

Evaluación del efecto de las fuentes de nitrógeno y estrategias de oxigenación sobre la formación de biomasa y ácido succínico durante la fermentación por lotes de *C. glutamicum* empleando hidrolizado de cáscaras de chontaduro.

Iria Paz^a, Yefrid Córdoba^a, Andrés Ceballos^a, Nelson Caicedo^a

^aDepartamento de ingeniería bioquímica, universidad Icesi, Santiago de Cali

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

RESUMEN

Palabras clave:

Ácido succínico

Fermentación anaerobia

Biorrefinamiento

C. glutamicum

Limitación de oxígeno

La producción de ácido succínico a partir de la acción metabólica de *C. glutamicum* empleando como fuente de carbono los azúcares simples provenientes del aprovechamiento de las cáscaras de chontaduro, lo hemos planteado como un elemento de un esquema de biorrefinamiento de este residuo agroindustrial propio del Valle del Cauca. En el departamento de Ingeniería Bioquímica de la Universidad Icesi se han desarrollado investigaciones orientadas a la validación de este esquema, no obstante, este bioproceso presenta restricciones cinéticas en la etapa de producción de biomasa bacteriana debido a los altos requerimientos de oxígeno del microorganismo, así mismo, los rendimientos asociados a la producción de ácido succínico resultan ser muy bajos comparados con los obtenidos de ácido láctico. Por ello, en este estudio se evaluó sulfato de amonio, extracto de levadura e hidrolizado del gluten del maíz llamado Nutribrew 5050® como fuentes de nitrógeno en el crecimiento de *C. glutamicum* realizando monitoreo de la actividad respiratoria para cada una de las formulaciones de medio. Posterior a este proceso se estudiaron dos estrategias de oxigenación del medio de cultivo para la etapa de bioaumentación y la adición de bicarbonato de sodio para aumentar los rendimientos de ácido succínico en una segunda etapa. Así pues, se concluyó que el medio que presentaba mejor desempeño en el crecimiento del microorganismo estaba compuesto por las tres fuentes de nitrógeno usadas con un aporte igualitario de este nutriente, también se encontró que la oxigenación del medio a través de una estrategia de pulsos contribuyó a evitar la limitación del oxígeno bajo las condiciones evaluadas, obteniendo un rendimiento máximo de biomasa (X) base sustrato (glucosa, G) (Y_{xg}) de 0.53 g/g. A su vez, con una concentración de 12 g/L de bicarbonato de sodio se obtienen rendimientos de ácido succínico y láctico base glucosa de 0.06 y 0.38 gramos del ácido por gramo de glucosa respectivamente. Esto demuestra que se puede fijar carbono, pero prevalece la formación de ácido láctico sobre el ácido succínico.

1. Introducción

El ácido succínico es un compuesto de gran utilidad, debido a su potencial como precursor de químicos de interés en las industrias farmacéutica, alimentaria, cosmética y agrícola[1], tales como solventes, polímeros biodegradables, bioplásticos y alimentos, los cuales han presentado una creciente demanda en su producción por lo que se prevé que el consumo mundial de ácido succínico aumente [2].

El método mayormente empleado para la producción del ácido succínico es a través de rutas petroquímicas a partir de butano mediante la reducción electrolítica de anhídrido o ácido maleico[3]. Sin embargo, el aumento de la generación de dióxido de carbono, el agotamiento de recursos no renovables como el petróleo[4], el bajo rendimiento y la pureza del ácido, y los costos de producción[3] han impulsado la

búsqueda de alternativas para la producción de ácido succínico con viabilidad económica y amigable con el medio ambiente [5].

Las biorrefinerías se plantean como una opción de proceso atractiva para la producción de diversos compuestos como combustibles, solventes, plásticos y alimentos a partir de residuos de biomasa lignocelulósica[6], donde frutos como el chontaduro (*Bactris gasipaes*), tienen potencial de ser usados como materia prima. Este es un fruto tradicional de la región Pacífica de Colombia, el cual tiene dentro de sus productores al Valle del Cauca con volumen de producción de 690 toneladas para el año 2020[7]. De aquí, cerca de 76 toneladas/año corresponden a las cáscaras de este fruto posterior a su procesamiento industrial y/o consumo[8], las cuales generalmente se depositan para su descomposición en fuentes de agua o suelo[9]. No obstante, estas cáscaras presentan un contenido de carbohidratos aproximado de 63% [10], por lo que la aplicación de una hidrólisis enzimática a este residuo agroindustrial permitiría aprovechar los azúcares simples presentes en él. Por este motivo, en el departamento de Ingeniería Bioquímica de la Universidad Icesi se han desarrollado en los últimos años estudios enfocados en la producción de ácido succínico empleando como agente de biotransformación *C. glutamicum* a partir de azúcares simples provenientes de la hidrólisis enzimática de las cáscaras de chontaduro. Sin embargo, en estos estudios, no se ha logrado determinar la fuente de nitrógeno que favorece en mayor medida el crecimiento de *C. glutamicum* y a su vez, esta etapa de bioaumentación se ha visto limitada por oxígeno, inclusive en aquellos medios que muestran una mayor actividad metabólica[11]. Esto es debido a la alta demanda de oxígeno por parte del microorganismo durante su crecimiento[12].

Por ende, para la etapa de bioaumentación de esta bacteria se hace necesario el suministro de oxígeno gaseoso en lugar de aire como un modo de garantizar la mayor disponibilidad de este nutriente en el medio[13]. Adicionalmente se ha comprobado que el rendimiento de producción de ácido succínico es bajo comparado con el de ácido láctico en una estrategia de fermentación anaerobia[14]. Pero que estos pueden ser incrementados a través de la adición de bicarbonato al medio, debido a que la presencia de bicarbonato permite la activación in vivo de la regeneración de NAD durante la ruta metabólica empleada por la bacteria para la transformación de la glucosa en piruvato, tal y como se aprecia en la **Figura 1**, donde se observa las posibles rutas metabólicas que puede tomar la glucosa. A su vez, Okino, et al[15], reporta que el bicarbonato en el medio mejora los rendimientos de ácido succínico respecto al ácido láctico, obteniendo mejores resultados cuando se usan concentraciones de bicarbonato cercanas a 12 g/L.

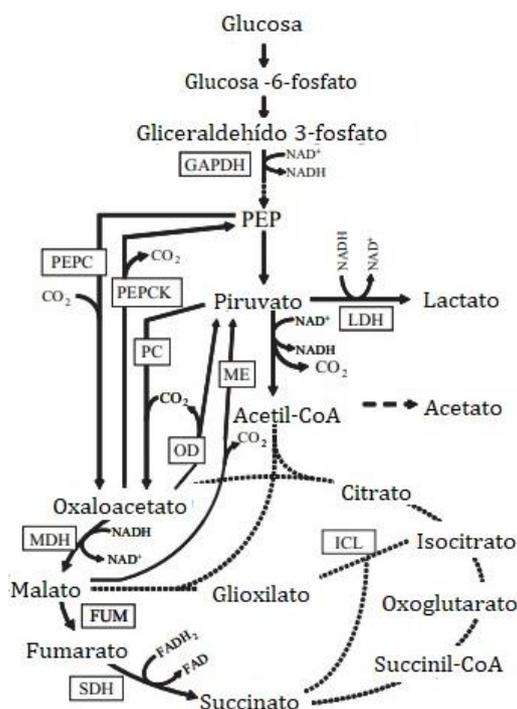


Figura 1. Ruta metabólica de *C. glutamicum* en condiciones de privación de oxígeno. Los recuadros indican las enzimas relevantes. LDH = Lactato deshidrogenasa; PEPC = fosfoenolpiruvato carboxilasa; PC = piruvato carboxilasa; PEPCK = fosfoenolpiruvato carboxicinasa; OD = oxaloacetato descarboxilasa; FUM = fumarasa; SDH = succinato deshidrogenasa; ICL = isocitrato liasa. Modificado de: Metabolic analysis of

Corynebacterium glutamicum during lactate and succinate productions under oxygen deprivation conditions [16]

Por todo lo anterior, el presente trabajo investigativo evaluó el efecto de tres diferentes fuentes de nitrógeno por separado y mezclas mediante el seguimiento de la actividad respiratoria, seguido de la determinación de la estrategia de oxigenación en un reactor de tanque agitado requerida para llevar a cabo la bioaumentación de *C. glutamicum* sin limitación de oxígeno, así mismo, se aplicó una estrategia de desoxigenación posterior al mismo cultivo *in-vitro* para favorecer la producción de ácido succínico.

2. Materiales y métodos

2.1. Microorganismo

La cepa de *Corynebacterium glutamicum* (ATCC 15940™)[17] empleada a lo largo de esta investigación, fue suministrada por la colección del Departamento de Ingeniería Bioquímica de la Universidad Icesi. Las células liofilizadas fueron reactivadas en un medio líquido nutritivo TGY modificado con peptona (5 g/L extracto de levadura, 1 g/L K₂HPO₄, 5 g/L peptona, 1 g/L glucosa) y cultivadas en un shaker (Unimax 1010) a una temperatura de 33°C con una agitación de 120 rpm durante 18 horas. La biomasa fue recuperada mediante centrifugación a 4500 rpm durante 10 minutos a 4°C y posteriormente resuspendida en 15 mL de solución salina (0,9% v/v).

2.2. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la velocidad de transferencia de oxígeno de *C. glutamicum* en fermentaciones por lotes

El medio de cultivo para la etapa de fermentación se definió empleando la siguiente composición: hidrolizado de cáscaras de chontaduro 47 g/L (nutriente limitante), KH₂PO₄ 3 g/L, K₂HPO₄ 1.5 g/L, NaCl 1 g/L, MgCl₂ 0.3 g/L, CaCl 0.3 g/L, MgSO₄·7H₂O 6 mg/L, NaH₂PO₄·H₂O 1.6 g/L, FeCl₃ 3.6 g/L, ZnSO₄ 4 g/L, MnSO₄ 4.2 g/L, vitaminas B12, B6, B1, B5 y Biotina todas a 50 µg/L[11], con modificaciones en este estudio en las fuentes de nitrógeno, donde se evaluaron sulfato de amonio (21%N), extracto de levadura (12%N), NUTRIBREW 5050 (Ingredion©) (5.67%N) y una mezcla de ellos con un aporte proporcional de nitrógeno, tal y como se indica en la **Tabla 1**, donde se muestran las concentraciones requeridas de cada una de las fuentes de nitrógeno para cada medio. Estas concentraciones fueron calculadas teniendo en cuenta el porcentaje de nitrógeno que aporta cada fuente, fijando que el aporte de nitrógeno en todos los medios fuera de 4.75 g/L. Las fuentes de nitrógeno evaluadas en esta investigación fueron escogidas de acuerdo con aquellas reportadas como asimilables por parte del microorganismo y en el caso particular del Nutribrew 5050, su evaluación fue resultado del interés por implementar fuentes alternativas de macronutrientes, pues es una proteína proveniente del gluten del maíz.

Con respecto al hidrolizado de cáscaras de chontaduro, su contenido de azúcares totales es de 233.91 g/L entre glucosa (216.64 g/L), fructosa (17.27 g/L) y arabinosa (1.17 g/L). No obstante, debido a que la glucosa representa el 92.6% del azúcar total [11], para este estudio, la cantidad de hidrolizado requerido para los medios se calculó con base únicamente en la concentración de glucosa presente en él.

Tabla 1. Concentraciones de las fuentes de nitrógeno para cada uno de los medios

	Concentración			
	(g/L)			
	Medio 1	Medio 2	Medio 3	Medio 4
Nutribrew 5050	83.77	-	-	27.92
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	22.4	-	7.46
Extracto de levadura	-	-	39.58	13.19

La fuente de carbono, fuentes de nitrógeno (excepto NUTRIBREW 5050) y sales, se prepararon por separado empleando una solución tampón de fosfato 0.8 M a un pH de 7.3. La preparación de la solución del NUTRIBREW 5050 se realizó mediante la adición gradual del componente en agua tipo II en baño maría a 95°C con agitación manual continua. Todas las soluciones madre se esterizaron en autoclave durante 60 min

a 121°C y 15 psi. Las vitaminas, por su parte, se solubilizaron juntas y esterilizaron mediante filtración (0.22 µm). Posterior a la esterilización, todas las soluciones fueron mezcladas.

El sistema empleado para llevar a cabo las fermentaciones para la definición del medio de cultivo fue el Shaker RAMOS®, el cual cuenta con ocho matraces Erlenmeyer de 250 mL que permiten el seguimiento de la actividad respiratoria[18], mediante la estimación de la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR)[19].

Las condiciones establecidas para las fermentaciones fueron 10 mL de volumen de trabajo, inoculado con 1 mL de suspensión de células para alcanzar una concentración inicial de 0.5 g/L, flujo de aire de 20 mL/min (2vvm), temperatura de 33°C, pH inicial 7.3 ajustado con hidróxido de sodio 8M, agitación de 200 rpm durante 49 horas.

2.3. Formación de biomasa de *C. glutamicum* y producción de ácido succínico en reactores de tanque agitado bajo estrategia batch.

2.3.1. Desarrollo de inóculo

El desarrollo de inóculo de *C. glutamicum* se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 100 mL del medio convencional modificado para los requerimientos del microorganismo[11] (Véase **Tabla 2**). Estos cultivos fueron incubados a 33°C y 120 rpm durante 48 horas. El pH se ajustó inicialmente en 7.3 mediante la adición de NaOH 8 M.

2.3.2. Evaluación de estrategias de oxigenación en la etapa de bioaugmentación

En esta investigación, se aplicaron a los cultivos dos estrategias de oxigenación para la etapa de crecimiento de *C. glutamicum* buscando evitar la limitación por oxígeno durante las primeras 20 horas de fermentación, las cuales corresponden al tiempo donde la glucosa se agota por completo, siendo esta el índice de parada. Las estrategias se basaron en el flujo de alimentación y el perfil de suministro continuo o por pulsos. Las fermentaciones fueron llevadas a cabo en un biorreactor de tanque agitado autoclavable miniBio 500® (Applikon Biotechnology) [20] con 250 mL de volumen de trabajo, inoculado con 10 mL de una suspensión de células de *C. glutamicum* proveniente del desarrollo de inóculo con el fin de alcanzar una concentración inicial entre 0.5-1 g/L. El medio empleado para la fermentación se presenta en la **Tabla 2**, que corresponde al medio escogido luego de la evaluación de las fuentes de nitrógeno.

El pH se controló automáticamente en 7.3 con la adición de ácido fosfórico 10% p/p o hidróxido de amonio 8 M mediante bombas peristálticas, medido con el sensor de pH AppliSens® de Applikon Biotechnology. La temperatura se estableció en 33°C y se controló automáticamente con una celda Peltier. Se realizó el seguimiento del oxígeno disuelto con DO2-sensor AppliSens® calibrado al 100% con un flujo de aire de 500 mL/min, 1000 rpm y con la temperatura y pH controlado, con el medio sin células hasta que el oxígeno disuelto se estabilizó, este punto fue establecido como la saturación. Durante el crecimiento se ejerció un control automático de este parámetro en 80% de saturación con variaciones en la velocidad de agitación en un rango de 200 a 1000 rpm.

En la estrategia de oxigenación continua se estudiaron los flujos de alimentación de oxígeno de 0.3 y 0.5 L/min, mientras que para la estrategia mediante pulsos los flujos evaluados fueron de 0.1 y 0.3 L/min. Cabe aclarar que el suministro de pulsos se realizó acorde a los requerimientos de oxígeno del microorganismo, por lo cual, los pulsos se realizaron cada minuto durante 30 segundos. Por otra parte, los flujos se determinaron acorde a los límites del sistema, donde los flujos de 0.1 y 0.5 L/min corresponden a los flujos mínimo y máximo respectivamente, permitidos por el sistema de fermentación.

Tabla 2. Composición de los medios de cultivo

Componentes del medio		Concentración		
		Desarrollo de inóculo	Fermentación	
Fuentes de carbono	Glucosa	30	-	g/L
	Hidrolizado de cáscaras de chontaduro	-	47*	g/L
Fuentes de nitrógeno	Nutribrew	-	29.65	g/L
	Extracto de levadura	39.58	13.19	g/L
	(NH ₄) ₂ SO ₄	-	7.46	g/L

Sales	KH ₂ PO ₄	3	3	g/L
	K ₂ HPO ₄	1.5	1.5	g/L
	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	1.6	1.6	g/L
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	6	6	mg/L
	NaCl	1	1	g/L
	CaCl ₂	0.3	0.3	g/L
	FeCl ₃	3.6	3.6	mg/L
	ZnSO ₄	4	4	mg/L
	MnSO ₄	4.2	4.2	mg/L
Vitaminas	B12	50	50	μg/L
	B6	50	50	μg/L
	B1	50	50	μg/L
	B5	50	50	μg/L
	Biotina	50	50	μg/L

*Calculado con la concentración de glucosa presente en el hidrolizado

2.3.3. Producción de ácido succínico

Después de finalizada la etapa de crecimiento de biomasa, en los mismos sistemas de fermentación para los cuales no se presentó limitación de oxígeno en la etapa de bioaumentación, se suspendió el suministro de oxígeno por completo, se mantuvo un control automático de pH en 7.3, temperatura en 33°C y agitación constante en 600 rpm. En esta etapa se usó bicarbonato de sodio a una concentración de 12 g/L y glucosa a 20 g/L, adicionadas al medio al inicio de la condición de anaerobiosis.

2.4. Métodos analíticos

La concentración de biomasa fue determinada mediante una curva de calibración en peso seco vs absorbancia a una longitud de onda de 600 nm, medida en espectrofotómetro Eppendorf BioSpectrometer Basic. Para lograr separar la biomasa, se requirió previo a la medición, realizar una centrifugación a 4500 rpm durante 10 minutos a 4°C para retirar el medio exhausto de las capas de biomasa y NUTRIBREW, identificadas previamente por microscopía (Véase **Figura 22**), posteriormente se resuspendió la capa correspondiente a la biomasa en solución salina (0.9% v/v).

Para la determinación de la concentración de glucosa y los ácidos orgánicos, estos fueron medidos mediante UHPLC (Thermo Scientific Ultimate 3000) con una columna Aminex® HPX-87-H (300 mm x 7.8 mm). La fase móvil fue agua levemente acidificada (ácido sulfúrico 0,005 M) con un flujo de 0,6 mL/min con un volumen de inyección de 10 μL.

El seguimiento a la concentración de carbonato en el medio se realizó mediante un método cualitativo empleando tiras de ensayo de Carbonate Hardness Test de Merck.

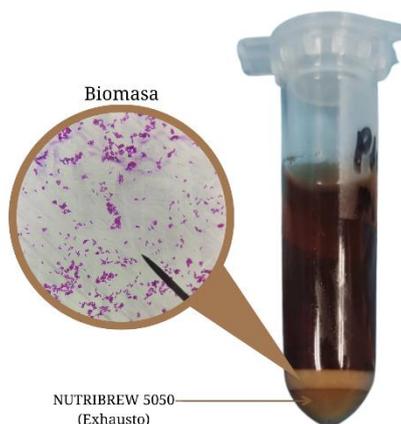


Figura 22. Identificación de las capas correspondientes a biomasa (superior) y NUTRIBREW 5050 (inferior).

2.5. Determinación de rendimientos

Los rendimientos de biomasa/glucosa (Y_{xg}), succínico/biomasa (Y_{sx}), láctico/biomasa (Y_{lx}), succínico/glucosa (Y_{sg}) y láctico/glucosa (Y_{lg}) fueron calculados teniendo en cuenta las mediciones de biomasa, glucosa y ácidos orgánicos ya realizadas. Para el cálculo del rendimiento de biomasa, solo se realizó la medición de biomasa al inicio y al final de la fermentación por la interferencia que presenta el Nutribrew 5050

3. Resultados y discusión

3.1. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la velocidad de transferencia de oxígeno de *C. glutamicum* en fermentaciones tipo batch.

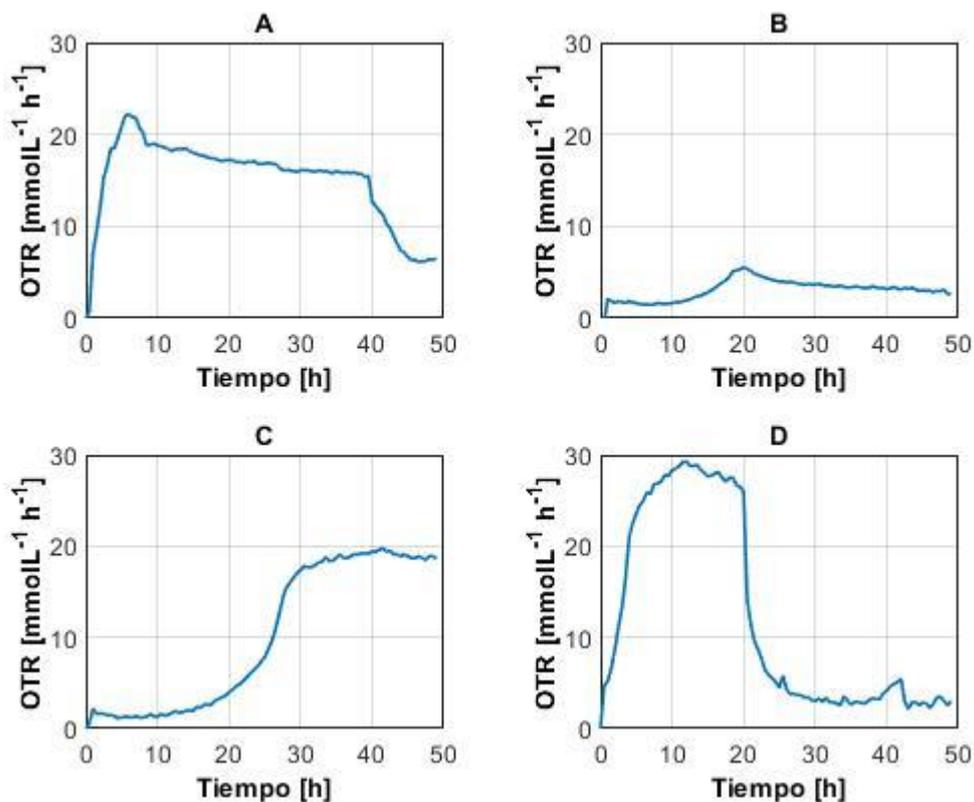
Como se puede observar en la

Gráfica 1, la cual da cuenta de las variaciones de la OTR con respecto a las fuentes de nitrógeno, la OTR al inicio de la fermentación es cercana a 0 y aumenta conforme se activa el metabolismo del microorganismo, con una adaptación rápida en las primeras 5 horas para el Nutribrew 5050 y para el medio que contempla la mezcla de las tres fuentes de nitrógeno (

Gráfica 1 A y D), gradual para el extracto de levadura (

Gráfica 1 C), y con un orden de magnitud menor para el sulfato de amonio (

Gráfica 1 B) alcanzando su pico pasadas las 20 horas con 5 mmol/L/h de OTR, mientras que los valores máximos para el Nutribrew 5050, extracto de levadura y la mezcla de las tres fuentes de nitrógeno son 22.2, 19.8 y 29.3 mmol/L/h respectivamente.



Gráfica 1 Variación de la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR, siglas en inglés) a lo largo del tiempo como variable de respuesta para la evaluación de diferentes fuentes de nitrógeno: (A) Nutribrew 5050, (B) sulfato de amonio, (C) extracto de levadura y (D) mezcla de las tres fuentes de nitrógeno.

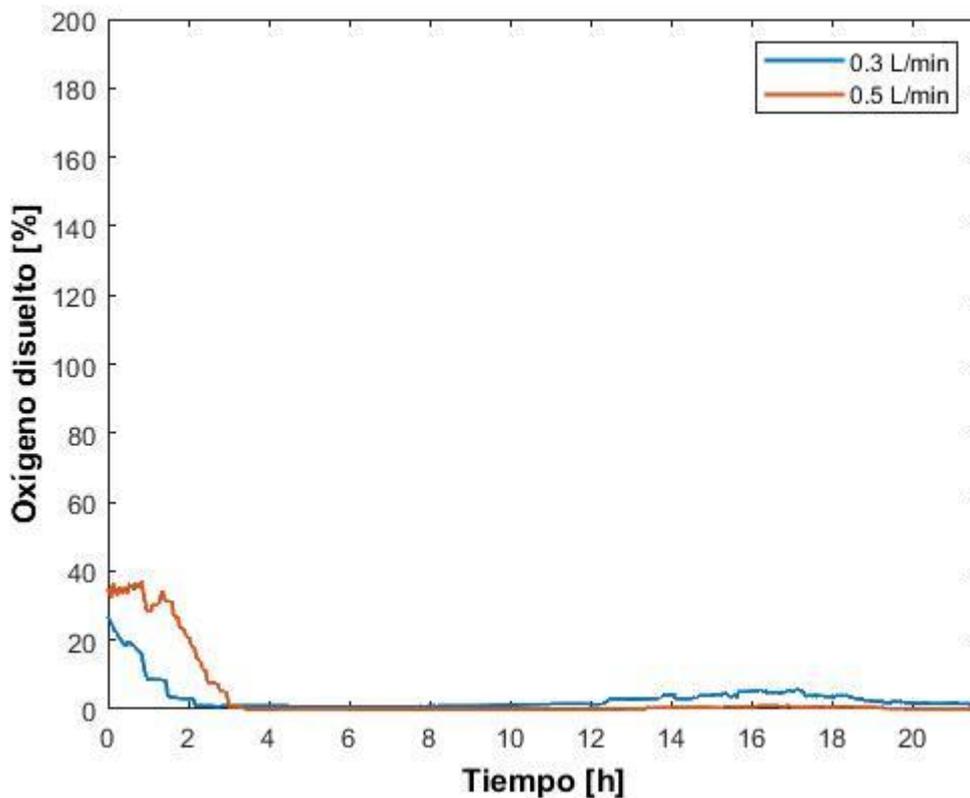
El tiempo en el cual el metabolismo del microorganismo empieza a disminuir es diferente para cada una de las fuentes de nitrógeno, correspondiente a 6.5, 20.5 y 13 horas para el Nutribrew 5050, sulfato de amonio y la mezcla de los tres componentes respectivamente, mientras que el extracto de levadura, hasta la

finalización del proceso se mantuvo en una condición de crecimiento limitado, indicando la baja asimilación de alguno de los nutrientes del medio. Así mismo, se evidencia una disminución paulatina en la OTR hasta las 40 horas para el Nutribrew 5050, el cual coincide con el perfil característico para la limitación por un sustrato que puede atribuirse a la misma fuente de nitrógeno, según lo reportado por Anderlei y Büchs [21]. Por su parte, la mezcla de las tres fuentes de nitrógeno presenta una disminución gradual de la OTR hasta las 20 horas de fermentación y una caída drástica para mantenerse alrededor de 3 mmol/L/h hasta el final de la fermentación, esto es consistente con el perfil de OTR cuando se presenta limitación por oxígeno, sin embargo, esta limitación es por un periodo corto de tiempo y evidencia una asimilación rápida por parte de *C. glutamicum* desde la etapa de adaptación al medio.

Con esto se evidencia la preferencia del microorganismo por fuentes orgánicas complejas como lo es el Nutribrew 5050 en su interacción con el sulfato de amonio y extracto de levadura. Ahora bien, al comparar los tiempos de agotamiento de los nutrientes reportados por Botero y García[11]. se puede observar una diferencia considerable, pues el tiempo de fermentación para la fuente de nitrógeno con mejor rendimiento (extracto de levadura) es de 40 horas, duplicando el tiempo de agotamiento obtenido para la mezcla de las tres fuentes de nitrógeno, evaluada en este estudio. Es por esto por lo que el medio escogido para evaluar las estrategias de oxigenación en la etapa de crecimiento de *C. glutamicum* es el medio 4, que corresponde a una mezcla de las tres fuentes nitrogenadas evaluadas, descrito en la **Tabla 2**.

3.2. Impacto del perfil de suministro y flujo de oxígeno en el rendimiento de producción de biomasa

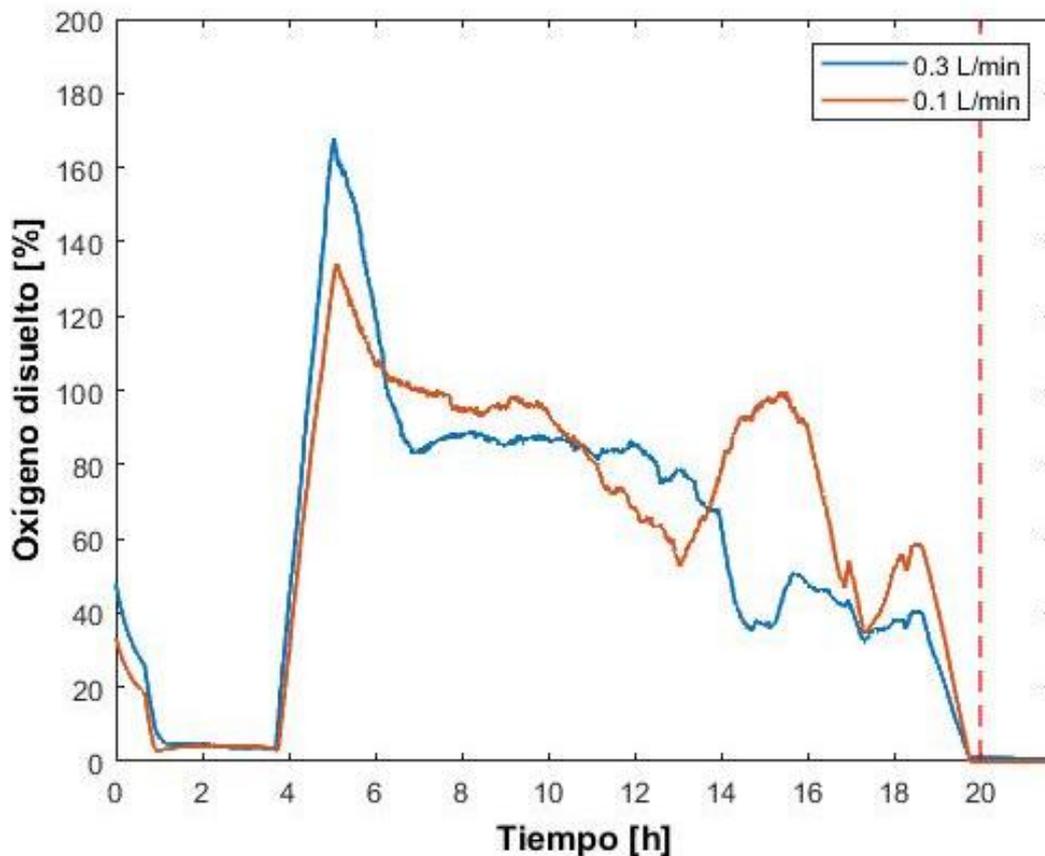
Teniendo en cuenta que el flujo de 2 vvm de aire para el crecimiento de *C. glutamicum* no fue suficiente para suplir los requerimientos de oxígeno del microorganismo, se realizó la aplicación de un flujo constante de oxígeno (**Gráfica 2**) y una estrategia de pulsos (**Gráfica 3**) con diferente valor de caudal entre cada uno de ellos, buscando que el oxígeno disuelto no llegara a valores por debajo de 30% de saturación y garantizar la disponibilidad de este nutriente para el microorganismo.



Gráfica 2. Perfil de porcentaje de oxígeno disuelto a lo largo de la fermentación de *C. glutamicum* con estrategia de oxigenación de flujo continuo de 0.3 L/min y 0.5 L/min

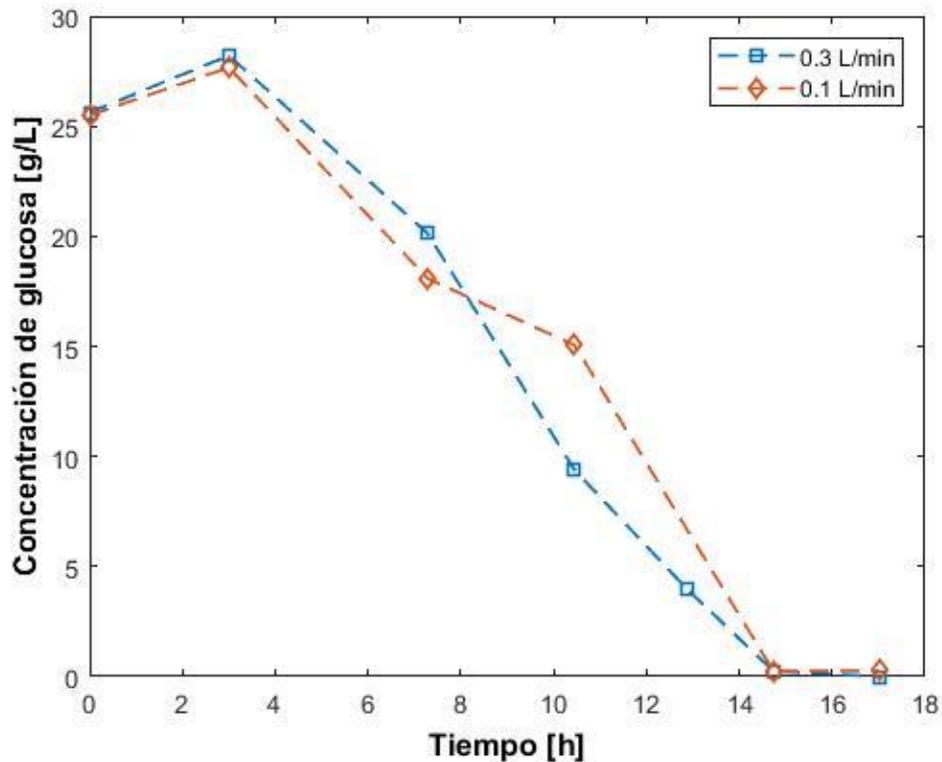
Como se puede observar en la **Gráfica 2**, el oxígeno disuelto inicia con un valor de saturación de 34.5 y 27% para los flujos de 0.5 y 0.3 L/min respectivamente, en el momento en el cual se inician las fermentaciones mediante la inoculación de estas, el oxígeno disuelto inmediatamente disminuye, pero se retrasa la caída de oxígeno en la fermentación con el mayor flujo correspondiente a los 0.5 L/min. Sin embargo, el suministro de este gas, según la **Gráfica**, no generó un efecto positivo en el aumento de la saturación de oxígeno disuelto debido a que se ha reportado que la presencia de sólidos suspendidos afecta la transferencia de oxígeno[22], pues se puede observar que desde las 3 horas de fermentación el sistema se limitó por oxígeno, por este efecto, la agitación mediante la acción del control se mantuvo en 1000 rpm durante toda esta fase de la fermentación hasta llegar a las 13 horas de proceso, en este momento, el aumento en la saturación de oxígeno disuelto da cuenta de una disminución en la demanda de oxígeno en el sistema, y por lo tanto, agotamiento en la glucosa, nutriente limitante para esta etapa. Por las fluctuaciones presentadas, la fermentación se realizó hasta las 20 horas de proceso, y en ese momento se procedió a realizar la adición de bicarbonato de sodio y glucosa para iniciar con la producción de ácido succínico en la etapa anaerobia[14].

Según el comportamiento del oxígeno disuelto en la estrategia de suministro por pulsos presentado en la **Gráfica 3**, es posible observar que el oxígeno disuelto durante las primeras 3.9 horas de proceso se mantuvo por debajo de 10% con la aireación, luego de esto, se inició con el suministro de oxígeno por pulsos en los flujos reportados anteriormente, así se garantizó que durante el crecimiento de biomasa no se limitara por oxígeno el cultivo, hasta las 20 horas en las cuales se detuvo esta etapa del proceso debido al agotamiento de glucosa en el medio, como se observa en la **Gráfica 4**.



Gráfica 3. Perfil de porcentaje de oxígeno disuelto a lo largo de la fermentación de *C. glutamicum* con estrategia de oxigenación por pulsos de 0.3 L/min y 0.5 L/min, la línea vertical punteada indica la adición de bicarbonato y glucosa para inicio de la etapa anaerobia.

Durante la bioaumentación se realizó seguimiento a la glucosa en el medio, pues la ausencia de este nos indicaba el cambio de etapa en el bioproceso, así como se evidencia en la **Gráfica 4** esta se agotó a las 15 h de fermentación.



Gráfica 4. Variación de la concentración de glucosa para la estrategia de pulsos.

Los rendimientos de biomasa/glucosa (Y_{xg}) obtenidos en la etapa de bioaumentación son presentados en la **Tabla 3**, donde se evidencia un mayor rendimiento en la estrategia de fermentación por pulsos con el flujo de 0.3 L/min, esto es concordante con el metabolismo anaerobio facultativo de *C. glutamicum*[23] pues en las fermentaciones con flujo continuo, donde se presentó limitación por oxígeno se evidencian rendimientos menores con respecto a la estrategia de oxigenación por pulsos que no se limitó, ya que esta reportado que *C. glutamicum* produce ácidos orgánicos en condiciones anaerobias [24] y el flujo de carbono va a la formación de estos ácidos, por lo tanto, disminuye el uso de la fuente de carbono en la formación de biomasa. Así pues, según los datos obtenidos, la oxigenación por pulsos presenta un efecto positivo sobre el rendimiento de biomasa a partir del hidrolizado de cáscaras de chontaduro.

Los rendimientos obtenidos en esta investigación son mayores comparados con los reportados por Botero y García [25] en su estudio de evaluación de medios de cultivos con aprovechamiento de los azúcares presentes en el hidrolizado de cáscaras de chontaduro, y esto es acorde a que se presentó limitación de oxígeno en los experimentos realizados en su estudio, pues su rendimiento Y_{xg} más alto es de 0.29 g/g, además de que el consumo de la glucosa presente se dio en un tiempo de 40 h, el cual corresponde a la fuente de extracto de levadura en contraste con nuestro mayor rendimiento que es de 0.53 g/g, en un tiempo de consumo de 20 h empleando la mezcla de las tres fuentes nitrogenadas.

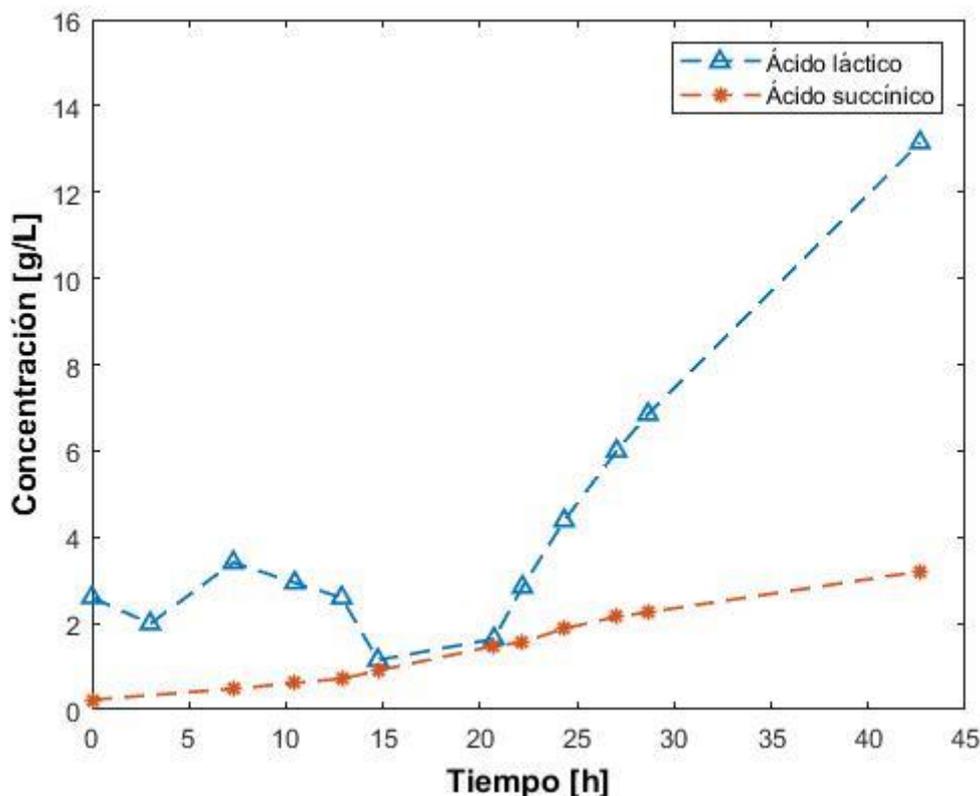
Tabla 3. Concentraciones finales y rendimientos de la etapa de bioaumentación para las estrategias de oxigenación de flujo continuo y por pulsos.

Estrategia	Flujo [L/min]	Concentración de biomasa [g/L]		Concentración de glucosa [g/L]		Volumen [L]		Y_{xg} (gbiomasa/gglucosa)
		Inicial	final	inicial	final	inicial	final	
Continuo	0.3	0.8	4.93	28.36	0	0.25	0.275	0.16
	0.5	0.8	10.7	25.16	0	0.25	0.277	0.41
Pulsos	0.1	0.5	10.7	25.5	0.2	0.25	0.286	0.44

3.3. Producción de ácidos orgánicos suplementado con bicarbonato de sodio en fermentación batch

Acorde a los resultados obtenidos en la etapa de bioaumentación, la producción de los ácidos orgánicos se llevó a cabo a partir del cultivo que no presentó limitación de oxígeno y en el que se obtuvo mayor rendimiento de biomasa, es decir, la fermentación en la cual se usó la estrategia de oxigenación por pulsos a un flujo de 0.3 L/min.

En la **Gráfica 3** se aprecia que al comienzo de la fermentación existe una concentración de 2.84 g/L de ácido láctico, esto debido a que el medio, principalmente el jarabe del hidrolizado de cáscaras de chontaduro presenta este ácido en su composición [11]. Durante las primeras 20 horas de la fermentación, correspondientes a la etapa de bioaumentación de *C. glutamicum*, se observa que el ácido láctico disminuye, lo que sugiere el consumo de este ácido por parte del microorganismo, esto se apoya de estudios que indican que *C. glutamicum* es capaz de crecer en la fase aeróbica empleando ácido láctico como fuente de carbono[26], lo que coincide con el tiempo en el cual hay agotamiento de glucosa, esto podría indicar que el microorganismo está empleando el ácido láctico y la glucosa presente en el hidrolizado de cáscaras de chontaduro como fuentes de carbono para su crecimiento. Comenzada la etapa de anaerobiosis (a partir de las 20 horas), se evidencia el incremento drástico en la producción de ácido láctico, siendo este mucho mayor que el ácido succínico, a pesar de la tendencia creciente de este desde el comienzo de la fermentación. A su vez, se observa que el ácido succínico se produce durante la etapa de bioaumentación y no se consume como ocurre con el láctico, de aquí, que se comprueba lo que estudios previos han demostrado, y es que *C. glutamicum* produce ácido succínico incluso durante su crecimiento en condiciones aerobias[27].



Gráfica 3. Concentración de ácido succínico y láctico en el tiempo para la estrategia de oxigenación por pulsos.

Por último, a pesar de la suplementación del medio con carbonato para la etapa anaerobia con una concentración inicial de 12 g/L y de un evidente consumo de este por parte de *C. glutamicum* al obtener al final de la fermentación una concentración de 2 g/L, los rendimientos asociados a la producción de ácido láctico son mucho mayores que los del ácido succínico, siendo estos 0.38 g lactico/g glucosa y 0.06

gsuccinico/gglicosa respectivamente. Atribuido a la desviación de flujos de carbono que se van para la formación de ácido láctico como consecuencia de la acción de la enzima lactato deshidrogenasa, la cual en estudios para la producción de ácido succínico empleando *C. glutamicum* se ha eliminado el gen que codifica para esta enzima, obteniendo así mayores rendimientos de ácido succínico respecto al ácido láctico[28]. Aunque esta es una alternativa que implica modificación genética, se puede evaluar la posibilidad de emplear una cepa de *C. glutamicum* modificada para la producción de ácido succínico bajo la estrategia de fermentación propuesta en este artículo.

4. Conclusiones y recomendaciones

Se evidenció la preferencia de la mezcla de fuentes nitrogenadas por parte de *C. glutamicum* en su crecimiento. Además, se encontró que, con la estrategia de oxigenación por pulsos en biorreactores de tanque agitado, se evita la limitación por oxígeno en el crecimiento de biomasa de *C. glutamicum*, en el cual se presenta mayores rendimientos de biomasa con base a la glucosa, y menores tiempos de fermentación con el medio diseñado para aprovechar el residuo agroindustrial de la región. A su vez, se demostró el potencial del uso del jarabe de chontaduro como fuente de carbono para el crecimiento de *C. glutamicum* en una etapa de bioaumentación.

Por otro lado, se recomienda realizar un diseño de experimentos para evaluar diferentes concentraciones de carbonato y determinar su impacto en el rendimiento de ácido succínico. Así mismo, se sugiere la evaluación de nuevas composiciones del medio que permitan obtener rendimientos de biomasa iguales o mayores a los obtenidos en este estudio pero que, a su vez, no represente dificultades para la separación de esta, como ocurre en este caso con el Nutribrew 5050. Por último, en aras de aumentar los rendimientos de ácido succínico, se propone extender la etapa anaerobia posterior al agotamiento de la glucosa.

5. Agradecimientos

En primera instancia, agradecemos al Departamento de Ingeniería Bioquímica de la Universidad Icesi y a sus colaboradores por el apoyo y los recursos prestados para el desarrollo de esta investigación. Extendemos también un agradecimiento especial para la Ingeniera Bioquímica Claudia Sichel, por brindarnos su tiempo y dedicación como apoyo clave para el desarrollo de este proyecto. Por último, expresamos nuestra gratitud a nuestros tutores por ser una guía fundamental en esta investigación.

6. Bibliografía

- [1] "Optimización de la producción aerobia de ácido succínico y ácido málico a partir de glicerol utilizando cepas de *e. Coli* modificadas genéticamente - Dialnet." <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=284246> (accessed Jun. 12, 2022).
- [2] P. I. Omwene, Z. B. O. Sarihan, A. Karagunduz, and B. Keskinler, "Bio-based succinic acid recovery by ion exchange resins integrated with nanofiltration/reverse osmosis preceded crystallization," *Food and Bioproducts Processing*, vol. 129, pp. 1–9, Sep. 2021, doi: 10.1016/J.FBP.2021.06.006.
- [3] U. Uysal and H. Hamamcı, "Succinic acid production from cheese whey via fermentation by using alginate immobilized *Actinobacillus succinogenes*," *Bioresource Technology Reports*, vol. 16, p. 100829, Dec. 2021, doi: 10.1016/J.BITEB.2021.100829.
- [4] A. José, G. Oviedo, and F. Cabrera Mojica, "Optimización de un proceso de recuperación y purificación de ácido succínico producido por métodos fermentativos."
- [5] C. Eduardo Zuluaga Pulgarín Gabriel Jaime Vargas Betancur, "Diseño conceptual y simulación del proceso de producción de ácido succínico por *Actinobacillus succinogenes*," 2017.
- [6] H. Ohara, "Biorefinery," *Applied Microbiology and Biotechnology* 2003 62:5, vol. 62, no. 5, pp. 474–477, Jul. 2003, doi: 10.1007/S00253-003-1383-7.

- [7] Ministerio de agricultura, “Estadísticas Agronet.” <https://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/home.aspx?cod=1> (accessed Jul. 14, 2022).
- [8] “Encuesta nacional agropecuaria (ENA).” <https://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/agropecuario/encuesta-nacional-agropecuaria-ena#presentaciones-por-departamento> (accessed Jun. 17, 2022).
- [9] “Cáscara de chontaduro, ideal en concentrado para cerdos.” <https://www.agronet.gov.co/Noticias/Paginas/C%C3%A1scara-de-chontaduro,-ideal-en-concentrado-para-cerdos.aspx> (accessed Jun. 12, 2022).
- [10] A. de Correspondencia, J. Martínez-Girón, X. Rodríguez-Rodríguez, L. X. Pinzón-Zárate, and L. E. Ordóñez-Santos, “Transformación y Agroindustria Artículo de investigación científica y tecnológica,” *Corpoica Cienc Tecnol Agropecuaria*, vol. 18, no. 3, pp. 2500–5308, 2017, doi: 10.21930/rcta.vol18_num3_art:747.
- [11] L. Botero-Mejía, L. L. García-Camacho, A. Ceballos-Bermudez, and N. H. Caicedo-Ortega, “Medium design for the growth of *Corynebacterium glutamicum* using sugars from peach palm fruit peels biorefining,” *Electronic Journal of Biotechnology*.
- [12] F. Käß *et al.*, “Rapid assessment of oxygen transfer impact for *Corynebacterium glutamicum*,” *Bioprocess and Biosystems Engineering*, vol. 37, no. 12, pp. 2567–2577, Nov. 2014, doi: 10.1007/s00449-014-1234-1.
- [13] A. K. Kaboré, E. Olmos, M. Fick, F. Blanchard, E. Guedon, and S. Delaunay, “Aerobiosis–anaerobiosis transition has a significant impact on organic acid production by *Corynebacterium glutamicum*,” *Process Biochemistry*, vol. 52, pp. 10–21, Jan. 2017, doi: 10.1016/j.procbio.2016.10.007.
- [14] S. Okino, M. Inui, and H. Yukawa, “Production of organic acids by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 68, no. 4, pp. 475–480, Sep. 2005, doi: 10.1007/s00253-005-1900-y.
- [15] S. Okino, M. Inui, and H. Yukawa, “Production of organic acids by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 68, no. 4, pp. 475–480, Sep. 2005, doi: 10.1007/s00253-005-1900-y.
- [16] M. Inui, S. Murakami, S. Okino, H. Kawaguchi, A. A. Vertès, and H. Yukawa, “Metabolic analysis of *Corynebacterium glutamicum* during lactate and succinate productions under oxygen deprivation conditions,” *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, vol. 7, no. 4, pp. 182–196, 2004, doi: 10.1159/000079827.
- [17] “*Corynebacterium glutamicum* (Kinoshita et al.) Abe et al. - 15940 | ATCC.” <https://www.atcc.org/products/15940> (accessed Jul. 14, 2022).
- [18] T. Anderlei, W. Zang, M. Papaspyrou, and J. Büchs, “Online respiration activity measurement (OTR, CTR, RQ) in shake flasks,” in *Biochemical Engineering Journal*, 2004, vol. 17, no. 3, pp. 187–194. doi: 10.1016/S1369-703X(03)00181-5.
- [19] T. Anderlei, “Device for sterile online measurement of the oxygen transfer rate in shaking flasks,” 2001. [Online]. Available: www.e1sevier.com/1ocatelbej
- [20] “VERTEX.” https://www.vertex.es/biotecnologia/minibio_aplikon/ (accessed Jun. 12, 2022).
- [21] T. Anderlei, “Device for sterile online measurement of the oxygen transfer rate in shaking flasks,” 2001. [Online]. Available: www.e1sevier.com/1ocatelbej

- [22] D. B. Mills, R. Bar, and D. J. Kirwan, "Effect of solids on oxygen transfer in agitated three-phase systems," *AIChE Journal*, vol. 33, no. 9, pp. 1542–1549, Sep. 1987, doi: 10.1002/AIC.690330914.
- [23] J. A. Lee, J. H. Ahn, and S. Y. Lee, "Organic Acids: Succinic and Malic Acids," *Comprehensive Biotechnology*, pp. 172–187, Jan. 2019, doi: 10.1016/B978-0-444-64046-8.00159-2.
- [24] S. Wieschalka, B. Blombach, M. Bott, and B. J. Eikmanns, "Bio-based production of organic acids with *Corynebacterium glutamicum*," *Microbial Biotechnology*, vol. 6, no. 2, pp. 87–102, Mar. 2013. doi: 10.1111/1751-7915.12013.
- [25] L. Botero-Mejía, L. L. García-Camacho, A. Ceballos-Bermudez, and N. H. Caicedo-Ortega, "Medium design for the growth of *Corynebacterium glutamicum* using sugars from peach palm fruit peels biorefining," *Electronic Journal of Biotechnology*.
- [26] H. B. T. Khuat *et al.*, "Lactate production as representative of the fermentation potential of *Corynebacterium glutamicum* 2262 in a one-step process," *OUP*, vol. 78, no. 2, pp. 343–349, 2014, doi: 10.1080/09168451.2014.878219.
- [27] J. Pablo *et al.*, "Design of Culture Medium for the Production of Succinic Acid by using *Corynebacterium Glutamicum*," 2020.
- [28] S. Okino, R. Noburyu, M. Suda, T. Jojima, M. Inui, and H. Yukawa, "An efficient succinic acid production process in a metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* strain," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 81, no. 3, pp. 459–464, Dec. 2008, doi: 10.1007/s00253-008-1668-y.