácido glutámico para los tratamientos T1, T2, T3 y T4 con respecto al reportado en bibliografías ya que los valores de t para estos excede el valor crítico 4.3 (P=0.05). El valor para T5 esta por debajo del valor crítico.

Anexo I. Especificaciones técnicas del antiespumante usado en el tratamiento T5.

Anexo J. Formato de suscripción para Universidades a la American Types Culture Collection (ATCC).