

OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ÁCIDO GLUTÁMICO A PARTIR DE
HIDROLIZADOS DE PULPA DE CAFÉ Y JUGO DE FIQUE FERMENTABLES
POR LA BACTERIA *corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

YANET GÓMEZ BOLAÑOS
VERÓNICA LAGOS GUERRERO

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA
PASTO
2013

OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ÁCIDO GLUTÁMICO A PARTIR DE
HIDROLIZADOS DE PULPA DE CAFÉ Y JUGO DE FIQUE FERMENTABLES
POR LA BACTERIA *corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

YANET GÓMEZ BOLAÑOS
VERÓNICA LAGOS GUERRERO

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de químico

Director

JESÚS ADRIANO ROMO RAMOS
M. Sc Ciencias Química

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA
PASTO
2013

NOTA DE RESPONSABILIDAD

“Las ideas y conclusiones aportadas al trabajo de grado, son responsabilidad exclusiva de los autores “

Artículo 1º del acuerdo No 324 de octubre 11 de 1966, emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño

Nota de aceptación

Jesús Adriano Romo Ramos
Director

Jesús Cabrera Moncayo
Jurado

Dolly Revelo
Jurado

San Juan de Pasto, junio de 2013

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos de manera especial al profesor Jesús Romo Ramos por su gran apoyo en desarrollo de este trabajo

A la doctora Nancy Galindez Santander por su colaboración constante y permitirnos trabajar en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología

Al doctor Jesús Cabrera Moncayo por su apoyo y colaboración en este trabajo

A Sandra Espinosa por su apoyo incondicional en el desarrollo de nuestro trabajo

A Milena Moreno y Luisa María Riascos por asesorarnos para desarrollar de la mejor manera la parte experimental de nuestro trabajo

A la gobernación de Nariño por apoyar económicamente esta investigación

A los compañeros del grupo de investigación de bioquímica y estudios genéticos (BIOGEN)

A los profesores del departamento de Química por compartirnos sus conocimientos

DEDICATORIA

A Dios por ser la luz que ilumina mi vida

A mis padres Humberto e Inés, por el inmenso amor que me brindan todos los días de mi vida

A mis hermanos, porque ellos son la fuerza que me impulsa a mejorar cada día de mi vida

A mi amiga Yanet por brindarme su amistad sincera y ser mi compañera incondicional

Verónica Lagos Guerrero

A Dios por darme la vida y por su apoyo espiritual.

A mi tía María concepción Gómez, por brindarme su apoyo, cariño y comprensión

A mis padres por darme su amor

A mis familiares y amigos por brindarme su apoyo de una u otra forma.

A mi compañera y amiga Verónica Lagos por su amistad incondicional

Yanet Gómez Bolaños

RESUMEN

Se obtuvo ácido glutámico empleando como sustratos hidrolizados de pulpa de café y jugo de fique a través de un proceso de fermentación discontinuo utilizando la bacteria *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. Para ello se hizo la extracción de los azúcares totales por el proceso de hidrólisis ácida, alcanzando una concentración adecuada de azúcares de 0,026g/mL para la pulpa de café y de 0,029g/mL para el jugo de fique utilizando una concentración de ácido sulfúrico del 1% y un tiempo de digestión de 6 horas para ambos sustratos.

En la etapa de fermentación, se alimentó la bacteria con los azúcares obtenidos en el proceso de hidrólisis para la producción de ácido glutámico, logrando un rendimiento de 56,01% de producto con hidrolizado de pulpa de café y de 36,88% para el hidrolizado de jugo de fique. El ácido glutámico se recuperó de los caldos de fermentación utilizando el método de precipitación; logrando obtener la mayor cantidad de producto en cada uno de los tratamientos realizados en el proceso de fermentación.

Mediante cromatografía de gases se identificó el aminoácido obtenido en esta investigación el cual presentó un tiempo de retención de 8.5 minutos igual al aminoácido patrón, el ácido glutámico.

ABSTRACT

Glutamic acid was obtained using hydrolyzed coffee pulp and figue juice as substrates through a batch fermentation process using *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. This experiment was done for the extraction of total sugar by acid hydrolysis process, reaching an optimal concentration of sugars in the coffee pulp 0,026g/mL and 0,029g/mL for figue juice using of 1% a sulfuric acid concentration and a time of 6 hours digestion for both substrates.

In the fermentation step, the bacteria are fed with the sugars obtained from the hydrolysis process for producing glutamic acid, achieving a yield of 56,01% of pulp product for coffee and juice 36,88% for sisal. Glutamic acid recovered from fermentation broths using precipitation method, obtaining as much product in all treatments.

By gas chromatography identified the amino acid obtained in this research which presented a retention time of 8.5 minutes equal to the amino acid pattern, glutamic acid.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	16
1. OBJETIVOS	17
1.1. OBJETIVO GENERAL	17
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
2. MARCO TEÓRICO	18
2.1. ACIDO GLUTÁMICO	18
2.2. LOS AMINOÁCIDOS EN LA INDUSTRIA	19
2.3. CORYNEBACTERIAS	20
2.3.1. Metabolismo de <i>Corynebacterium glutamicum</i> para la producción de ácido glutámico	22
2.3.2. Producción biotecnológica de ácido glutámico	25
2.3.3. Parámetros para la producción biotecnológica de ácido glutámico	26
2.4. SUSTRATO	27
2.4.1. Residuos de café y fique como sustratos	27
2.5. MÉTODOS DE PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE AMINOÁCIDOS	31
3. METODOLOGÍA	33
3.1. MUESTREO	33
3.1.1. Muestra de pulpa de café	33
3.1.2. Muestra de jugo de fique	34
3.1.3. Hidrólisis ácida	34
3.2. MICROORGANISMO	36
3.2.1. Activación	37
3.2.2. Almacenamiento	37
3.2.3. Conservación del microorganismo	37
3.3. PROCESO DE FERMENTACIÓN	38
3.3.1. Cinética de crecimiento bacteriano	38
3.3.2. Biorreactor	38
3.3.3. Fermentación	39
3.3.4. Monitoreo del proceso de fermentación	41
3.3.5. Recuperación y purificación del ácido glutámico	41
3.4. CROMATOGRAFÍA DE GASES	42

3.5.	TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	43
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
4.1.	CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS	44
4.1.1.	Muestra de pulpa de café	44
4.1.2.	Muestra de jugo de fique	45
4.2.	PRODUCCIÓN DE HIDROLIZADOS	46
4.2.1.	Hidrólisis ácida de pulpa de café	46
4.2.2.	Hidrólisis ácida de jugo de fique	48
4.3.	CONFIRMACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LA CEPA BACTERIANA	49
4.4.	PROCESO DE FERMENTACIÓN	50
4.4.1.	Cinética de crecimiento bacteriano	50
4.4.2.	Biorreactor	51
4.4.3.	Preparación del medio de fermentación	52
4.4.4.	Monitoreo del proceso de fermentación	52
4.5.	RECUPERACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL PRODUCTO	58
4.6.	IDENTIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE GASES	60
	CONCLUSIONES	63
	RECOMENDACIONES	64
	BIBLIOGRAFÍA	65
	ANEXOS	71

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Producción mundial de aminoácidos	20
Tabla 2. Composición química de la pulpa de café	28
Tabla 3. Composición química del jugo de fique	29
Tabla 4. Características generales de la bacteria <i>Corynebacterium glutamicum</i>	36
Tabla 5. Composición del medio de cultivo de <i>Corynebacterium glutamicum</i>	37
Tabla 6. Nutrientes utilizados en el medio de producción de ácido glutámico	39
Tabla 7. Hidrólisis ácida de pulpa de café	46
Tabla 8. Hidrólisis ácida de jugo de fique	48
Tabla 9. Tratamiento A. crecimiento celular, consumo de carbono, producción de aminoácido	53
Tabla 10. Tratamiento B. crecimiento celular, consumo de carbono, producción de aminoácido	53
Tabla 11. Tratamiento C. crecimiento celular, consumo de carbono, producción de aminoácido	54
Tabla 12. Tratamiento D. crecimiento celular, consumo de carbono, producción de aminoácido	54
Tabla 13. Rendimiento de producción de ácido glutámico en proceso de fermentación	59
Tabla 14. Comparación de varios sistemas de fermentación para la producción de ácido glutámico	60

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.	Estructura del ácido glutámico	18
Figura 2.	Vías metabólicas de la biosíntesis de ácido glutámico a partir de glucosa como fuente de carbono en <i>Corynebacterium glutamicum</i>	23
Figura 3.	Estructura del grano de café	28
Figura 4.	Hidrólisis ácida de disacáridos	30
Figura 5.	Reacción de Millard	31
Figura 6.	Ubicación de las zonas del departamento de Nariño donde se realizó el muestreo de pulpa de café y jugo de fique	34
Figura 7.	Montaje utilizado en el proceso de hidrólisis ácida	35
Figura 8.	Diagrama de flujo del proceso de hidrólisis ácida para obtener los azúcares reductores	36
Figura 9.	Biorreactor utilizado en el proceso de fermentación	38
Figura 10.	Montaje utilizado en el proceso de fermentación para la producción de ácido glutámico	41
Figura 11.	Grano de café variedad caturra recolectado en el municipio de Sandoná, corregimiento San Bernardo	44
Figura 12.	Muestra de pulpa de café obtenida del proceso de secado y molido	44
Figura 13.	Recolección de desechos de jugo de fique de desfibrilado de la hoja de fique	45
Figura 14.	Crecimiento en agar nutritivo de <i>Corynebacterium glutamicum</i>	49
Figura 15.	Tinción de Gram de <i>Corynebacterium glutamicum</i>	50
Figura 16.	Cinética de crecimiento bacteriano de <i>Corynebacterium glutamicum</i>	51
Figura 17.	Comparación de la cinética de crecimiento bacteriano, consumo de carbono y producción de aminoácido con hidrolizado de pulpa de café y glucosa	56
Figura 18.	Comparación de la cinética de crecimiento bacteriano, consumo de carbono y producción de aminoácido con hidrolizado de jugo de fique y glucosa	57
Figura 19.	Comparación de la cinética de crecimiento bacteriano, consumo de carbono y producción de aminoácido con hidrolizado de jugo de fique y de pulpa de café	57

Figura 20.	Ácido glutámico recuperado de los caldos de fermentación utilizando el método de precipitación	58
Figura 21.	Cromatograma de ácido glutámico obtenido con hidrolizado de pulpa de café	61
Figura 22.	Cromatograma de ácido glutámico obtenido con hidrolizado de jugo de fique	61
Figura 23	Cromatograma del ácido glutámico utilizado como patrón	62

LISTA DE ANEXOS

		Pág.
Anexo A	Hidrólisis ácida de pulpa de café: ensayos, absorbancia y concentración de azúcares	71
Anexo B.	Hidrólisis ácida de jugo de fique: ensayos, absorbancia y concentración de azúcares	72
Anexo C.	Análisis de varianza para hidrólisis de pulpa de café	73
Anexo D.	Análisis de varianza para hidrólisis de jugo de fique	73
Anexo E.	Análisis de varianza para la producción de ácido glutámico	73
Anexo F.	Prueba Múltiple de Rango de la producción de ácido glutámico fuente de carbono	74
Anexo G.	Prueba Múltiple de Rango de la producción de ácido glutámico por concentración de nitrógeno	74

GLOSARIO

Biorreactor: recipiente donde se realiza el cultivo, su diseño debe ser tal que asegure un ambiente uniforme y adecuado para los microorganismos.

Cromatografía de gases: técnica analítica para la separación e identificación de compuestos volátiles y semivolátiles empleando una columna (fase estacionaria) y un gas inerte (fase móvil). La cromatografía de gases acoplada a masas (GCMS): técnica analítica que se realiza en un equipo, permite la separación de compuestos orgánicos volátiles con la posibilidad de análisis posteriores por espectrometría de masas.

Espectrofotometría: método cuantitativo de análisis químico que utiliza la luz para medir la concentración de una sustancia en una solución.

Fermentación: de acuerdo al contexto industrial, es cualquier proceso microbiano a escala que se realice aerobia o anaerobiamente.

Metabolismo: conjunto de reacciones bioquímicas que se realizan en el interior de una célula.

Aminoácido: molécula orgánica con un grupo amino ($-NH_2$) y un grupo carboxilo ($-COOH$), forman parte de las proteínas.

Proteínas: Macromoléculas formadas por cientos o miles de aminoácidos, encargadas de diversas funciones en los seres vivos, como transportadores, catalizadores (enzimas), estructuras, etcétera.

Glúcidos o azúcares: grupo de sustancias constitutivas de la materia viviente, compuestas de carbono, hidrógeno y oxígeno; los glúcidos tienen por fórmula general: (CH_2O) . Los glúcidos, cuyo número de carbonos es un múltiplo de seis, se llaman polisacáridos (celulosa glucógeno). Algunos, de estructura más compleja, los mucopolisacáridos, son los constituyentes de la membrana de las bacterias

Saborizante: sustancia o conjunto de sustancias extraídos de la naturaleza o compuestos artificiales, capaces de actuar sobre los sentidos del gusto y el olfato.

Auxótrofo, Organismo mutante (bacteria) que no crece en un medio mínimo pues necesita de la presencia de algún factor de desarrollo.

Bacterias: Nombre con el cual se designa a un grupo muy amplio de organismos unicelulares, sin núcleo (procarionte) y muy pequeños.

INTRODUCCIÓN

Las propiedades estimuladoras del sabor del ácido glutámico se descubrieron en Japón en 1908, pero no fue sino hasta 1957 que se descubrió el ácido glutámico como producto en el medio de cultivo utilizado durante el crecimiento de *Corynebacterium glutamicum*, convirtiéndose este microorganismo en la fuente principal de glutamato sódico e inmediatamente después comenzó la producción comercial de glutamato sódico a partir de hidrolizados ácidos de trigo y proteína de soja, por tanto, este descubrimiento fue un enorme impulso para la industria de fermentación en Japón, de tal manera que los procesos fermentativos para la producción de aminoácidos han sido casi exclusivamente desarrollos japoneses (Soto, 2000).

El ácido glutámico o glutamato es comercialmente uno de los aminoácidos más importantes producido por procesos de fermentación y es utilizado ampliamente en la industria de alimentos, farmacia y limpieza, presentando gran demanda por parte de las mismas (Douglas, 1993).

Un camino seguido por muchos investigadores para el mejoramiento del proceso de producción de aminoácidos, ha sido enfocado a la consecución de fuentes de materias primas baratas, la modificación de las condiciones esenciales de fermentación y principalmente el uso de microorganismos para este propósito (Matheos, 2003).

Atendiendo a los anteriores planteamientos, en este proyecto de investigación se desarrolló a escala de laboratorio un sistema de fermentación discontinuo para la producción de ácido glutámico, a partir de hidrolizados de pulpa de café y jugo de fique, donde las condiciones experimentales permitieron obtener un alto rendimiento del producto deseado, utilizando el microorganismo *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032.

1. OBJETIVOS

1.1. OBJETIVO GENERAL

Obtener y cuantificar ácido glutámico a partir de hidrolizados de pulpa de café y jugo de fique empleando la bacteria *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

1.2. Objetivos específicos

- Determinar las mejores condiciones de fermentación para la obtención de ácido glutámico mediante la acción fermentativa de la bacteria *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, utilizando hidrolizados de pulpa de café y jugo de fique
- Purificar el producto obtenido para garantizar una mejor calidad.
- Identificar el ácido glutámico obtenido utilizando técnicas espectrofotométricas y cromatográficas.
- Cuantificar la producción del ácido glutámico obtenido y determinar el rendimiento del proceso en los dos sustratos.

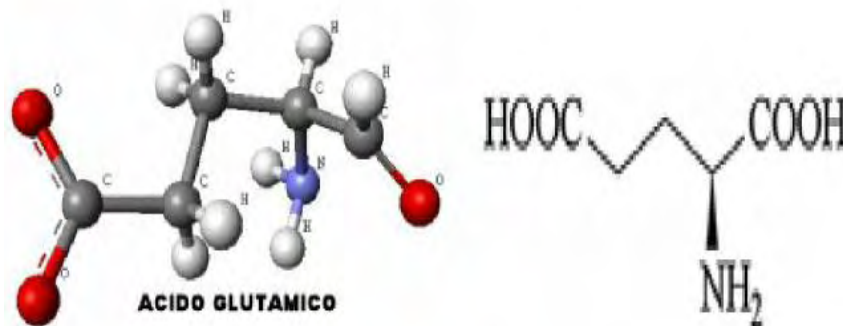
2. MARCO TEÓRICO

2.1. ÁCIDO GLUTÁMICO

El ácido glutámico presenta la siguiente estructura y propiedades. (Lenhinger, 2005)

Fórmula	: $C_5H_9O_4$
Peso Molecular	: 147.13g/mol
Solubilidad	: 0.864H+/100gH ₂ O a 25°C
Punto de Fusión	: 224-225°C
Punto Isoeléctrico	: 3.08
Constantes de Disociación	: $pK_1 2.1, pK_2 4.07, pK_3 9.47$

Figura 1. Estructura del ácido glutámico



Fuente: Lenhinger, (2005)

El ácido glutámico, o en su forma ionizada, el glutamato (Glu, E) es uno de los 20 aminoácidos que forman parte de las proteínas. El ácido glutámico es importante para la función celular, pertenece al grupo de los llamados aminoácidos ácidos, debido a que presenta un segundo grupo carboxilo en su cadena lateral y se

encuentra cargado negativamente a pH fisiológico; por lo que ocupa los sitios activos de las enzimas participando como donadores de protones en la catálisis enzimática (Roskoski, 2008).

El ácido glutámico es el mayor potenciador del sabor de los alimentos; los efectos de potenciador del sabor solo se consiguen con la forma L de este compuesto, siendo la forma D de sabor ácido muy desagradable (Kurihara, 2009). La forma más común de presentación de este compuesto para fines alimentarios es precipitado como la sal glutamato monosódico usada como aditivo bajo la denominación E-621, el consumo mundial de este compuesto se estima en unos 550 mg por habitante al día. Los japoneses están muy familiarizados con el sabor del glutamato monosódico, puesto que el consumo de sopas del quepelo es muy común en su gastronomía (Bellisle, 2009)

2.2. LOS AMINOÁCIDOS EN LA INDUSTRIA

Los aminoácidos tienen amplias aplicaciones industriales; aproximadamente el 66% de los aminoácidos producidos se utilizan en la industria de alimentos, el 31% como aditivos de piensos, el 4% en medicina y cosmética, y como material de partida en la industria química. En la industria de alimentos los aminoácidos se utilizan solos o en combinación para aumentar el sabor. El efecto saborizante del glutamato sódico y la D, L alanina se añaden a los jugos de frutas para mejorar el sabor y la glicina se añade a los alimentos que contienen edulcorantes. Los aminoácidos importantes con aplicaciones distintas a la alimentación incluyen la L-arginina, L-glutamina, L-leucina, L-fenilalanina, L-tiroxina y L-valina (Crueger y Crueger, 1993).

Los aminoácidos se producen mediante un amplio rango de tecnologías que incluyen la fermentación directa, la biotransformación de precursores mediante células o enzimas, la extracción de hidrolizados de proteínas y la síntesis química (Yoshioka *et al.*, 1999)

A nivel mundial, la producción de aminoácidos por fermentación es una industria importante. La producción mundial de aminoácidos elaborados bioquímicamente en el año 1985 fue 971.000 toneladas por año, de las que 370.000 toneladas son glutamato monosódico, 100.000 de L-lisina y 150.000 de metionina. Los otros aminoácidos que más se producen son el ácido aspártico, fenilalanina y treonina, entre otros (Kinoshita y Udaka, 1997)

De acuerdo a Sun-Uk (2004), este aumento en la producción se debe básicamente a:

- el aislamiento de cultivos de producción mejorada, aislando cepas mediante el aporte de técnicas de DNA recombinante.
- La combinación de síntesis química con procesos microbianos y enzimáticos.
- La adaptación de los procesos existentes para la utilización de materias primas económicas de fácil acceso.
- La optimización de las condiciones de salto de escala

En la Tabla 1 se presentan las cantidades de aminoácidos producidos a nivel mundial y se observa que la mayor producción se realiza mediante la utilización de bacterias de la familia de las corynebacterias (Leveau y Bouix, 2000).

Tabla 1. Producción Mundial de los Principales Aminoácidos

AMINOÁCIDO	TONELAJE ANUAL	MÉTODO DE PRODUCCIÓN
Ácido L-glutámico	370000 t	Biosíntesis por Corynebacteria
L-lisina	100000 t	Biosíntesis por Corynebacteria
D L-metionina	150000 t	Síntesis química
Ácido L-aspártico	10000 t	Bioconversión por <i>Escherichia coli</i> y <i>Pseudomonas</i>
L-fenilalanina	5000 t	Biosíntesis por <i>Corynebacteria</i>
Otros	5000 t	Conversión por <i>Rhodotorula</i>
L-treonina	1000 t	Biosíntesis por <i>E. Coli</i> , <i>Brevibacterium</i>

Fuente: Leveau y Bouix (2000).

2.3. CORYNEBACTERIAS

Las corynebacterias pertenecen al orden de los Actinomycetales. Estas bacterias se incluyen dentro del grupo de bastoncillos Gram-positivos no esporulados, de forma irregular. La pared celular de estas bacterias contiene siempre ácido

Mesodiaminopimélico; algunas cepas contienen ácido *L-diaminopimélico*, y otras contienen lisina. Estudios comparativos de los polisacáridos de la pared de las bacterias corineformes, confirman que la presencia del mesodiaminopimélico y de los arabinogalactanos es específica del género *Corynebacterium* (Collins y Cummins, 2006).

Las corynebacterias presentan generalmente una pigmentación amarilla-anaranjada de tipo carotenoidico aromático. La capacidad de sintetizar este tipo de pigmento se pierde fácilmente por mutación. Además, ciertas colonias producen una coloración anaranjada viva en presencia de bases fuertes (Soto, 2000).

Las cepas de corynebacterias utilizadas industrialmente han sido generalmente aisladas del suelo. Son cepas aerobias, mesófilas, cuya temperatura óptima de crecimiento se sitúa hacia 35°C, con una temperatura máxima de crecimiento de 40 °C. Estas cepas son capaces de utilizar diferentes hidratos de carbono. Se las utiliza en la industria para la producción por fermentación de grandes cantidades de aminoácidos entre ellos, ácido glutámico y Lisina, y en menor cantidad para la producción de nucleótidos (Petra, 2008).

Las cepas industriales se encuentran esencialmente en el género *Corynebacterium*, pero también en los géneros *Brevibacterium*, *Arthrobacter* y *Microbacterium*. Las bacterias corineformes productoras de ácido glutámico, se agrupan en la especie *Corynebacterium glutamicum* (Krämer y Lambert, 1999).

El género *Corynebacterium* fue definido basándose en características morfológicas: *Corynebacterium* proviene del griego *corönë* (bastón nudoso) y *bacterion* (bastoncillo), se trata de bacterias Gram-positivas, catalasa positivas, no esporuladas, que carecen de motilidad, bacilos rectos o ligeramente curvados cuyo tamaño oscila entre 2-6 micrómetros de longitud y 0,5 micrómetros de diámetro, a menudo con la típica forma de V (lo que también se denomina "forma de letras chinas"); aunque también aparecen formas elipsoidales, son aerobias o anaerobias facultativas (Collins y Cummins, 2006)

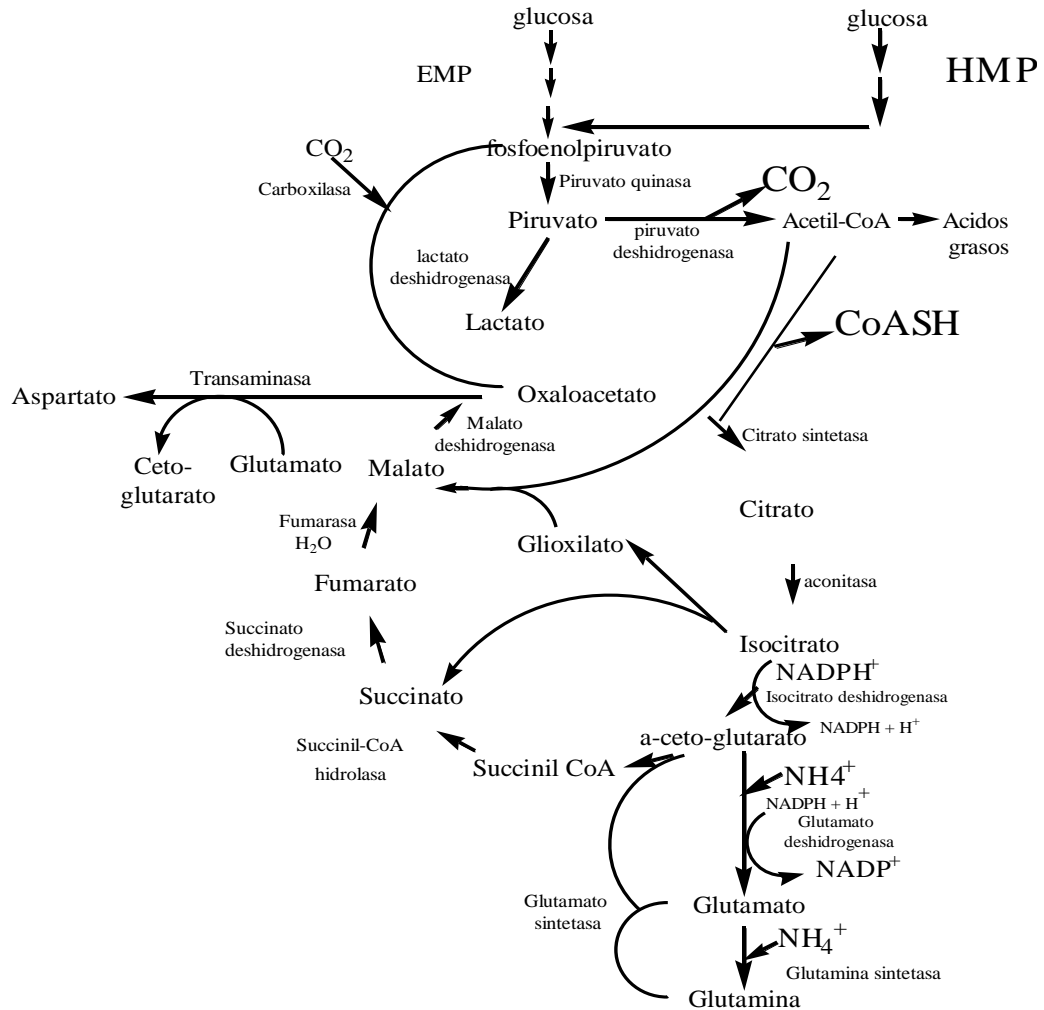
Con respecto a los requerimientos nutricionales, todos ellos necesitan biotina para su crecimiento y algunas cepas requieren tiamina y ácido p-aminobenzoico. La bacteria crece en agar nutritivo, agar sangre y telurito potásico, formando colonias pequeñas grisáceas de aspecto granuloso, translúcidas con centros opacos, convexas con bordes continuos. El color tiende a ser amarillento en agar nutritivo (Yoshita, 2006).

Las corynebacterias están ampliamente distribuidas en la naturaleza, encontrándose en el suelo, el agua, productos alimenticios y en la mucosa y piel del hombre y animales, la mayoría de especies de corynebacterias son utilizadas en procesos industriales de gran relevancia como la producción de aminoácidos, de nucleótidos y otros factores nutricionales, bioconversión de esteroides, degradación de carbohidratos, maduración de quesos, producción de enzimas y otros procesos de interés industrial. Algunas especies son productoras de metabolitos precursores de antibióticos; bacteriocinas del tipo corynelinocinas, agentes antitumorales. Una de las especies más estudiada es *Corynebacterium glutamicum*, el término *glutamicus* se debe a su capacidad de producir ácido glutámico, usado en la industria alimenticia como glutamato monosódico (MSG). (Kinoshita y Udaka, 2000).

2.3.1 Metabolismo de *Corynebacterium glutamicum* para la producción de ácido glutámico

La bacteria *Corynebacterium glutamicum* utilizada comercialmente para la producción de ácido glutámico, presenta en su metabolismo inhibición en la enzima α -cetoglutarato deshidrogenasa. En presencia de iones NH_4^+ se acumula α -cetoglutarato debido a la interrupción del ciclo del ácido cítrico (Figura 2), presentándose deficiencia en los intermediarios de este ciclo, por tanto, la bacteria utiliza las rutas anapleróticas para proporcionar al ciclo del ácido cítrico los intermediarios que se requieren para todas las demás reacciones de la célula (Hirasawa *et al.*, 2000).

Figura 2. Vías Metabólicas de la Biosíntesis del ácido glutámico a partir de la glucosa como fuente de carbono en *Corynebacterium glutamicum*



Fuente: Stryer y Lubert, (2007)

Las enzimas malato deshidrogena y málica están implicadas en el proceso de fijación de CO_2 . La enzima málica cataliza la carboxilación del piruvato a malato y la enzima malato deshidrogenasa convierte el malato a oxaloacetato, intermediario del ciclo del de Krebs. Estas secuencias anapleróticas completan el ciclo del ácido cítrico con ácidos dicarboxílicos C_4 y son metabolizados para proporcionar energía

a la célula o son transformados como intermediarios preliminares a la formación de ácido glutámico o son canalizados en el ciclo del glioxilato (Horton, 2008).

La producción y secreción de cantidades grandes de ácido glutámico dependen de la permeabilidad de la membrana celular de la bacteria (Shiio y Otsuka, 1996). El aumento de la permeabilidad en las bacterias que producen ácido glutámico puede obtenerse de diferentes formas:

- *Mediante deficiencia en biotina:* las cepas productoras de ácido glutámico necesitan para su crecimiento biotina, una coenzima esencial en la síntesis de ácidos grasos. En presencia de concentraciones de biotina mayores a 5 µg/L se produce un aumento en la biosíntesis de ácido oleico que se manifiesta en un contenido mayor en fosfolípidos en la membrana celular. Las células con alto contenido en fosfolípidos son incapaces de excretar ácido glutámico, por otra parte el crecimiento en medio deficiente en biotina origina daños en la membrana por reducción de la síntesis de fosfolípidos lo que conduce a una relación deficiente de ácidos grasos. Bajo estas condiciones puede ser excretado el ácido glutámico intracelular. (Shiio y Otsuka, 1996)
- *Mediante deficiencia en ácido oleico en mutantes auxótrofos para ácido oleico:* se ha postulado que en la biosíntesis de ácidos grasos participa la enzima acetil-CoA carboxilasa dependiente de biotina, catalizando la primera etapa de la síntesis de ácidos grasos; por tanto, en disminución de biotina disminuye la biosíntesis de estos ácidos grasos y los auxótrofos sintetizan membranas celulares con menor contenido en fosfolípidos en ausencia de biotina. (Takinami *et al.*, 1995).
- *Mediante la adición de penicilina:* la adición de penicilina en la fase logarítmica de crecimiento favorece significativamente la secreción de ácido glutámico; esta sustancia actúa inhibiendo la síntesis de mucopéptidos de la membrana celular bacteriana durante la multiplicación de la bacteria, la penicilina se añade a las fermentaciones en medios que contienen grandes cantidades de biotina entre 8 y 12 horas después de la inoculación del fermentador de forma que la velocidad de crecimiento bacteriano se reduzca a un nivel correspondiente a la velocidad en el medio bajo en biotina. (Volker, y Wendisch, 2001).

El descubrimiento del papel de la permeabilidad de la membrana celular en la producción de ácido L- glutámico ha hecho posible por tanto enfoques racionales a la producción industrial de este importante aminoácido (Crueger y Crueger, 1993).

Estudios realizados por Owen (1991) demostraron que la concentración intracelular de ácido glutámico era la resultante de un equilibrio entre el flujo de ácido glutámico hacia el interior de la célula y el flujo hacia el exterior. En *Corynebacterium glutamicum*, el sistema de transporte de ácido glutámico hacia el interior de la célula es inducido por un crecimiento en glutamato pero reprimido por la glucosa. El sistema de transporte del glutamato no está acoplado a la translocación de iones H^+ , Na^+ o K^+ , aunque sea estimulado por los iones K^+ . El sistema de transporte en *Corynebacterium glutamicum* es un sistema de transporte activo primario, unidireccional y ATP-dependiente.

En condiciones óptimas de cultivo las bacterias que producen ácido glutámico convierten aproximadamente el 50-60% de la fuente de carbono añadida a ácido L-glutámico; si se utilizan condiciones de fermentación menos favorables, de forma que se obtenga una baja producción de ácido glutámico, se ha observado un aumento en la masa celular y secreción de lactato, succinato, α -cetoglutarato, glutamina y N-acetilglutamina. (Crueger y Crueger, 1993).

2.3.2. Producción biotecnológica de ácido glutámico

El ácido glutámico (o glutamato monosódico) ha sido producido en Japón desde 1908, inicialmente por hidrólisis de gluten de trigo o de proteína de judía de soya, el proceso de fermentación fue inaugurado por la compañía Kyowa Hakko Kogyo en 1957, mientras que la compañía Ajinomoto a la vez producía ácido glutámico sintéticamente. Actualmente ambas compañías utilizan exclusivamente un proceso de fermentación (Dreyer *et al.*, 2000).

En general, para la producción comercial de ácido glutámico, se utilizan cepas de *C. glutamicum* o cepas relacionadas, y materias primas más frecuentemente utilizadas como la melaza de caña, la melaza de remolacha o los hidrolizados de almidón cuyo rendimiento de conversión varía del 50 al 60% según el sustrato utilizado (Kiefer y Heinzle, 2004).

Es esencial en el proceso de fermentación el suministro abundante de una fuente adecuada de nitrógeno, tal como las sales amoniacales, puesto que el NH_3 se incorpora a la molécula del aminoácido, las bacterias acidoglutámicas también pueden utilizar urea como fuente de nitrógeno. La concentración de los iones amonio debe mantenerse estable en el medio, puesto que las concentraciones demasiado altas son perjudiciales para el crecimiento celular y la formación del producto (Owen, 1991).

En la producción biotecnológica de L-Glutamato, el aminoácido sintetizado intracelularmente debe ser retirado de la célula, por supuesto se presenta cierta dificultad, 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 experimentos realizados se ha descubierto que en la bacteria *C glutamicum*, el L-Glutamato se excreta con mayor facilidad cuando la Biotina (vitamina H) se encuentra en pequeñas cantidades (Krämer y Lambert, 1999).

2.3.3. Parámetros para la producción biotecnológica de ácido glutámico

Según Crueger y Crueger (1993), los medios nutritivos deben ser optimizados no solo en los ingredientes utilizados sino en la forma como se prepara el medio. Varios parámetros que deben ser optimizados son:

- La composición de los ingredientes, calidad, relaciones carbono/ nitrógeno, impurezas, variabilidad de lote a lote
- Orden de solución o suspensión de los ingredientes, valor del pH antes y después de la esterilización de la solución , efecto de la esterilización sobre la solución nutritiva completa o sobre componentes individuales
- Cambios en la solución esterilizada de nutrientes debidos al aumento de la temperatura y aireación

De acuerdo a Nunherimar (2007), los parámetros más importantes durante la fermentación son:

- Temperatura: las fermentaciones son llevadas a cabo en el rango mesófilo (temperatura óptima 20- 45°C) o en el termófilo ($\geq 45^\circ\text{C}$), debe escogerse la temperatura adecuada para conseguir el máximo crecimiento por una parte y la formación óptima de producto, en algunas fermentaciones se utilizan temperaturas superiores para obtener un aumento del crecimiento de cultivo y luego la temperatura disminuye a partir del inicio de la fase diófase.
- Aireación: la velocidad de aireación es de 0.25-1.0vvm (volumen de aire/ volumen de líquido por minuto). La velocidad de aireación debe ser ajustada a la cantidad de O_2 que se requiera.

- Presión: a fin de minimizar el riesgo de contaminación se utiliza una sobrepresión de 0.2-0.5 bar. La presión hidrostática también tiene que ser tenida en cuenta en los fermentadores grandes ya que influye en la solubilidad del O₂ y el CO₂ en la solución de nutrientes.
- Agitación: en fermentaciones industriales, a fin de poder ajustar con presión la velocidad de agitación en el proceso, es deseable la instalación de un sistema de movimiento continuo.

2.4. SUSTRATO

El sustrato es la fuente de carbono y en algunos casos de nitrógeno, del cual se alimentan las bacterias y debe cumplir con algunos requisitos básicos como: ser económico y ser asimilable para el microorganismo. Los carbohidratos son los sustratos más usados en fermentación, entre ellos se encuentran los almidones del maíz, cereales y la melaza de caña. (Bullock y kristiansen, 1998).

2.4.1. Residuos de café y fique como sustratos

La pulpa de café y el jugo de fique son subproductos resultantes de la etapa de beneficio o procesamiento húmedo del café y del desfibrado de la hoja del fique. Estos desechos se componen principalmente de lignina, celulosa y hemicelulosa, los cuales constituyen una fuente abundante de materia prima para la obtención de glucosa mediante el proceso de hidrólisis ácida. Esta glucosa al utilizarla como materia prima en la industria de fermentaciones permite obtener una amplia gama de productos, entre ellos bioetanol, alimentos para animales, biomasa microbiana y aminoácidos, entre ellos ácido glutámico (Braham y Bressanni, 1997; Barbosa, 2002).

De 100 gramos de fruto de café, alrededor de 40% de su peso representa pulpa de café, 56% granos de café y alrededor de 4% mucílago. Estos datos indican que la disponibilidad promedio de pulpa de café es relativamente alta y que, por lo tanto es de enorme significación económica. En la Tabla 2 se presenta la composición proximal de la pulpa de café (Federación Nacional de cafeteros, 2010).

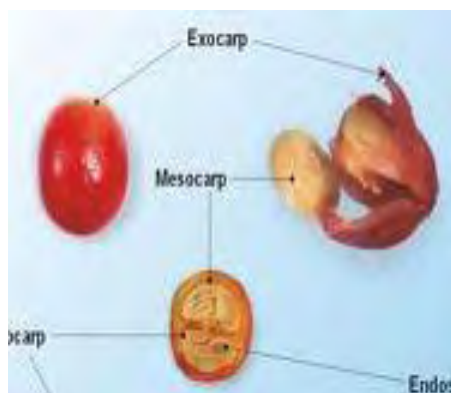
Tabla 2. Composición química de la Pulpa de Café (%)

FRESCA		DESHIDRATADA	FERMENTADA NATURALMENTE Y DESHIDRATADA
Humedad	76,7	12,6	7,9
Materia seca	23,3	87,4	92,1
Extracto etéreo	0,48	2,5	2,6
Fibra cruda	3,4	21,0	20,8
Proteína cruda	2,1	11,2	10,7
Carbohidratos	7,80	7,02	5,03
Extracto libre de Nitrógeno	15,8	44,4	49,2

Fuente: Braham y Bressanni, (1997)

La pulpa de café representa el más abundante desecho producido durante el despulpado del fruto de café, proceso que separa el grano del epicarpio (pulpa) y parte del mesocarpio (mucílago), Figura 3. Se estima que la pulpa de café representa un 40 % de varios millones de toneladas de café procesados "por vía húmeda" en Colombia (Antien, 2010)

Figura 3. Estructura del grano de café. Epicarpio (pulpa de café), mesocarpio (mucílago):



Fuente: Antien, 2010

La composición química del jugo de fique (Tabla 3) puede variar dependiendo de las características propias de la planta y el cultivo, sin embargo estudios químicos realizados por Rojas (2008) indican la existencia de metabolitos secundarios tales como: saponinas, flavonoides, alcaloides, esteroides y triterpenos

Tabla 3. Composición química del fique (%)

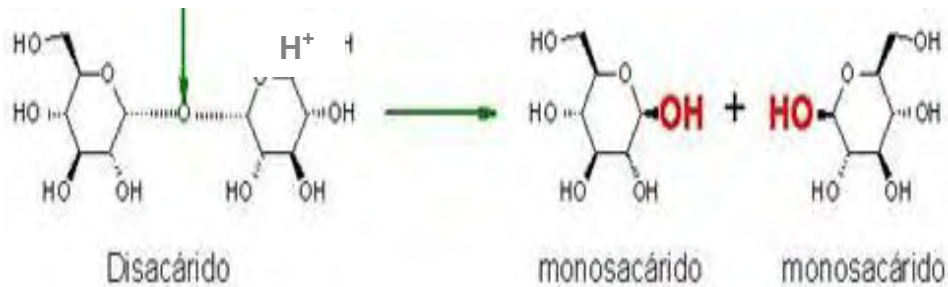
ELEMENTOS	JUGO	FIBRA
Clorofila	10,01	0,04
Carotenoides	0.81	0.01
Saponinas	8,03	0.00
Azucares	12,00	0.01
Flavonoides	1.01	0.00
ácidos orgánicos	1.90	0.00
Celulosa	0.08	73.8
Calcio	1,32	0,96
magnesio	0,72	0,10
Fosforo	0,49	0,04
Sodio	0,40	0,55
nitrógeno	1,02	0.12

Fuente: Rojas (2008)

El porcentaje del jugo de fique en la hoja se calcula del 70%, sin embargo por los métodos convencionales de prensado, no tecnificados de su extracción en las zonas fiqueras del país, este porcentaje puede bajar al 40%. De este jugo se puede aprovechar varios de sus componentes, especialmente los azúcares fermentables y los ácidos orgánicos (Federación Nacional de Fiqueros ,2011).

Los polisacáridos deben ser hidrolizados hasta monosacáridos para poder ser utilizados por los microorganismos. La hidrolisis de un enlace glucosídico se lleva a cabo mediante la disociación de una molécula de agua del medio. El hidrogeno del agua se une al oxigeno 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 (Figura 4) y el resto de la molécula que puede ser un monosacárido si se trata de un disacárido o polisacárido complejo. (Raymond y Donald, 2000).

Figura 4. Hidrólisis ácida de disacáridos



Fuente: Ferrer (2002)

Aunque la hidrólisis puede efectuarse con agua sola, suele necesitarse un iniciador, un promotor o un catalizador para obtener una rapidez de reacción práctica. Los álcalis, ácidos y las enzimas son las sustancias más usadas con este fin en escala industrial. Casi todas las operaciones de hidrólisis se efectúan en fase líquida, pero la reacción en fase de vapor se emplea cada vez más en instalaciones industriales (Ferrer, 2002).

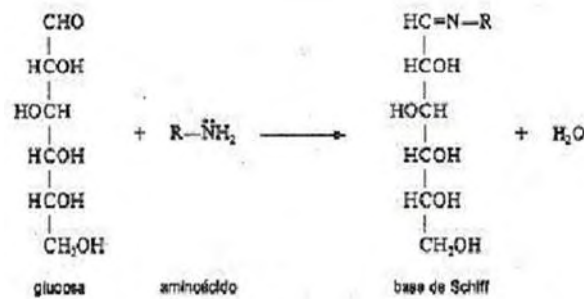
Algunas variables que intervienen en la hidrólisis son:

Temperatura: las altas temperaturas aceleran considerablemente todos los cambios que le suceden los monosacáridos en condiciones tanto ácidas como alcalinas. Los cambios en la temperatura afectan a la velocidad y al punto de equilibrio de la reacción (Jiménez, 2011).

Concentración: En general, un aumento en la concentración del agente hidrolítico da como resultado un aumento en la rapidez de la reacción. La elección de la concentración tiene importancia especial en los casos en que pueden producirse reacciones secundarias. A pH bajos (0.5%-4% concentración de ácido) se producen la reacción de Maillard (Figura 4) o reacciones de caramelización formándose compuestos nitrogenados inadecuados para los microorganismos. (Crueger y Crueger, 1993).

Estos compuestos no se encuentran en estado libre, sino incorporados a moléculas como glucolípidos, glicoproteínas, varios antibióticos como la eritromicina y carbomicina contienen aminoazúcares, se piensa que los aminoazúcares están relacionados con su actividad antimicrobiana. (García, 2004)

Figura 5. Reacción de Maillard.



Fuente: Crueger y Crueger (1993)

2.5. MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN DE AMINOÁCIDOS

A fin de estudiar en el laboratorio un aminoácido en particular con frecuencia se realizan pruebas cualitativas para su identificación y cuantificación; entre las cuales se tiene:

- La reacción con ninhidrina tiene como objetivo detectar y cuantificar cantidades de aminoácidos libres. Los aminoácidos, en general reaccionan con la ninhidrina (hidrato de ciclodehidrandeno) cuando son calentados con un exceso de la misma. Todos los aminoácidos que poseen un grupo amino libre reaccionan y forman dióxido de carbono, amoníaco y un aldehído que contiene un átomo de carbono menos que el compuesto original (Quiñones, 2004).
- Los métodos modernos de identificación de aminoácidos se basan en los procesos cromatográficos. En todos ellos la mezcla de sustancias que se va a fraccionar se disuelve en un líquido (HPLC) o en un fluido gaseoso (cromatografía de gases), conocido como fase móvil. La disolución resultante se hace fluir a través de una columna constituida por una matriz sólida porosa, que en ciertos tipos de cromatografía puede asociarse con un líquido unido, y que se conoce como fase estacionaria. Las interacciones de los solutos individuales con la fase estacionaria actúan retardando su progreso a través de la matriz, las fuerzas que retardan cada componente determinan que emigren con velocidades diferentes y causaran la separación de las sustancias puras. Voet y Voet (2006).

- La cromatografía en capa fina desempeña un papel indispensable en el análisis bioquímico. Se encuentra entre las técnicas analíticas más utilizadas convenientemente y solo precisa de un equipo sencillo, se emplea normalmente en la separación de moléculas pequeñas tales como aminoácidos y oligopéptidos (Voet y Voet, 2006).

3. METODOLOGIA

3.1. MUESTREO

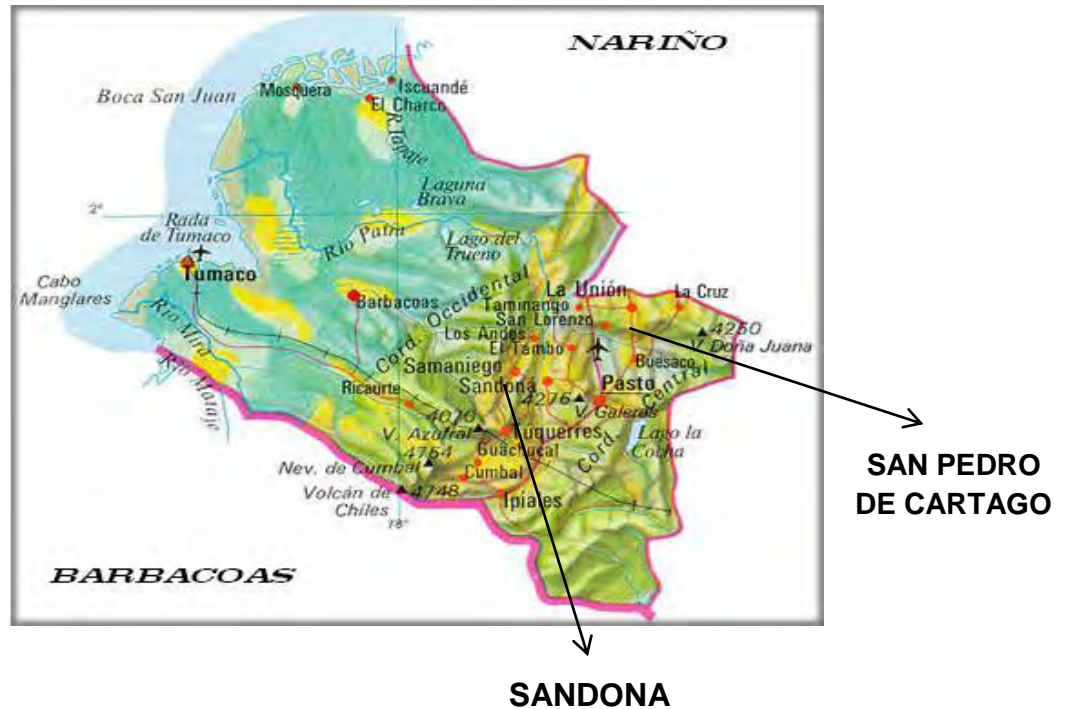
3.1.1. Muestra de pulpa de café.

La muestra de café variedad Caturra rojo, se recolectó en el municipio de Sandoná, (corregimiento de San Bernardo) región ubicada al sur occidente del departamento de Nariño a 1848 msnm (Figura 6). Se recogieron 3 kg de grano de café fresco, el cual se lavó con abundante agua para eliminar las impurezas y se procedió a despulpar manualmente obteniendo 1,2 kg de pulpa de café, luego se trasladó este sustrato a los laboratorios de la universidad de Nariño. Luego la pulpa de café se secó a 70°C durante 24 horas, posteriormente se pesó la muestra seca y se determinó el contenido de humedad. La pulpa seca fue molida y tamizada hasta obtener una muestra de partícula fina. Estas muestras fueron conservadas en bolsas plásticas con cierre hermético a temperatura ambiente; protegidas de la humedad para ser utilizadas posteriormente en los diferentes tratamientos.

3.1.2. Muestra de jugo de fique.

La muestra de fique variedad Uña de Águila se recolectó en el municipio de San Pedro de Cartago (vereda Yanangona) región ubicada al norte del departamento de Nariño a 1650 msnm (Figura 6). Se recogieron 2 L de desechos de desfibradora de fique; tanto jugo como residuos sólidos. Esta muestra se pasó inmediatamente a una nevera de icopor con geles refrigerantes para conservar la muestra a una temperatura de 8°C, y se trasladó este sustrato a los laboratorios de la universidad de Nariño. Seguidamente se procedió a homogenizar la muestra en licuadora industrial por 5 minutos. Este jugo se conservó en nevera a -4 °C para evitar con ello su descomposición y contaminación para facilitar el tratamiento de la muestra en los diferentes procedimientos.

Figura 6. Ubicación de las zonas del departamento de Nariño donde se realizó el muestreo de pulpa de café y jugo de fique.

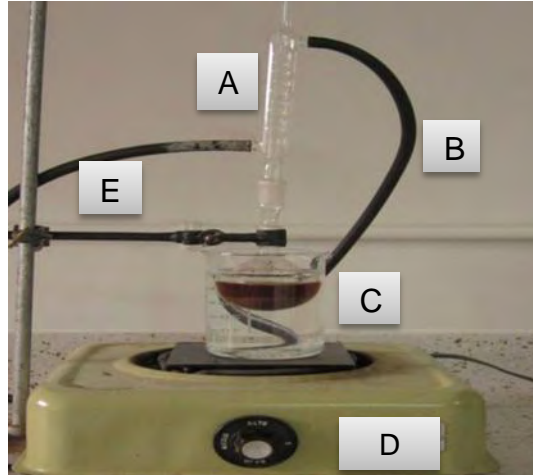


Fuente gobernación de Nariño. Oficina Departamental de turismo. 2007

3.1.3. Hidrólisis ácida

La hidrólisis ácida de los sustratos de pulpa de café y jugo de fique, se realizó con el fin de obtener los azúcares reductores utilizados como sustratos para el metabolismo de la bacteria *Corynebacterium glutamicum* para obtener de ellos ácido glutámico. Se utilizó para este procedimiento un digestor (Figura 7) conformado por un balón de destilación y un condensador de anillos. La temperatura de digestión se mantuvo utilizando baño maría. Siguiendo el protocolo empleado por Colina (2000), las muestras se mezclaron con la solución de ácido sulfúrico, empleando concentraciones de ácido de 1%, 2%, 3% en una relación 0.5/15 (peso de sustrato/ volumen de ácido), operando a condiciones atmosféricas con ebullición a reflujo, durante un tiempo de 4, 6, 8 horas.

Figura 7. Montaje utilizado en el proceso de hidrólisis ácida, realizado en un sistema de reflujo operado a condiciones atmosféricas en un digestor con condensador de anillos. A) Condensador, B) Salida de agua, C) Baño maría, D) Fuente de calor, E) entrada de agua.

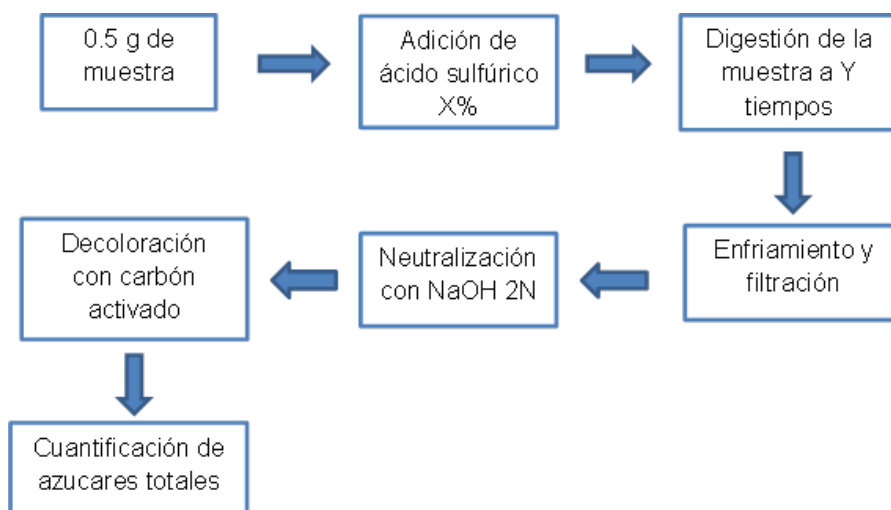


Fuente: Esta investigación

Con el fin de conseguir las mejores condiciones de extracción de los azúcares totales se realizaron ensayos por triplicado para obtener de este proceso el mejor rendimiento de azúcares utilizados como fuente de carbono por la bacteria *Corynebacterium glutamicum* en los procesos de fermentación. Se realizó un diseño experimental al azar donde las variables a analizar fueron la concentración de ácido y tiempo de fermentación y como variable de respuesta se obtuvo la concentración de azúcares reductores en cada proceso.

Se utilizó las mismas condiciones de hidrólisis para pulpa de café y para el jugo de fique. El tratamiento realizado se indica en el diagrama de flujo (Figura 8). Los azúcares reductores se cuantificaron empleando el método de Miller's (ácido 3,5 dinitrosalicílico) en cada ensayo realizado (Miller's, 2003).

Figura 8. Diagrama de flujo seguido en el proceso de hidrólisis ácida para obtener los azúcares fermentables. X: concentración de ácido sulfúrico: 1%, 2%, 3%. Y: tiempo de digestión. 4horas, 6 horas, 8 horas



Fuente: Esta investigación

3.2. MICROORGANISMO

En esta investigación se utilizó la cepa bacteriana *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 como organismo fermentador. Las características generales de esta cepa bacteriana se indican en la Tabla 4.

Tabla 4. Características generales de la bacteria *Corynebacterium glutamicum*

ATCC Numero	13032
Organismo	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
Designación	534 [NCIB 10025]
Nivel de Bioseguridad	1
Forma de envío	Vial liofilizado
Condiciones de crecimiento	ATCC medio: 3 (Agar Nutritivo o caldo Nutritivo)
Temperatura	37.0 °C

Fuente: AMERICAN Type Culture Collection. *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 [en línea]. Manassas, VA 20108 USA: ATCC. [Citado en febrero 2012]. <http://www.atcc.org/SearchCatalogs/directdetail.cfm?collection=ba&atccNum=13032>

3.2.1. Activación

Según la ficha técnica ATCC (Anexo H), una pastilla de la bacteria liofilizada *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 se hidrató con 1,5 mL de caldo nutritivo (Oxoid CM 0001), se agitó la muestra y se adicionó 2mL más de caldo nutritivo, conformando la solución madre. Este medio de cultivo está conformado por los nutrientes indicados en la Tabla 5.

Tabla 5: composición del medio de cultivo

NUTRIENTE	CANTIDAD (g)
Glucosa	40
K ₂ HPO ₄	1,0
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,5
Extracto de levadura	1,0
Peptona	10

Fuente: AMERICAN Type Culture Collection. *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 [en línea]. Manassas, VA 20108 USA: ATCC. [Recuperado en febrero 2012] <http://www.atcc.org/SearchCatalogs/directdetail.cfm?collection=ba&atccNum=13032>

3.2.2. Almacenamiento

De la solución madre se tomaron cuatro alícuotas de 0,5 mL y se mezclaron con 0,5mL de solución al 50% de glicerol y 50% de caldo nutritivo (Oxoid CM 0001) en microtubos separados de 1,5mL; los microtubos se llevaron a congelación a -4°C para su conservación (Hoischen, 2007).

3.2.3. Conservación del microorganismo

Para la conservación de la cepa bacteriana, se utilizó el método de siembra por estría empleado por Romero (2001). De la solución madre se tomó una alícuota de cultivo con el asa bacteriológica estéril y se realizaron siembras en la superficie del medio sólido (agar nutritivo Oxoid CM 0003) preparado en cajas de Petri. Los cultivos se llevaron a incubación por 48 horas a 37°C; con este medio de cultivo se realizaron pruebas para comprobar las características primarias de la bacteria entre ellas: tipo de crecimiento del microorganismo, color, morfología y tinción de Gram (Brenner y Crieg, 2001).

Para realizar los respectivos ensayos de fermentación se hicieron repiques cada ocho días (8) incubando por 48 horas a una temperatura de 37 °C, y

posteriormente se guardaron las muestras en nevera a una temperatura de 4°C en condiciones asépticas para evitar su contaminación.

3.3. PROCESO DE FERMENTACIÓN

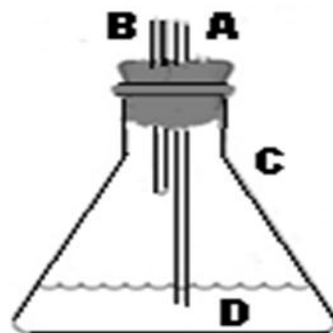
3.3.1. Cinética de crecimiento bacteriano

Con el fin de determinar el tiempo en que la cepa bacteriana alcanza el máximo de la fase exponencial y asegurar con ello que haya el mayor número de crecimiento celular, se realizó la cinética de crecimiento bacteriano. Para ello se tomó una colonia bacteriana y sembró en 10 mL de caldo nutritivo (Oxoid CM 0001) en tubos tapa rosca y se incubó en baño maría para mantener la temperatura constante a 37°C. Para cuantificar biomasa en el tubo de ensayo se midió la absorbancia a 600nm en un espectrofotómetro marca JENWAY Génova cada dos horas durante un periodo de tiempo de 52 horas (Romero, 2003)

3.3.2. Biorreactor

El biorreactor empleado en el proceso de fermentación fue un erlenmeyer de 500 mL(Figura 9), cerrado con un corcho adaptado con dos orificios ubicando en ellos dos mangueras de silicona; una de ellas de salida para tomar pequeñas cantidades de fermento para realizar control de pH, consumo de glucosa, crecimiento bacteriano y producción de aminoácido, la otra de entrada para adicionar la solución neutralizante, los orificios externos de las mangueras se cerraron con tapones de algodón para evitar contaminaciones .

Figura 9. Biorreactor utilizado en el proceso de fermentación para obtención ácido glutámico. A) Manguera para toma de muestra, B) manguera para adición de neutralizante C) Erlenmeyer, D) volumen de fermento.



Fuente: Esta investigación

3.3.3. Fermentación

En esta etapa se utilizaron como fuente de carbono los hidrolizados de pulpa de café, jugo de fique y glucosa como testigo. Como fuente de nitrógeno se utilizó sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Se realizaron cuatro tratamientos para cada sustrato (A, B, C, D) utilizando un diseño experimental completamente aleatorizado en los cuales se varió la cantidad de carbono y la cantidad de nitrógeno. Cada uno de estos tratamientos se enriqueció con los micronutrientes que se muestran en la Tabla 6. Para cada tratamiento se realizaron tres replicas.

Tabla 6: nutrientes utilizados en el medio de producción de ácido glutámico

SUSTRATO (Fuente de Carbono)	CANTIDAD (g)	CANTIDAD DE $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Fuente de nitrógeno)	TRATAMIENTOS
Hidrolizado de pulpa de café	15	4	A1
		9	B1
	30	4	C1
		9	D1
Hidrolizado de jugo de fique	15	4	A2
		9	B2
	30	4	C2
		9	D2
Glucosa	15	4	A3
		9	B3
	30	4	C3
		9	D3
MICRONUTRIENTES		CANTIDAD	
MgSO ₄ ·7H ₂ O		0,24g	
FeSO ₄ ·7H ₂ O		0,02g	
MnSO ₄ ·7H ₂ O		0,0003g	
KH ₂ PO ₄		0,8g	
Biotina		5 µg	
tiamina		0,8mg	
Soya		0,125g	

Fuente: Amín (2007)

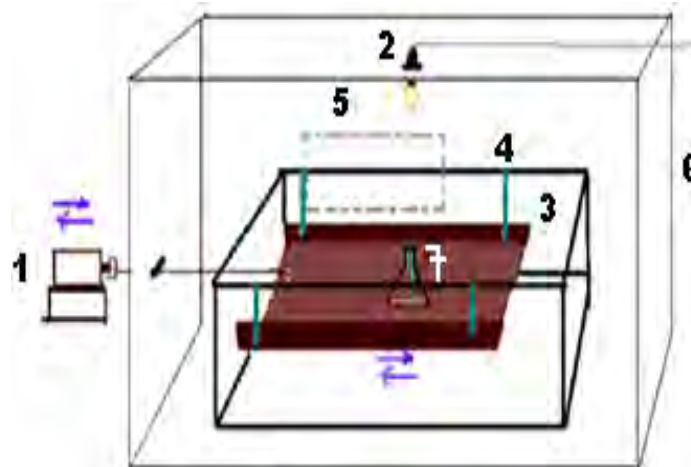
Estos micronutrientes se seleccionaron de acuerdo a Amín (2007), quien utilizó melaza de caña como fuente de carbono. En esta investigación se modificaron únicamente las concentraciones de la fuente de carbono y de nitrógeno, conservando las concentraciones de los micronutrientes.

La preparación de los nutrientes del medio de fermentación se realizó en dos partes. La glucosa junto con el magnesio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), hierro ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) y manganeso ($MnSO_4 \cdot 7H_2O$); se disolvieron en 50 mL de agua destilada y se esterilizaron a 120° por 15 minutos.

El KH_2PO_4 , la biotina, tiamina y el $(NH_4)_2SO_4$, se diluyeron en 40 mL de agua destilada, de igual manera estos nutrientes se esterilizaron en autoclave a $120^\circ C$ por 15 minutos, a continuación fueron transferido en condiciones asépticas al fermentador y se inocularon con 10 mL de cultivo bacteriano, para completar un volumen de trabajo igual a 100mL. Para preparar este medio de fermentación se siguió el método empleado por Vallino y Stephanopoulos (2002), quienes obtuvieron lisina utilizando la bacteria *corynebacterium glutamicum* ATCC 21253.

El pH del caldo de fermentación fue mantenido a 7,5 adicionando hidróxido de amonio al 26% (NH_4OH) durante los controles realizados. La temperatura se conservó en $35^\circ C$ y se agitó constantemente a 180 rpm para asegurar la distribución homogénea de oxígeno y nutrientes, en este proceso se siguió el proceso empleado por Sunitha y Subba (1998). Estas condiciones de fermentación se mantuvieron en el montaje mostrado en la figura 10 donde se realizaron todos los procesos fermentativos. Los controles de pH se realizaron en la cabina de flujo laminar esterilizada previamente con luz Ultravioleta en la sección del Laboratorio de Microbiología de Laboratorios Especializados de la Universidad de Nariño.

Figura 10. Montaje utilizado en el proceso de fermentación para la producción de ácido glutámico. 1) Agitador horizontal, 2) Bombilla, 3) Balancín, 4) Soporte, 5) Ventana de monitoreo, 6) Caja, 7) biorreactor.



Fuente: esta investigación

3.3.4. Monitoreo del proceso de fermentación

El tiempo de fermentación fue determinado por el crecimiento de la cepa bacteriana en el medio de producción; realizando controles cada 24 horas, tomando dos (2) mL de caldo para cuantificar biomasa, consumo de azúcar y producción de ácido glutámico. El conteo del microorganismo se realizó en cámara de Neubauer, el azúcar residual se cuantificó por el método de Miller´s empleando glucosa como patrón y el ácido glutámico se evaluó por método de Moore y Stein, con ácido glutámico como estándar, de acuerdo al protocolo seguido por Amín (2007).

3.3.5. Recuperación y purificación de ácido glutámico

Terminada la fermentación se procedió a neutralizar los caldos de fermentación con hidróxido de sodio (NaOH) en granallas, hasta alcanzar un pH de 9.5 y formar la sal sódica lo cual hace que se aumente la solubilidad y conseguir la mayor cantidad de producto, en este proceso se empleó el método descrito por García (2004). A continuación se centrifugó por 15 minutos a 7000 rpm esta mezcla de fermento para separar el glutamato monosódico del material celular. El sobrenadante se decoloró con carbón activado y se acidificó con ácido clorhídrico 4N hasta alcanzar el punto isoeléctrico del ácido glutámico (3,1), seguidamente se

concentró el medio líquido hasta la quinta parte de su volumen a una temperatura de 60°C y se dejó precipitar a temperatura ambiente. Los cristales se recuperaron por filtración al vacío y se secaron a 70°C en incubadora y se pesaron para determinar el rendimiento del producto obtenido a partir de los sustratos empleados. (Macarulla, 2001).

Teniendo en cuenta que en esta solución además del aminoácido se encuentran residuos de glucosa y otros subproductos se realizaron varias recristalizaciones con metanol para la purificación del producto seguido de una cromatografía en capa fina, para este procedimiento se utilizó como fase estacionaria una lámina de sílica gel y como fase móvil la mezcla de solventes n-butanol/ácido acético/ agua en proporción (8:2:2), procedimiento aplicado por Randerath (1999).

Para determinar el rendimiento de producción de ácido glutámico en el proceso de fermentación, se realizó los cálculos de acuerdo a la relación estequiometría de que a partir de una mol de glucosa se produce teóricamente una mol de ácido glutámico; experimentalmente existe una conversión de azúcar a ácido glutámico del 60% (Stryer y Lubert, 2007). Por tanto se calculó el rendimiento de la cantidad de azúcar adicionada al medio de fermentación y con el peso final del producto obtenido en la fermentación se determinó el rendimiento del proceso aplicando la relación:

(%R= rendimiento real/ rendimiento teórico* 100%)

3.4. CROMATOGRAFÍA DE GASES

La identificación del ácido glutámico obtenido en el proceso de fermentación de los hidrolizados de pulpa de café y jugo de fique se realizó mediante cromatografía de gases. Para ello se tomó una alícuota de 50 µL de la solución de aminoácido en un tubo tapa rosca y se secó en baño a 70°C, luego se adicionaron 100 µL de derivatizante N-terbutildimetilsilil-N- metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA) y 100 µL de acetonitrilo. Seguidamente la mezcla se colocó en un termorreactor a 80°C durante 4 horas para que se realice la reacción del aminoácido con el derivatizante. Para este procedimiento se siguió la metodología empleada por Sobolevsky (2003).

El análisis de cromatografía de gases se realizó en los Laboratorios especializados de la Universidad de Nariño, para ello se inyectó 1µL de la mezcla derivatizada en el cromatógrafo de gases GCMS_QP5000 Shimadzu, equipado

con una columna capilar de sílice fundida MDNS de 30m de longitud, 0.25mm de diámetro interno y 0.25 μm de espesor de película.

3.5. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas en la concentración de ácido sulfúrico y tiempo de digestión en el proceso de hidrólisis ácida, se realizó análisis de varianza (ANOVA) a estos parámetros (Montgomery, 2010).

Para establecer si existen diferencias estadísticamente significativas en la fuente de carbono y la concentración de nitrógeno utilizadas en el proceso de fermentación para producir ácido glutámico, se realizó análisis de varianza (ANOVA) para las diferentes concentraciones, además se realizó la prueba LSD, por ser la prueba más sensible cuando se encuentran diferencias significativas con un $\alpha = 0.05$ (Montgomery, 2010). Este análisis se aplicó solo a la fuente de carbono.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS

4.1.1. Muestra de pulpa de café

El grano de café recolectado era de forma esférica, de color rojo oscuro y de consistencia blanda (Figura 11). En el proceso de despulpado se obtuvo una pulpa con olor característico de la pulpa de café fresca y madura, de sabor dulce y con gran cantidad de humedad.

Figura 11. Grano de café variedad Caturra rojo recolectado en el municipio de Sandoná, corregimiento San Bernardo



. Fuente: esta investigación

En el tratamiento de secado y molido de la pulpa se obtuvo al final una muestra homogénea de color café, y un tamaño de partícula fino y olor agradable a azúcar (Figura 12). Así mismo se determinó que en 1,200 Kg de muestra recolectada el 41,17% corresponde al peso seco de la pulpa y el 54,83% a humedad.

Figura 12. Pulpa de café obtenida del proceso secado y molido



Fuente: esta investigación.

La temperatura y el tiempo de secado fue importante para el tratamiento de la muestra de pulpa de café; debido a que si se somete la pulpa a altas temperaturas y tiempos prolongados de secado la pulpa de café se quema y adquiere una coloración negra, por el contrario si la temperatura y el tiempo de secado era menor se dificultaba la molienda de la pulpa, lo que ocasionó pérdidas en la obtención de los azúcares. Por consiguiente, las mejores condiciones de secado de la pulpa de café se lograron con un tiempo de 24 horas y una temperatura de 70°C, lo que permitió moler completamente esta muestra, evitando desperdicios para obtener el máximo rendimiento de azúcares totales en el proceso de hidrólisis ácida.

Según Estrada (2006), para poder moler una muestra vegetal y analizarla, se debe desecarla a una temperatura entre 60°C y 70°C para impedir que el secado afecte la composición química de la muestra. De igual manera, de acuerdo a Molina, (1997) se necesitan temperaturas de secado de 100°C cuando se requiera determinar en la muestra vegetal el contenido de humedad total y para analizar su composición química se necesita hacer un secado parcial a una temperatura de 60°C.

4.1.2. Muestra de jugo de fique

El jugo de fique junto con el bagazo se recolectó de hojas de fique frescas de color verde claro, de humedad y madurez apropiada, para ello se realizó un desfibrado completo de la hoja para obtener la mayor cantidad de desechos (Figura 13) y se evitó la descomposición de estos desechos al ser sometidos inmediatamente en las neveras de icopor con geles refrigerantes a una temperatura de 8°C.

Figura 13. Recolección de los desechos de fique de desfibrado de la hoja de fique en el municipio de San Pedro de Cartago, vereda Yanangona



Fuente: esta investigación

Del proceso de licuado de los desechos de fique se obtuvo un jugo de color verde, de consistencia y tamaño de los residuos sólidos homogéneos y de olor irritante característico del fique. La conservación a bajas temperaturas de este sustrato facilitó su tratamiento en los procesos realizados. De acuerdo a Acevedo y Serna (2004), la conservación a bajas temperaturas de muestras con gran contenido de azúcares como el jugo de fique es importante para evitar la fermentación y su descomposición

4.2. PRODUCCIÓN DE HIDROLIZADOS

En el proceso de hidrólisis ácida de los sustratos de pulpa de café y jugo de fique se realizaron 27 ensayos para cada muestra. Los resultados obtenidos se indican en los anexos A y B.

4.2.1. Hidrólisis ácida de pulpa de café

En la Tabla 7 se indican los resultados alcanzados en el proceso de hidrólisis de la pulpa de café. Con una concentración de ácido al 1% se logró obtener la mayor cantidad de azúcares totales a un tiempo de 6 horas. A una concentración al 2% de H_2SO_4 la mayor concentración de azúcares se alcanzó a un tiempo de digestión de 8 horas siendo más alta que la concentración correspondiente a la hidrolisis al 1%. Con una concentración de ácido al 3% la cantidad de azúcares aumenta ligeramente en todos los tiempos de digestión.

Tabla 7. Hidrólisis ácida de pula de café

[H_2SO_4]	TIEMPO DE HIDROLISIS (H)	CONCENTRACIÓN DE AZUCARES TOTALES (g/mL)
1%	4	0,021
	6	0,026
	8	0,020
2%	4	0,029
	6	0,028
	8	0,032
3%	4	0,033
	6	0,034
	8	0,033

Fuente: esta investigación

Estos valores muestran que, a medida que aumenta la concentración de ácido y tiempo de hidrólisis, se incrementa la cantidad de azúcares totales; sin embargo los hidrolizados obtenidos con una mayor concentración de ácido y tiempo de hidrólisis al final de la digestión tomaron un color café oscuro producido por la descomposición de los azúcares al ser sometidos a tiempos prolongados de digestión y a pH bajos, debido a que se forman azúcares aminados por la presencia de proteína en la pulpa de café. De acuerdo a Crueger y Crueger (1993), cuando existe sobrecalentamiento, un pH bajo y una alta proporción de azúcares reductores los grupos amino de los aminoácidos reaccionan con los grupos carbonilo de los azúcares formando productos de color tostado, substratos no adecuados para los microorganismos, porque estos compuestos pueden tener actividad antimicrobiana, además la formación de estos compuestos ocasionó dificultades para su decoloración y se necesitó adicionar más solución (NaOH) para neutralizar estas muestras con las concentraciones de 2% y 3% de ácido sulfúrico, lo que no sucedió con los hidrolizados obtenidos con una concentración del 1% de H_2SO_4 .

Por tanto en esta investigación se eligió trabajar con esta concentración de 1% de H_2SO_4 y 6 horas de digestión, para facilitar la decoloración de los hidrolizados y emplear menor cantidad de solución neutralizante.

De acuerdo a los resultados estadísticos del ANOVA, se obtuvo un P-valor= 0,499 para la concentración de ácido y un P-valor =0,9345 para el tiempo con un nivel de confianza del 95%, por lo que no se encuentran diferencias estadísticamente significativas (Anexo C); por consiguiente según este análisis se puede utilizar cualquier concentración de ácido y tiempo de hidrólisis, sin embargo no es recomendable trabajar con concentraciones altas de ácido y tiempos prolongados de digestión, porque los costos de producción se elevan y no es conveniente emplear estas condiciones en procesos fermentativos debido a que ocasionan la descomposición de los azúcares que se emplean como fuente de carbono para los microorganismos.

Resultados similares obtuvieron Colina (2001), estudiando la hidrólisis de pulpa de café con ácido sulfúrico diluido operando a presión atmosférica con ebullición a reflujo. Los resultados mostraron que en 100 g de pulpa seca, la concentración de azúcares aumentó cuando se trabajó con mayor concentración de ácido y a mayores tiempos de digestión, alcanzando un rendimiento del 64% en azúcares totales correspondiente a 0,029 g/mL, con una concentración de ácido sulfúrico del 1 % y un tiempo de hidrólisis de 4 horas. Ferrer (2002) estudiaron la cinética de la hidrólisis ácida de los bagacillos de caña de azúcar, los cuales se hidrolizaron

mediante ebullición a reflujo, con diferentes concentraciones de ácido sulfúrico diluido y tiempos de reacción. Observaron que la concentración de azúcares aumenta con una concentración de 1,5% y 2 % ácido sulfúrico, hasta una concentración de 0,0310 g/mL de azúcares totales en 100g de muestra hidrolizada.

4.2.2. Hidrólisis ácida de jugo de fique

En la hidrólisis del jugo de fique se lograron resultados similares a los obtenidos en el proceso de hidrólisis ácida de la pulpa de café, utilizando las mismas concentraciones de ácido sulfúrico y tiempos de digestión (Tabla 8), alcanzando altas concentraciones de azúcares totales en todos los tratamientos realizados. Sin embargo, la decoloración de los hidrolizados se dificultó en todas las muestras, independientemente de la concentración de ácido y tiempos de digestión. Los hidrolizados presentaron al final de la digestión una coloración verde oscura siendo necesario realizar varias veces la decoloración de los mismos. Por tanto, con este sustrato la hidrólisis se realizó a una concentración del 1% de ácido y 6 horas de digestión, debido a que con esta concentración se empleó menor cantidad de neutralizante, de tal forma que se trabajó en las mismas condiciones de hidrólisis con los dos sustratos. Además al realizar el análisis estadístico no hay diferencia significativa en los tratamientos del jugo de fique. (Anexo D).

Tabla 8. Hidrólisis ácida jugo de fique

[H ₂ SO ₄]	TIEMPO DE HIDROLISIS (H)	CONCENTRACIÓN DE AZUCARES TOTALES (g/mL)
1%	4	0,028
	6	0,029
	8	0,028
2%	4	0,033
	6	0,034
	8	0,034
3%	4	0,037
	6	0,034
	8	0,036

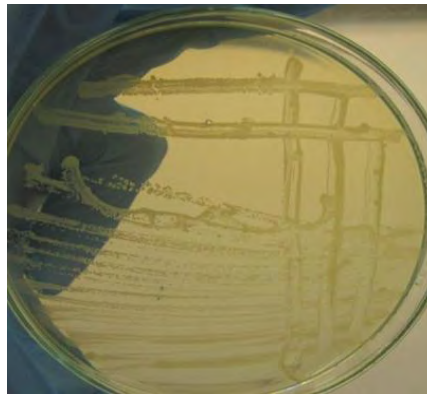
Fuente: esta investigación

La dificultad presentada en el tratamiento de los hidrolizados del jugo de fique puede deberse a la composición compleja de este sustrato (Tabla 3), especialmente las saponinas. De acuerdo a Barbosa (2002) estas sustancias no son eliminadas completamente en el proceso de hidrólisis ácida. Con la pulpa de café la descomposición de los azúcares era provocada por la presencia de proteínas, las concentraciones bajas de ácido sulfúrico y tiempos prolongados de digestión.

4.3. CONFIRMACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LA CEPA BACTERIANA

Realizada la activación de la bacteria *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 y obtenido un cultivo con abundante crecimiento de la cepa según la metodología empleada. Se observó en las cajas de Petri las características propias del microorganismo de acuerdo a las reportadas por la casa comercial ATCC. Tales como: color amarillo pálido, agrupación en colonias, y crecimiento en cadena. Las características mencionadas se observan en la figura 14.

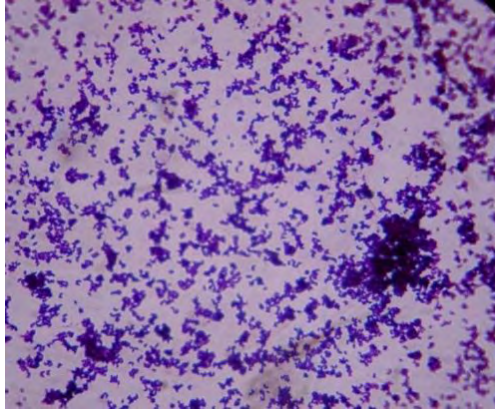
Figura 14. Crecimiento de *Corynebacterium glutamicum*, en agar nutritivo.



Fuente: esta investigación

Con la tinción de Gram se confirmaron las características primarias de la cepa bacteriana, según se reporta en el Manual de Bergey's, (Brenner y Crieg, 2001). Entre ellas se confirmó que el microorganismo pertenece al grupo de las bacterias Gram positivas y su forma corresponde a los bacilos ovoides no flagelados propio de la bacteria *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, como se observa en la Figura 15

Figura. 15. tinción de Gram de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, observada a 100X



Fuente: esta investigación

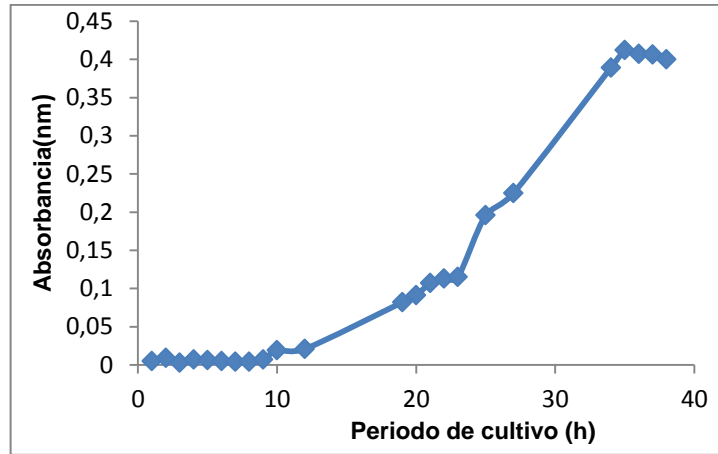
4.4. PROCESO DE FERMENTACIÓN

4.4.1. Cinética de crecimiento bacteriano

Utilizando caldo nutritivo como medio de cultivo se determinó por turbidimetría (Romero, 2003) que la bacteria *Corynebacterium glutamicum* inicia la fase exponencial después de las diez primeras horas de inoculación y alcanza la fase estacionaria después de las 36 horas de multiplicación celular. Los resultados se observan en la Figura 16.

En las primeras horas de cultivo no hubo crecimiento celular. En el periodo comprendido entre las 10 a 20 horas las células iniciaron la fase de crecimiento alcanzando una absorbancia de 0,11. Después de este espacio de tiempo se evidencia que las bacterias se multiplican activamente durante la fase exponencial hasta alcanzar un máximo de absorbancia igual a 0,42 a las 36 horas cuyo valor equivale a una cantidad de células de $2,3 \times 10^7$ cel/mL contadas en cámara de Neubauer. Sunitha, I y Subba (1998), alcanzaron una concentración celular de 1.2×10^7 cel/mL a las 36 horas de inoculación para producir ácido glutámico empleando *corynebacterium glutamicum* NCIM 2168 y *Pseudomonas reptilivora* NCIM 2598

Figura 16. Cinética de crecimiento bacteriano de *Corynebacterium glutamicum*, en medio de cultivo. La bacteria inicia su crecimiento a las 10 horas de inoculación y alcanza la fase estacionaria después de las 36 horas de multiplicación celular



Fuente: esta investigación

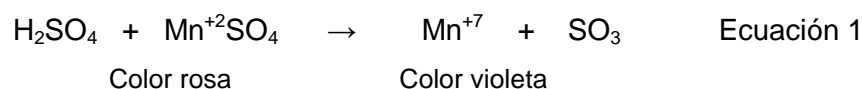
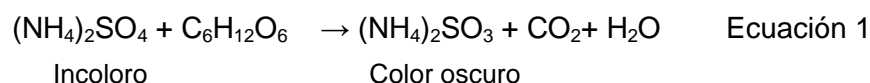
Por tanto se escogió este tiempo de cultivo bacteriano para inocular con suficiente cantidad de microorganismo de los medios de fermentación

4.4.2. Biorreactor

El proceso de fermentación fue exitoso con el biorreactor diseñado en esta investigación. Con él se monitoreó correctamente el proceso, se realizó adecuadamente la toma de muestra para control de pH, cuantificación de células, consumo de glucosa y producción de ácido glutámico; así mismo fue posible adicionar fácilmente la solución neutralizante. Además de lo anterior el biorreactor a escala de laboratorio es de construcción sencilla y económica y se lograron mejores rendimientos de producción, alcanzando un rendimiento máximo del 56,01% de ácido glutámico, comparados a los reportados por Sunitha, Subba (1998), quienes obtuvieron una producción de ácido glutámico del 58,62%. Yoshioka *et al.*, (1999) alcanzaron un rendimiento de 55,00% de aminoácido y Amín, G. (2007) obtuvo una producción de aminoácido del 58,50%. Esta producción de ácido glutámico fue obtenida con otros métodos de fermentación y empelando glucosa y/o melaza de caña de azúcar como fuente de carbono.

4.4.3. Preparación del medio de fermentación

En el proceso de fermentación, la esterilización por calor contribuyó eficientemente a la eliminación de los microorganismos contaminantes. La esterilización del medio de producción se realizó en dos partes siguiendo el método empleado por Vallino y Stephanopoulos (2002) en la producción de lisina para evitar la reducción del sulfato de amonio a sulfito de amonio por la presencia de glucosa y la exposición a las altas temperaturas de esterilización provocando una coloración oscura (ecuación 1). De igual manera fue necesario esterilizar por separado los hidrolizados de las sales, debido a que en medio ácido y altas temperaturas el manganeso se reduce provocando una coloración violeta en el medio como se indica en la ecuación 2. (Brown, 2009); esta coloración dificultaba la cuantificación de biomasa celular, azúcar y ácido glutámico durante la fermentación.



4.4.4. Monitoreo del proceso de fermentación

En el proceso de fermentación se monitoreó la adaptación de la bacteria en el medio fermentación a través de su crecimiento, consumo de la fuente de carbono suministrada y la producción de ácido glutámico en los diferentes tratamientos.

En el tratamiento A, el cual se realizó adicionando 15g de carbono proveniente de los hidrolizados de pulpa de café y jugo de fique y del sustrato testigo respectivamente y 4 g de nitrógeno, se observa en los resultados mostrados en la Tabla 9 la multiplicación de biomasa celular, acorde al consumo de la fuente de carbono y la producción de ácido glutámico. En el tratamiento B (Tabla 10) se suministró la misma cantidad de hidrolizado y se aumentó la cantidad de nitrógeno a 9g, los valores obtenidos muestran que hubo un crecimiento abundante de biomasa celular, sin embargo la producción de ácido glutámico disminuyó en comparación con la producción de aminoácido en el tratamiento A.

En el tratamiento C, se utilizó 30g de hidrolizado de ambos sustratos con una cantidad menor de nitrógeno, correspondiente a 4 g, se evidencia en los resultados mostrados en la Tabla 11 una disminución del crecimiento bacteriano y producción de ácido glutámico en comparación a los tratamientos A y B

Tabla 9: tratamiento A. Crecimiento celular, consumo de carbono, producción de aminoácido

Fuente de carbono	TIEMPO (H)	CÉLULAS ($\times 10^9$ cel./mL)	CARBONO RESIDUAL (g/mL)	PRODUCCIÓN DE ÁCIDO GLUTÁMICO(g/mL)
Hidrolizado de café	0	0,070	0,150	0
	24	0,933	0,121	0,006
	48	2,404	0,107	0,018
	72	4,873	0,059	0,037
	96	5,127	0,031	0,041
Hidrolizado de fique	0	0,070	0,150	0
	24	0,070	0,140	0,009
	48	1,893	0,126	0,026
	72	2,310	0,108	0,036
	96	2,341	0,0680	0,027
Glucosa	0	0,070	0,150	0
	24	1,579	0,121	0,009
	48	3,980	0,107	0,029
	72	5,985	0,059	0,049
	96	6,585	0,028	0,051

Fuente: esta investigación

En el tratamiento D, el cual se realizó con 30 de carbono y 9 de nitrógeno, se observa en la Tabla 12 un abundante crecimiento de biomasa celular y producción de ácido glutámico.

Tabla 10. Tratamiento B. Crecimiento celular, consumo de carbono, producción de aminoácido

Fuente de carbono	TIEMPO (H)	CÉLULAS ($\times 10^9$ cel./mL)	CARBONO RESIDUAL(g/mL)	PRODUCCIÓN DE ÁCIDO GLUTÁMICO (g/mL)
Hidrolizado de pulpa de café	0	0,012	0,150	0
	24	2,286	0,130	0,005
	48	3,704	0,121	0,019
	72	5,023	0,098	0,026
	96	6,947	0,061	0,030
Hidrolizado de jugo de fique	0	0,012	0,15	0
	24	0,920	0,1402	0,009
	48	1,428	0,1238	0,011
	72	2,096	0,0973	0,027
	96	3,083	0,065	0,029
Glucosa	0	0,012	0,150	0
	24	3,010	0,131	0,007
	48	5,831	0,116	0,021
	72	7,352	0,086	0,038
	96	7,651	0,055	0,043

Fuente: esta investigación

Tabla 11. Tratamiento C. Crecimiento celular, consumo de carbono, producción de aminoácido

Fuente de carbono	TIEMPO (H)	CÉLULAS (X10 ⁹ cel./mL)	CARBONO RESIDUAL (g/mL)	PRODUCCIÓN DE ÁCIDO GLUTÁMICO (g/mL)
Hidrolizado de café	0	0,089	0,300	0
	24	1,446	0,287	0,013
	48	3,766	0,266	0,023
	72	4,080	0,184	0,041
	96	5,143	0,129	0,051
Hidrolizado de fique	0	0,089	0,300	0
	24	1,135	0,296	0,007
	48	2,125	0,228	0,018
	72	2,906	0,153	0,023
	96	3,225	0,137	0,034
Glucosa	0	0,089	0,3	0
	24	1,906	0,261	0,021
	48	4,857	0,228	0,032
	72	5,995	0,181	0,050
	96	6,410	0,117	0,065

Fuente: esta investigación

Estos valores obtenidos muestran que los mejores resultados se lograron con los sustratos de pulpa de café y glucosa, evidenciándose con estos sustratos datos similares de crecimiento bacteriano, consumo de glucosa y producción de aminoácido.

Tabla 12. Tratamiento D. Crecimiento celular, consumo de carbono, producción de aminoácido

Fuente de carbono	TIEMPO (H)	CÉLULAS (X10 ⁹ cel./mL)	CARBONO RESIDUAL (g/mL)	PRODUCCIÓN DE ÁCIDO GLUTÁMICO (g/mL)
Hidrolizado de café	0	0,048	0,3	0
	24	1,734	0,287	0,017
	48	7,358	0,233	0,038
	72	9,674	0,135	0,512
	96	9,865	0,636	0,078
Hidrolizado de fique	0	0,048	0,300	0
	24	1,295	0,287	0,011
	48	2,001	0,256	0,027
	72	3,979	0,132	0,041
	96	4,165	0,076	0,058
Glucosa	0	0,048	0,300	0
	24	2,325	0,274	0,026
	48	8,152	0,224	0,042
	72	10,981	0,111	0,060
	96	10,920	0,052	0,083

Fuente: esta investigación

Con el hidrolizado de jugo de fique la bacteria se multiplicó y consumió la fuente de carbono suministrada; sin embargo hubo menor producción de ácido glutámico en comparación con los alcanzados con la pulpa de café.

De acuerdo al análisis de varianza (ANOVA) realizado (Anexo E), se obtuvieron P-valores de 0,0070 para glucosa y 0,0239 para los hidrolizados; por tanto existe diferencia significativa en la obtención de ácido glutámico empleando estas fuentes de carbono. Según la Prueba Múltiple de Rango (Anexo F) no hay diferencia significativa para obtener ácido glutámico utilizando hidrolizado de pulpa de café y glucosa. Existe diferencia significativa para producir el aminoácido empleando hidrolizado de jugo de fique, debido a su considerable disminución de producción de ácido glutámico en los tratamientos, comparando la producción de aminoácido obtenido con el hidrolizado de pulpa de café y la glucosa.

Resultados semejantes fueron observados por Amín (2007) en la producción de este aminoácido, utilizando un reactor con células inmovilizadas de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 y melaza de caña como fuente de carbono y por Pérez y Muñoz (2006), quienes obtuvieron ácido glutámico empleando la misma cepa bacteriana y almidón de papa como fuente de carbono.

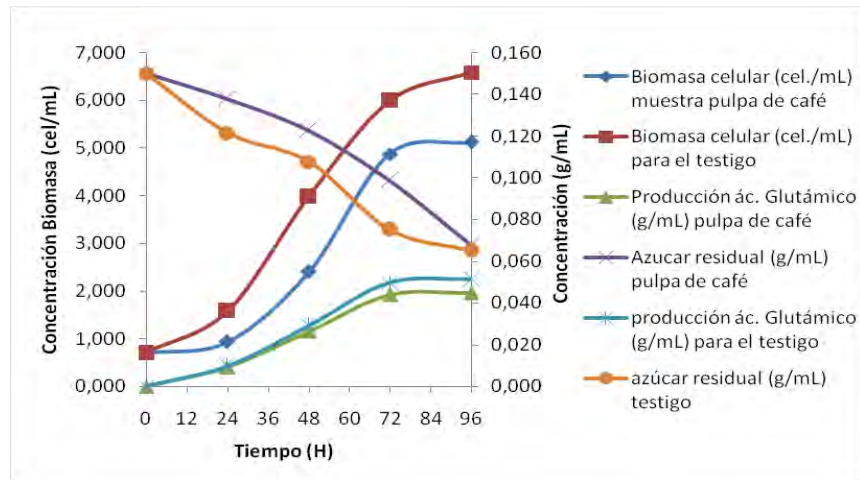
Teniendo en cuenta la variación en la concentración de nitrógeno en cada tratamiento, la producción de ácido glutámico es más alta en los tratamientos A y D respectivamente, en comparación con los tratamientos B y C donde la producción de aminoácido disminuyó. Sin embargo, al realizar el análisis estadístico a la concentración de nitrógeno, se obtuvo un P-valor = 0.0687 mostrando que no hay diferencia significativa al variar la cantidad de nitrógeno en la fermentación (Anexo G).

Esto nos lleva a pensar que la reducción en la producción de aminoácido pudo deberse a que en estos tratamientos la relación carbono/nitrógeno no fue la adecuada para el metabolismo microbiano. De acuerdo a Cocaign (2011) en el metabolismo aerobio de la bacteria, la enzima α -cetoglutarato deshidrogenasa es inhibida por concentraciones altas de nitrógeno para desviar el ciclo del ácido cítrico a la producción de ácido glutámico, por tanto en el tratamiento B, hubo la cantidad de nitrógeno requerida, sin embargo la concentración de carbono no fue suficiente para suplir las necesidades metabólicas y producir ácido glutámico. En el tratamiento C pudo ocurrir lo contrario; la cantidad de carbono era suficiente, y la concentración de nitrógeno no fue la apropiada.

Por tanto, lo importante en este proceso de fermentación fue encontrar la relación carbono/nitrógeno para alcanzar un buen rendimiento de producción. Esta relación apropiada de carbono/nitrógeno fue la utilizada en el tratamiento A, donde la mayor cantidad de azúcar consumido se transformó en ácido glutámico.

Haciendo una comparación de las cinéticas de crecimiento bacteriano, con los resultados obtenidos en el tratamiento A, realizados para cada sustrato; podemos ver en la Figura 17 que con la pulpa de café y la glucosa los resultados obtenidos son similares en cuanto al crecimiento celular, consumo de carbono y producción de aminoácido. Como se observa en la gráfica (Figura 17) la bacteria se multiplica activamente hasta las 72 horas y entra la fase estacionaria hasta las 96 horas del periodo de fermentación.

Figura 17: comparación de la cinética de crecimiento bacteriano, consumo de carbono y producción de ácido glutámico con hidrolizado de pulpa de café y glucosa



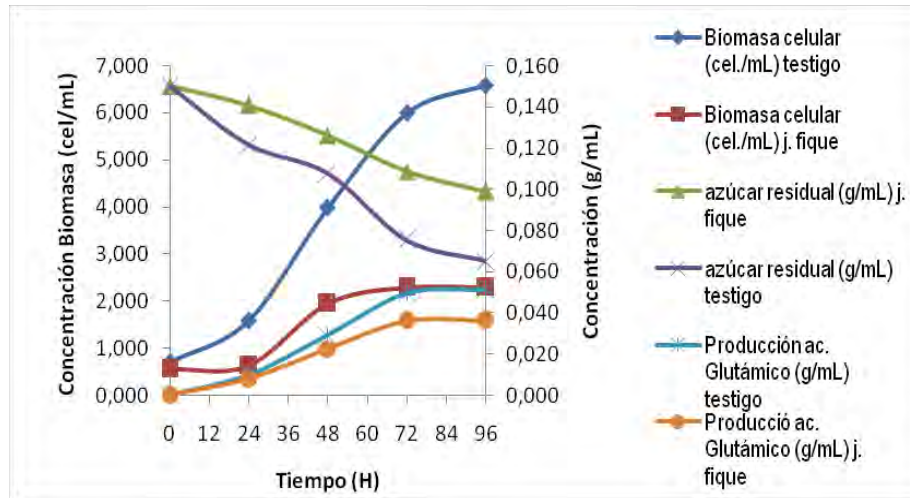
Fuente: esta investigación

La producción de ácido glutámico fue relativamente baja en los dos primeros días de fermentación y la mayor producción y la acumulación del producto sucedió en el periodo estacionario, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Amin, (2007), alcanzado mayor producción de ácido glutámico en el periodo estacionario de crecimiento bacteriano, logrando una concentración de 93g/mL de este aminoácido.

Comparando el crecimiento bacteriano en la fermentación con hidrolizado de jugo de fique (Figura 18), éste es considerablemente menor al producido por la glucosa, se alcanza una menor concentración de biomasa celular en la fase

exponencial y la bacteria entra en fase estacionaria; de igual manera la producción de aminoácido disminuyó con este sustrato.

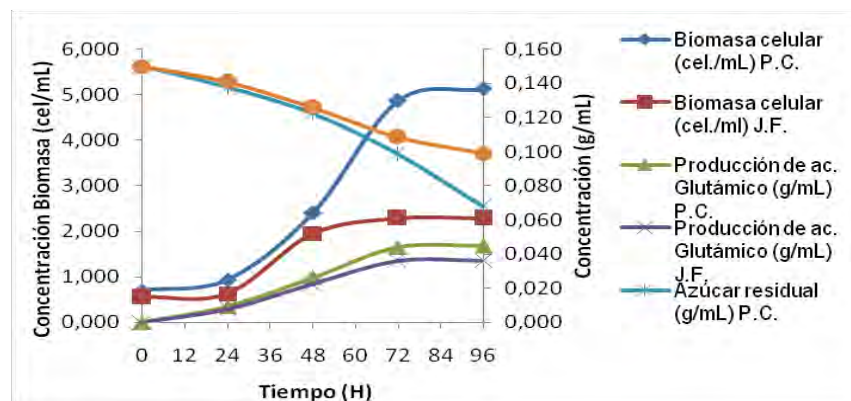
Figura 18: comparación de la cinética de crecimiento bacteriano, consumo de carbono y producción de ácido glutámico con hidrolizado de jugo de fique y glucosa



Fuente: esta investigación

Respecto a la producción de ácido glutámico con el hidrolizado de jugo de fique, ésta fue menor en todos los tratamientos; puesto que si bien hubo crecimiento celular y la bacteria consumió esta fuente de carbono la obtención de ácido glutámico disminuyó en comparación con el ácido glutámico obtenido con el hidrolizado de la pulpa de café (Figura 19).

Figura 19. Comparación de la cinética de crecimiento bacteriano, consumo de carbono y producción de ácido glutámico con hidrolizado de jugo de fique y pulpa de café



Fuente esta investigación

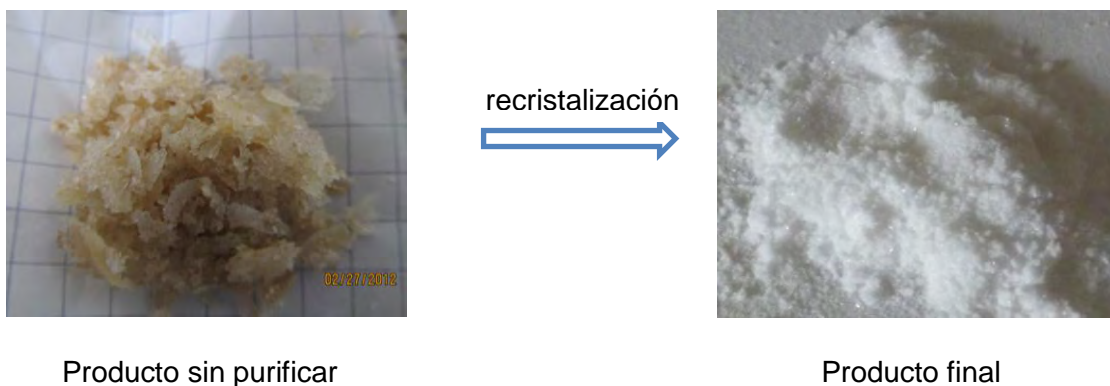
Se observa, además en los tratamientos realizados con el hidrolizado de jugo de fique que la concentración de nitrógeno no influyó en la producción de ácido glutámico en este proceso de fermentación.

La disminución de producción con este sustrato puede deberse a que existe en el jugo sustancias bactericidas como saponinas, alcaloides y flavonoides que no fueron eliminadas completamente en el proceso de hidrolisis y que pueden inhibir el metabolismo de la bacteria y la disminución de producción de este aminoácido. Rojas, (2008) estudió estos compuestos y determinó que estas sustancias tienen capacidad biofungicida en el control de la gota en la papa.

4.5. RECUPERACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL PRODUCTO.

El ácido glutámico obtenido por precipitación después del proceso de fermentación se recuperó en forma de cristales de coloración amarillenta, con pequeñas impurezas de color café las cuales se eliminaron por repetidas recristalizaciones hasta obtener unos cristales de color totalmente blanco, de partícula finas e inodoros, similares a los patrones comerciales puros (Figura20). En la cromatografía en capa fina se obtuvo un RF de 0,27 igual al que aparece reportado por (Randerath, 1999), similar al RF del ácido glutámico utilizado como patrón.

Figura 20. Acido glutámico recuperado de los caldos de fermentación utilizando el método de precipitación



Fuente: esta investigación

El rendimiento del proceso de recuperación del aminoácido después de la precipitación se muestra en la Tabla 13 en cada uno de los tratamientos. La cantidad de aminoácido recuperado en esta investigación fue mayor que la obtenida por Pérez y Muñoz (2006); quienes empleando el mismo método de recuperación y la misma cepa bacteriana, con sustratos de almidón de papa, alcanzaron un rendimiento máximo del 45% en el tratamiento T1

Tabla13. Rendimiento de producción de ácido glutámico en el proceso de fermentación

TRATAMIENTO	% DE RECUPERACIÓN DE ÁCIDO GLUTÁMICO		
	Hidrolizado de pulpa de café	Hidrolizado de jugo de fique	Glucosa testigo
A	56,01	36,88	69,67
B	40,98	39,62	54,64
C	34,67	24,47	44,19
D	53,02	36,03	56,42

Fuente: esta investigación

El mayor rendimiento en la producción de ácido glutámico se obtuvo utilizando como sustrato pulpa de café, alcanzando un rendimiento máximo de 56.01% en el tratamiento A, donde la relación carbono/nitrógeno es de 3.7; relación adecuada para convertir la mayor cantidad de carbono consumido en ácido glutámico por la bacteria *C. glutamicum*.

El resultado obtenido en esta investigación en relación al rendimiento es comparable al obtenido en los trabajos reportados en la Tabla 14, en los cuales se utilizan diferentes métodos de fermentación y como sustrato melaza de caña de azúcar y glucosa como fuente de carbono. Por tanto con el rendimiento de producción de ácido glutámico de 56,01% alcanzado en el tratamiento A, utilizando 15 g de hidrolizado y 4 g de nitrógeno, con las condiciones de fermentación empleadas se demuestra que con la pulpa de café se puede obtener productos de gran interés comercial como el ácido glutámico.

Tabla 14. Comparación de varios sistemas de fermentación para la producción de ácido glutámico

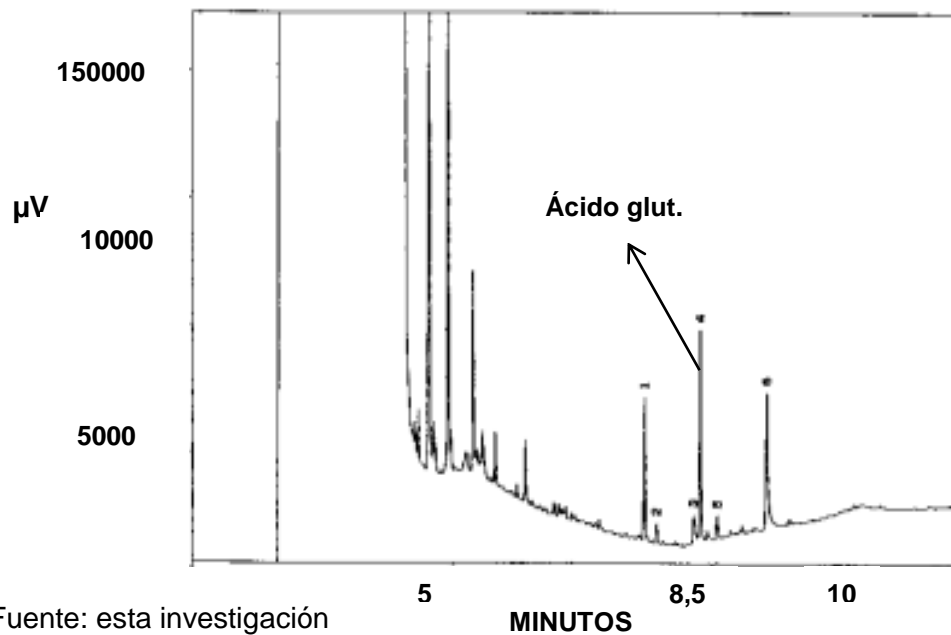
AUTORES	% DE RENDIMIENTO	SISTEMA DE FERMENTACIÓN
Amín 2007	58.50	Cultivo continuo usando células inmovilizadas de <i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032 dentro de cubos de poliuretano
Aoki y wada 2005	53.7	Cultivo discontinuo usando células libres de <i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032
Yoshioka 1999	55.0	Cultivo continuo usando células libres de <i>brevibacterium sp</i>
Sun-Uk 2004	53.0	Cultivo discontinuo usando células libres de <i>Corynebacterium glutamicum</i>
Sunitha 1998	62.01	Cultivo discontinuo usando células de <i>Corynebacterium glutamicum</i> y <i>Pseudomonas reptivora</i>

Fuente: Amín (2007)

4.6. IDENTIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE GASES

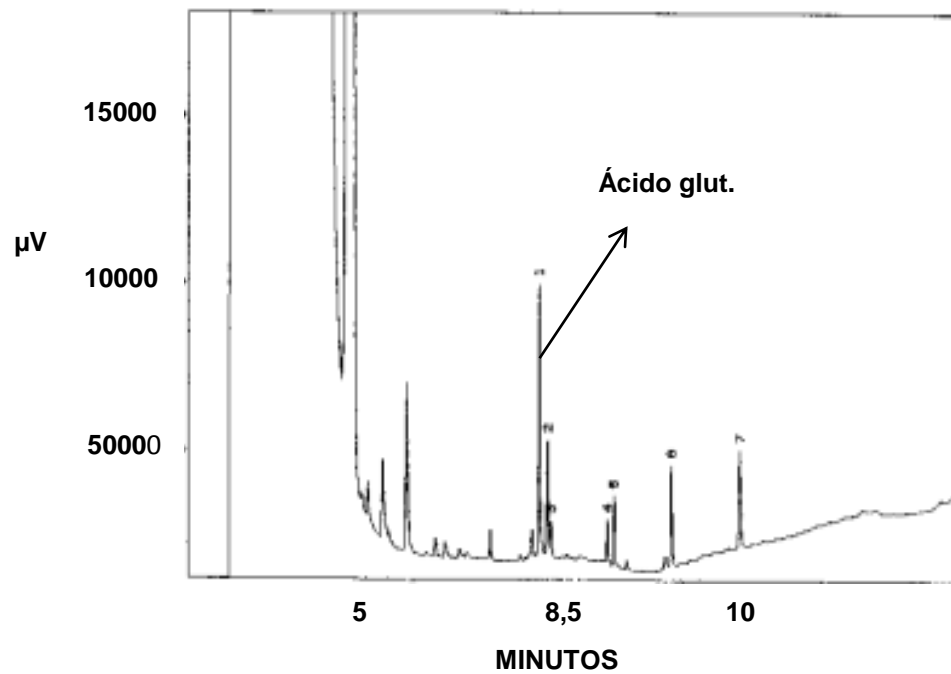
Los cromatogramas obtenidos en la cromatografía de gases en todos los tratamientos, muestran que el producto obtenido con los dos sustratos empleados, presentan una señal con tiempo de retención de 8,5 minutos (Figuras 21 y 22), la cual coincide con el tiempo de retención del aminoácido utilizado como patrón (Figura 23). Esto indica que el producto obtenido es ácido glutámico, aunque se evidencia que existen impurezas posiblemente debidas a productos inespecíficos de la derivatización.

Figura 21. Cromatograma de ácido glutámico obtenido con hidrolizado de pulpa de café



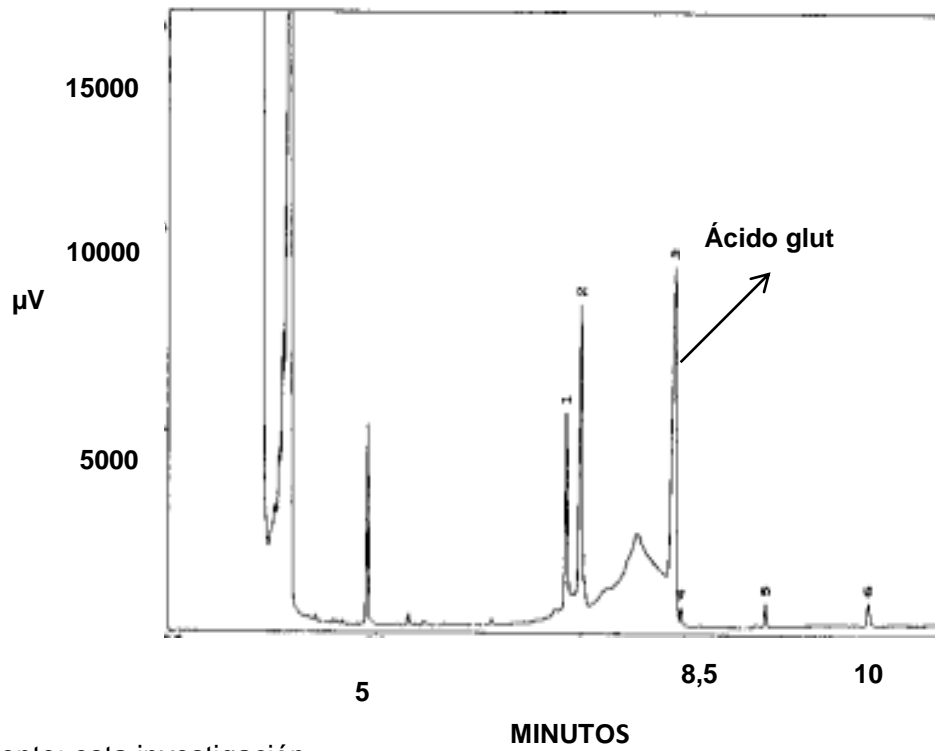
Fuente: esta investigación

Figura 22. Cromatograma de ácido glutámico utilizado como patrón



Fuente: esta investigación

Figura 23. Cromatograma de ácido glutámico obtenido con hidrolizado de jugo de fique



Fuente: esta investigación

5. CONCLUSIONES

- Las mejores condiciones de hidrólisis ácida en los dos sustratos de pulpa de café y jugo de fique se alcanzaron con una concentración diluida de ácido sulfúrico (1%) y un tiempo de hidrólisis de 6 horas.
- El mejor rendimiento en la producción de ácido glutámico se obtuvo empleando el hidrolizado de pulpa de café en el tratamiento A, en él que se utilizó 15 g de hidrolizado y 4 g de nitrógeno, logrando un rendimiento de 56.01%, donde la relación carbono/nitrógeno es de 3.7.
- Se adecuó un biorreactor a escala de laboratorio, con él que se logró monitorear correctamente el proceso de fermentación; controlando en forma correcta la variación del pH, consumo de carbono, aumento de biomasa y producción de ácido glutámico.
- El método de precipitación utilizado para recuperar el ácido glutámico, permitió obtener buenos rendimientos en la recuperación de este aminoácido en los tratamientos realizados.
- Con la metodología empleada y utilizando sustratos y nutrientes de fácil acceso y bajo costo, fue posible obtener ácido glutámico con buen rendimiento y alta pureza.

6. RECOMENDACIONES

- Es recomendable realizar un estudio más detallado de la composición del jugo de fique y evaluar su efecto sobre el metabolismo microbiano, probando otros métodos de extracción de los azúcares.
- Identificar los azúcares producidos en la hidrólisis de estos sustratos utilizando métodos cromatográficos, con el fin de evaluar que azúcares son los de mayor aprovechamiento para el microorganismo.
- Emplear otros sustratos como fuente de carbono y otros nutrientes para obtener ácido glutámico u otros aminoácidos.
- Probar otras técnicas de fermentación para la producción de ácido glutámico y emplear cepas bacterianas diferentes a *Corynebacterium glutamicum* y evaluar su producción.

BIBLIOGRAFÍA

Acevedo, J. Serna, E. 2004. Optimización del proceso de extracción de material orgánico procedente de fique (*Furcraea* sp.) y observación del efecto biofungicida. Trabajo de grado para optar al título de Ingeniero Químico. Universidad Pontificia Bolivariana de Medellín, Facultad de Ingeniería Química

AMERICAN Type Culture Collection. *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 [en línea]. Manassas, VA 20108 USA: ATCC. [Recuperado en enero 2012]. Disponible en Internet: <http://www.atcc.org/SearchCatalogs/directdetail.cfm?collection=ba&atccNum=13032>

Amin, G. 2007. Production of L-glutamic acid by immobilized cell Reactor of the bacterium *Corynebacterium glutamicum* entrapped into Carrageenan gel beads. Sciences Journal 2(1) 62-67

ANTIER, M. 2010. Pectinase-Hiperproducing mutants of *Aspergillus niger* C28B25 for Solid-State Fermentation of Coffee Pulp. Enzyme Microb. Technol. 15:254-260.

AOKI, R., Wada, M., Takesue, N y Yokota, T. Enhanced glutamic acid production by a H⁺-ATPase defective mutant acid by continuous fermentation of *Corynebacterium glutamicum*. Biol. Sci. Biotechnol. Biochem., 69: 1466-1472.

BARBOSA, A. Evaluación de la calidad de jugo de fique en la obtención de hecogenina y análisis fotoquímico del extracto heptánico del jugo hidrolizado de *Furcraea Macrophylla*, variedad negra común. Trabajo de grado para optar al título de Químico. Departamento de Química Universidad Nacional, 2002.

Braham, J. Bressani, R. 1997. Pulpa De Café: Composición, Tecnología y Utilización. Colombia: Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo CIID, 1997.

Bellisle, F. 2007. "Glutamate and the UMAMI taste: sensory, metabolic, nutritional and behavioural considerations. A review of the literature published in the last 10 years". Neuroscience and Biobehavioral Reviews 23. 423-438

Brenner, N. Crieg, G. 2001. BERGEY's. "Manual of systematic Bacteriology". USA.. P. 1274.

BROWN, T. 2008. Química la Ciencia Central. 9na edición. Person. España
P 1352G

Bullock, C. Kristinse, H. 1991 Producción Microbiana Industrial, 2da edición.
Pearson. México. P 697.

Cocaign, M. 2011. Batch kinetics in *Corynebacterium glutamicum* during growth on various carbon substrates: use of substrate mixtures to localize metabolic bottlenecks. Appl. Microbiol. Biotechnol. 40:526–530.

Colina, G. 2001. Hidrólisis Ácida y Caracterización de Carbohidratos de la Pulpa de Café, (Maracaibo, Venezuela). Revista Facultad de Agronomía .14. 265-275

Collins, M. Cummins, C. 2006. Genes of *Corynebacterium glutamicum* as a model of Emb proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. Glycobiology. Biol 62:251-263.

Crueger, W. Crueger, A. 1993. Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial. 3ed. ACRIBIA. Zaragoza, España. P. 1-2

Douglas, E. 2000. Elaboración microbiológica de productos químicos industriales. 2ed. McGraw-Hill Interamericana. México. P 154-200.

Dreyer, A., Coello, N y Montiel, E. 2000. 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*, (Morelia- México). Revista de Agronomía Tropical. 50. 210-215.

Estrada, F. 2006. Análisis de los alimentos y forrajes destinados a los animales. (Palmira- Valle). Revista, Desarrollo para Producción Animal.12. 120-362.

FEDERACIÓN NACIONAL DE CAFETEROS. [En línea]. [Visitada 3 Sep. 2012].
Disponible en:
<http://www.cafedecolombia.com/nuestrosprod/cafespeciales/pag_csc.html

FEDERACION NACIONAL DE FIQUEROS, FENALFIQUE. [En línea] [Visitada sep de 2012]. Disponible en: <<http://www.fenalfique.colombia.com/nuestrosprod>>

Ferrer, J. 2002. Cinética de la Hidrólisis Ácida de Bagacillo de Caña de Azúcar. Trabajo de grado para optar al título de ingeniero Agrónomo. Universidad Autónoma de México. Facultad de Agronomía.

García, G. 2004. *Biotecnología Alimentaria*. 3ra edición. Reverte. México

Hirasawa, T., Wachi, M y Nagai, K. 2000. A mutation in the *Corynebacterium glutamicum* *ItsA* gene causes susceptibility to lysozyme, temperature sensitive growth, and L-glutamate production. *J. Bacteriol.* 182:2696–270.

Hoischen, C., 2007. Evidence for an efflux carrier system involved in the secretion of glutamate by *Corynebacterium glutamicu*. *Arch. Microbiol.* 151:342–347.

Horton, R. 2008. *Bioquímica*. 2da edición. Hall Hispanoamérica, México. P 100-103.

Jiménez, J. 2011. Degradación de azúcares por hidrólisis ácida. Trabajo de grado para optar al título de Ingeniero Químico. Universidad de Morelia. México.

Klefer, P y Heinzle, E. 2004. Comparative Metabolic Flux Analysis of Lysine-Producing *Corynebactrium glutamicum* Cultured on glucose or fructose. *Apped And enviromental Microbiology.* 70: 229-239

Kinoshita, S. y Tanaka, K.1997. Microbial Production of acid glutamic. *Appl. Sci.* 2(1): 92-97.

Kurihara, K. 2009. “Glutamate: from discovery as a food flavor to role as a basic taste (umami)”. *American Journal of Clinical Nutrition.* 90 19-22

Krämer, R y Lambert, C.1999. Uptake of Glutamate in *Corynebacterium Glutamicum*: Evidence for a Primary Active Transport System. *Eur. J. Biochem.*6: 172-175.

Lenhinger, A. 2005. *Biochemistry*. 4ta edición. Pearson Educación. Barcelona, España. P 452-460.

Leveau, J y Bouix, M. 2000. *Microbiología Industrial: Los Microorganismos de Interés industrial*. 1 ed. Reverte. Zaragoza, España.

Macarulla, J. 2001. *Bioquímica Cuantitativa*. 2da edición. Reverte. Barcelona, España 2001. P 154-162.

Matheos, P. 2003. *Microorganismos de Interés Industrial*. 2da edición. Hall Hispanoamericana. México. P 254-300.

- Miller's, G. 2003. Use of DNS reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem . 31
- Molina, C. 1997. Manual de Técnicas para nutrición acuícola. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Fundación CENAIM_ESPOL. Ecuador
- Montgomery, D. 2010. Diseño y Análisis de Experimentos, 2da edición Limusa Wile. México. P 1321-1334.
- Muñoz, L y Perez, W. 2006. Obtención y purificación de ácido glutámico en fermentos de hidrolizados de papa, producidos con la bacteria *corynebacterium glutamicum*. Trabajo de grado para optar al título Químico. Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Química
- Nunheimer, T. 2007. Product inhibition of the fermentative formation of glutamic acid. Appl.Microbiol. 20:215–217.
- Owen, W. 1991. Biotecnología de la Fermentación: Principios, Procesos y Productos. 2 ed. Reverte. Zaragoza, España. 1991.
- Petra, G. Pyruvate Carboxylase is a major Botlenect for glutamate and lysine production by *Corynrbacterium glutamic*. Biotecnol. 3(2) 295-300. 2001.
- Quiñones, Z. 2004. Identificación de Carbohidratos y Proteínas. (Santiago, Republica Dominicana). Revista de Área Ciencias Fisiológicas. Departamento de Medicina. 13: 45-51-
- Randerath, K. 1999. Cromatografía en capa fina. 2 da edición. Pearson educación. Madrid, España. P 462-478.
- Raymond, E. y Donald, F. 2000. Enciclopedia de Tecnología Química, ácido glutámico. Hispanoamérica, Madrid, España tomo 2. P 201.
- Rojas, M. 2008. Caracterización fisicoquímica del jugo de fique (*Furcraea spp.*), elaboración y evaluación de un biofungicida útil en el control agroecológico de la gota (*Phytophthora Infestans*) en la papa. Universidad de Nariño, Facultad de Ingeniería Agroindustrial, San Juan de Pasto.

Romero, C. 2001. Microbiología y parasitología Humana : bases etiologicas de las enfermedades infecciosas. 3 ra edicion. McGraw-Hill Interamericana. Mexico 2001. P 521-520.

Romero, E.2003. Metodos de Recuento de Microorganismos. 3ra edicion, Reverte. Barceloan, España. P 120-130

Roskoski, R. 2008. Bioquímica. 3ra edición. McGraw- Hill interamericana. México. P 40-45

Shiio, I y Otsuka, S. 1996. Effect of biotin on the bacterial formation of glutamic acid. I. Glutamate formation and cellular permeability of amino acids. J. Biochem. 51:56–62.

Sobolevsky, T. 2003. The derivatization and analysis of amono acids by GC_ MS. Sep. Sci. 2003, 26, 1474-1478

Soto, A. 2000. Producción Industrial de Aminoácidos. (México df) Revista de Biología y biotecnología. 5: 21-25.

Sunitha, I y Subba, R. 1998. Optimization of medium constituents and fermentation conditions for the production of L-glutamic acid by the coimmobilized whole cells of *Micrococcus glutamicus* and *pseudonomas reptivora*. Bioprocess engeneering. 18: 353-359

Stryer, M y Lubert L, J. 2007. Bioquímica. 6ta edicion. Reverte. Barcelana, España. P 451-470.

SUN- UK, C. Enhanced glutamic acid production by *Brevibacterium* sp. With temperature shift-up cultivation, J. Biosci., 98: 211-213G. 2004

Takinami, K., Yoshii, H. y TSURI, H. 1993. Biochemical effects of fatty acid and its derivatives on L-glutamic acid fermentation. Part III. Biotin-Tween 60 relationship in the accumulation of L-glutamic acid and the growth of. *Corynebacterium glutamicum*. Agric. Biol. Chem. 29:351–359.

Vallino, J y Stephanopoulos, G. 2002. Metabolic Flux Distributions in *Corynebacterim glutamicum* during growth and Lysine overproduction. Chemical engineering, Cambridge. 28: 634-635.

Voet, J y Voet, D. 2006. Bioquímica. 3ra edición. Reverte. Madrid, España. P 451-460.

Volker, F y Wendisch, A. 2000. Determination of metabolic fluxes during coutilization of two carbon source: comparative analysis with *corynebacterium glutamicum* during Growth on acetate and Glucose. J. Bacteriol., 182(11): 308-312.

Yoshita, J. 2006. L-glutamic acid producing microorganism and a method for producing L-glutamic acid. U.S. patent US20060141588A1

Yoshioka, T., Ishii, Y. y Kawahara, Y. 1999. Method for producing L- glutamic acid by continuous fermentation. United stated patent 5869300. 1999

ANEXOS

Anexo A: Tabla de Hidrólisis ácida de pulpa de café: ensayos, absorbancia y concentración de azúcares

[H ₂ SO ₄]	Tiempo de hidrólisis (horas)	Replicas	Absorbancia	Concentración de azúcares(g/mL)	Promedio
1%	4	1	0,127	0,017	0,021
		2	0,156	0,023	
		3	0,148	0,022	
	6	1	0,187	0,029	0,026
		2	0,154	0,023	
		3	0,180	0,028	
	8	1	0,130	0,018	0,020
		2	0,154	0,022	
		3	0,137	0,019	
2%	4	1	0,165	0,025	0,023
		2	0,158	0,235	
		3	0,147	0,021	
	6	1	0,212	0,034	0,028
		2	0,146	0,021	
		3	0,189	0,029	
	8	1	0,201	0,031	0,032
		2	0,205	0,032	
		3	0,206	0,033	
3%	4	1	0,202	0,032	0,033
		2	0,210	0,033	
		3	0,211	0,034	
	6	1	0,210	0,033	0,034
		2	0,211	0,034	
		3	0,213	0,034	
	8	1	0,212	0,033	0,033
		2	0,210	0,033	
		3	0,213	0,034	

Anexo B. Tabla de Hidrólisis ácida de desechos de fique: ensayos, absorbancia y concentración de azúcares

[H ₂ SO ₄]	Tiempo de hidrólisis (horas)	Replicas	Absorbancia	Concentración de azúcares(g/mL)	promedio
1%	4	1	0,178	0,027	0,028
		2	0,185	0,028	
		3	0,194	0,030	
	6	1	0,190	0,029	0,029
		2	0,173	0,026	
		3	0,202	0,032	
	8	1	0,187	0,029	0,028
		2	0,179	0,027	
		3	0,188	0,029	
2%	4	1	0,206	0,033	0,033
		2	0,215	0,034	
		3	0,212	0,034	
	6	1	0,201	0,032	0,034
		2	0,213	0,034	
		3	0,222	0,035	
	8	1	0,212	0,034	0,034
		2	0,220	0,035	
		3	0,211	0,034	
3%	4	1	0,228	0,037	0,037
		2	0,231	0,037	
		3	0,233	0,038	
	6	1	0,225	0,036	0,034
		2	0,220	0,035	
		3	0,209	0,033	
	8	1	0,225	0,036	0,036
		2	0,223	0,035	
		3	0,223	0,036	

Anexo C: Análisis de Varianza para hidrólisis de pupa de café

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Acido	0,00170141	2	0,000850704	0,72	0,4991
B:Tiempo	0,000160074	2	0,000080037	0,07	0,9345
INTERACCIONES					
AB	0,00180304	4	0,000450759	0,38	0,8180
RESIDUOS	0,021192	18	0,00117733		
TOTAL (CORREGIDO)	0,0248565	26			

Anexo D. Análisis de Varianza para hidrólisis de jugo de fique

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Acido	0,0000405185	2	0,0000202593	0,05	0,9546
B:Tiempo	0,000112519	2	0,0000562593	0,13	0,8795
INTERACCIONES					
AB	0,000140815	4	0,0000352037	0,08	0,9872
RESIDUOS	0,00782867	18	0,000434926		
TOTAL (CORREGIDO)	0,00812252	26			

Anexo E: Análisis de Varianza para la producción de ácido glutámico

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:glucosa	0,00179341	1	0,00179341	140,76	0,0070
B:Nitrogeno	0,000166507	1	0,000166507	13,07	0,0687
C:Hidrolizado	0,00104288	2	0,000521441	40,93	0,0239
INTERACCIONES					
AB	0,000664541	1	0,000664541	52,16	0,0186
AC	0,000107315	2	0,0000536575	4,21	0,1919
BC	0,000029715	2	0,0000148575	1,17	0,4617
RESIDUOS	0,0000254817	2	0,0000127408		
TOTAL (CORREGIDO)	0,00382985	11			

Anexo F. Pruebas de Múltiple Rangos de la producción de Aminoácido por fuente de carbono.

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Hidrolizado</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Fique	4	0,038	0,00178472	X
Café	4	0,05	0,00178472	X
Glucosa	4	0,060825	0,00178472	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
Café - Fique	*	0,012	0,0108598
Café - Glucosa		-0,010825	0,0108598
Fique - Glucosa	*	-0,022825	0,0108598

* indica una diferencia significativa.

Anexo G: Pruebas de Múltiple Rangos de la producción de ácido glutámico por concentración de Nitrógeno

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Nitrógeno</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
4	6	0,0458833	0,0014572 1	X
9	6	0,0533333	0,0014572 1	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
4 - 9		-0,00745	0,00886696

* indica una diferencia significativa.