

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA  
 Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

19 ES	11 NUMERO 478.969	10 A1
	22 FECHA DE PRESENTACION 27-3-1979	

Concedido el Registro de acuerdo  
 con los datos que figuran en la presente descripción y según el tenido de la Memoria adjunta.

**PATENTE DE INVENCION**

30 PRIORIDADES: 31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
35906/78 65380/78	28-3-1978 31-5-1978	Japón "

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL C12D 13/06; G01N 31/14	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISORIA
------------------------	--	-----------------------------------

64 TITULO DE LA INVENCION

"UN METODO PARA DETERMINAR LA CONCENTRACION DE UNA FUENTE DE CARBONO Y UN L-AMINOACIDO EN UN MEDIO DE CULTIVO"

71 SOLICITANTE (ES)

AJINOMOTO CO., INC.  
 (case A-440)

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

No. 5-8, Kyobashi 1 chome, Chuo-ku, Tokyo, Japón

72 INVENTOR (ES)

Haruo OBANA, Tadashi SHIRAKAWA, Motohiko HIKUMA, Takeo YASUDA, Isao KARUBE y Shuichi SUZUKI

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE

DON FERNANDO DE ELZABURU MARQUEZ (P.-71.480)

Jga

1 EXPLICACION DETALLADA DEL INVENTO

Este invento se refiere a un método para la determinación rápida, sencilla y cuantitativa de una fuente de carbono y un producto de fermentación en un medio de cultivo por medio de un electrodo microbiano.

5

En una ramificación de fermentación industrial tal como la fermentación de L-aminoácidos y la fermentación de SCP se aplica ampliamente para obtener una producción creciente un método de alimentación por el que se alimenta continuamente una fuente de carbono en el medio de cultivo, de modo que la concentración de la fuente de carbono en el medio se controla dentro de una concentración deseada durante la fermentación.

10

15

Con el fin de controlar exactamente la concentración de una fuente de carbono, es necesario una medida en línea (en el curso de la producción) de una fuente de carbono en un medio de cultivo, por consiguiente, se requiere un método para determinación rápida, sencilla y cuantitativa de una fuente de carbono.

20

De modo similar, un método que sea rápido, sencillo y cuantitativo para la determinación de un producto de fermentación, tal como el ácido L-glutámico en el medio de cultivo es también muy eficaz para controlar el proceso de fermentación, puesto que el tiempo de conclusión de la fermentación puede decidirse fácilmente.

25

De acuerdo con un método enzimático convencional que emplea una enzima, tal como invertasa y glucosa-oxidasa junto con un material colorante o un método de electrodo con enzimas que comprende un electrodo y enzima inmovilizada, pueden determinarse las fuentes de carbono no volá-

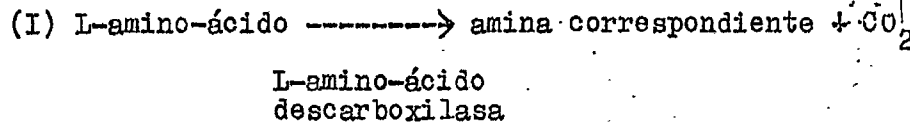
30

1 tiles tales como glucosa y sacarosa. Sin embargo, estos métodos  
2 todos convencionales no están adaptados para empleo en la  
3 determinación de fuentes de carbono no volátiles en un medio  
4 de cultivo, tal como un medio de cultivo que contiene  
5 especialmente melazas de caña de azúcar o remolacha como  
6 una fuente de carbono, que contienen un gran número de otros  
7 compuestos orgánicos. Por consiguiente, en la práctica, se  
8 emplea todavía un método convencional para determinar el  
9 poder reductor de un sacárido. Sin embargo, este método común  
10 no es satisfactorio para el propósito de las medidas  
11 en el curso de la producción puesto que este método común  
12 está muy afectado por las impurezas reductoras que coexisten  
13 generalmente en un medio de cultivo durante la fermentación.  
14 Por otra parte, se requieren etapas de hidrólisis  
15 complicadas de la fuente de carbono, si la fuente de carbono  
16 empleada no es un monosacárido.

17 Por consiguiente, por empleo de una cromatografía  
18 gaseosa común o un receptor semiconductor, pueden determinarse  
19 fuentes de carbono volátiles tales como metanol,  
20 etanol y ácido acético pero estos métodos son también insatisfactorios  
21 para la medida en el curso de la producción, puesto que una gran  
22 cantidad de impurezas orgánicas no volátiles contenidas en un medio  
23 de cultivo dañan la columna del aparato de cromatografía de gases  
24 haciendo imposible la determinación a largo plazo. Además, es demasiado  
25 inestable para el receptor semiconductor que ha de aplicarse para  
26 la medida en el curso de la producción.

27 Por otro lado, de acuerdo con el método de Warburg convencional o el  
28 método del autoanализador que determina la cantidad de dióxido de  
29 carbono gaseoso manométrica

1 o colorimétricamente, producido por la reacción (I) cata-  
 lizada por una L-amino-ácido-descarboxilasa tal como de  
 ácido L-glutámico- o L-lisina-descarboxilasa, derivada de  
 la calabaza, Esherichia coli, Bacterium cadaveris, puede  
 5 determinarse el producto de fermentación tal como el L-amino-  
 noácido.



10 Estos métodos comunes son de exactitud excelente pero no económicos puesto que ha de emplearse una enzima cara en tandas y no puede emplearse continuamente, y se requiere un aparato de determinación muy caro para el método del autoanalizador. Además, en todos los casos es necesario un procedimiento de filtración complicado para separar  
 15 las células microbianas del medio de cultivo antes de la determinación.

De acuerdo con el presente invento, se proporciona un método para una determinación rápida, sencilla y  
 20 cuantitativa de una fuente de carbono y un producto de fermentación en un medio de cultivo por medio de un electrodo microbiano.

(1) Método y aparato para determinar la fuente de carbono

25 El método para determinar una fuente de carbono de acuerdo con el presente invento comprende medir la velocidad de disminución de la corriente por un electrodo microbiano que comprende un electrodo sensible al oxígeno y una membrana para retener las células de microorganismos en un líquido acuoso. La disminución se origina por el consumo de oxígeno disuelto en el líquido por microorganismos  
 30

1 fijados durante la asimilación de la fuente de carbono en  
el líquido, y calcular la concentración de la fuente de car-  
bono de la velocidad de disminución de corriente, emplean-  
do la relación entre la concentración de la fuente de car-  
5 bono y la velocidad de la disminución de corriente.

En este método, los microorganismos fijados es-  
tán en contacto indirecta o próximamente con la membrana  
de diafragma de un electrodo sensible al oxígeno. Los mi-  
croorganismos fijados y el electrodo sensible al oxígeno  
10 forman juntos un electrodo microbiano.

Los microorganismos fijados empleados de acuerdo  
con el presente invento son aquellos que están inmoviliza-  
dos por atrapamiento de las células microbianas intactas  
entre una membrana de diafragma o el electrodo y una mem-  
15 brana de diálisis o una película sólida similar, o una mem-  
brana permeable a los gases; o pueden estar dispersados en  
una matriz sólida continua de un material que tiene las  
mismas propiedades tales como colágeno y otros polímeros  
naturales o en ciertos geles de resinas sintéticas conoci-  
das por sí mismas.  
20

Una membrana de diálisis o cuerpos sólidos simi-  
lares empleados de acuerdo con el presente invento son pre-  
feriblemente aquellos que son permeables a  $O_2$  y compuestos  
orgánicos en el líquido pero impermeables a las células  
25 microbianas atrapadas. Por ejemplo, son preferibles membra-  
nas de diálisis convencionales tales como celofán, membra-  
na de acetilcelulosa, y membrana semipermeable como filtro  
de Milipore (Marca Registrada de Milipore Ltd. Co.) y red  
de nylon. Sin embargo, cuando se emplea una fuente de car-  
bono volátil, debe emplearse una membrana permeable a los  
30

1 gases tal como Teflon poroso, "Silicone" (Marca Registra-  
da de Shinetsu-Kagaku Co., Inc.), membrana de polibutadie-  
no y polietileno que son permeables solamente a fuentes  
de carbono volátiles y O<sub>2</sub> gaseoso pero impermeables a  
5 otros compuestos orgánicos.

Los microorganismos empleados de acuerdo con el  
presente invento son aquellos que son capaces de consumir  
oxígeno disuelto en un líquido acuoso durante la asimila-  
ción de una fuente de carbono, con preferencia a otros ma-  
10 teriales orgánicos que pueden ser asimilados por los mi-  
croorganismos. Ejemplos de ellos son bacterias tales como  
Pseudomonas fluorescens, Staphylococcus aureus y Brevibac-  
terium flavum, levadura tal como Saccharomyces cerevisae,  
Tricosporon bracciae, y Torulopsis pintropesii, entre otros  
15 microorganismos.

Cuando se selecciona la cepa empleable para es-  
ta determinación, es más preferible usar una cepa de un  
microorganismo que sea útil para fermentación propiamente  
dicha y que tenga la capacidad antes mencionada.

20 Por ejemplo, para determinar el ácido L-glutámi-  
co, se emplea preferiblemente una cepa de Brevibacterium  
flavum ATCC 14067 que se emplea para fermentación del áci-  
do L-glutámico, para la determinación de fuentes de carbo-  
no tal como glucosa, fructosa, sacarosa o ácido acético  
25 en el medio de cultivo durante la fermentación del ácido  
L-glutámico.

Los microorganismos empleados de acuerdo con el  
presente invento para determinar la presencia de metanol  
en un medio de cultivo de fermentación de SCP con los que  
son capaces de asimilar metanol como una fuente de carbono  
30

1 y desarrollarse rápidamente. Por ejemplo, se emplean pre-  
feriblemente Methanomonus methanica, Pseudomonas methylo-  
2 trophia, Pseudomonas insuete, Achromobacter methanolophyla  
y Candida parapsilosis. El microorganismo se cultiva en  
condiciones aerobias a una temperatura en el intervalo de  
20 a 37°C durante 10 a 30 horas en un medio de cultivo  
convencional que contiene una fuente de carbono, una fuen-  
te de nitrógeno, un elemento nutriente secundario e iones  
inorgánicos. Las células microbianas se recogen luego cen-  
10 trifugando el caldo de cultivo, se lavan con agua y se al-  
macenan a baja temperatura.

El electrodo sensible al oxígeno empleado de  
acuerdo con el presente invento puede ser de cualquier ti-  
po convencional.

15 En la descripción siguiente, se hará referencia  
a modo de ejemplo a los dibujos que se acompañan.

La Figura 1 muestra un electrodo microbiano 10  
formado untando células húmedas intactas de un microorga-  
nismo sobre una membrana de diafragma 3 y cubriendo la ca-  
20 pa microbiana 1 así formada con una membrana de diálisis  
2 tal como una membrana de celofán para mantener los mi-  
croorganismos en su lugar. El electrodo consiste además  
en un cátodo de oro 4 y un ánodo de plata 5, un anillo  
de caucho 6 para fijar las membranas al electrodo, la so-  
25 lución de electrolito 7 (KCl), un alambre conductor 8 y  
una cubierta 9. En el electrodo mostrado en la Figura 1,  
los microorganismos pueden mantenerse entre las membranas  
2 y 3 en un soporte sólido, tal como un trozo de papel de  
filtro, que contiene una cantidad definida de células mi-  
crobianas intactas o pueden mantenerse en una matriz po-

1 límera tal como colágeno y un gel de poliacril-amida como  
una forma de microorganismos inmovilizados. Este método  
es preferible puesto que la cantidad de células intactas  
empleadas puede controlarse fácilmente y los electrodos  
5 microbianos así obtenidos tienen características uniformes.

Un ejemplo de un diagrama esquemático del siste-  
ma de determinación continuo del invento se ilustra en la  
Figura 2 o Figura 8.

En la Figura 2, se muestra un electrodo microbia-  
10 no 10, una cubeta de flujo 11, anillos de caucho 12, 12',  
para fijar el electrodo, el registrador 18, una entrada 16  
de suministro para la solución muestra con una solución  
vehículo, salida 17 para la solución residual, entrada 13  
para el aire insuflado, suministro 14 para la muestra, y  
15 depósito 15 para la solución vehículo que son todos eviden-  
tes.

En la Figura 8 se muestra otro sistema de deter-  
minación continuo que emplea también un electrodo microbia-  
no.

En este sistema, agua destilada o agua tampona-  
da saturada con oxígeno disuelto se alimenta en la cubeta  
de flujo 11 a un caudal constante durante la determinación  
de la corriente del electrodo 10 registrada. Después de  
que la corriente ha alcanzado un valor constante (denomi-  
25 nado la "corriente base" o "línea base"), la solución de  
muestra (medio de cultivo o caldo cultivado) del disposi-  
tivo de toma de muestras automático 14 se inyecta directa-  
mente en el sistema por el dispositivo de auto-toma de mues-  
tras a un caudal constante en un intervalo constante, se  
30 diluye haciendo fluir agua o agua tamponada, se satura con

1 oxígeno disuelto, y se introduce en la cubeta 11 y se agi-  
ta por el agitador magnético 20. La temperatura de la cube-  
ta de flujo 11 se mantiene por la camisa 19 a una tempera-  
tura constante en el intervalo de 15 a 30°C durante la de-  
5 terminación. Cuando la solución de muestra se introduce en  
la cubeta de flujo 11 y se pone en contacto con el electro-  
do microbiano 10, la corriente del electrodo que se regis-  
tra visualmente en el registrador 18 disminuye marcadamente  
con el tiempo hasta que alcanza un estado estacionario co-  
10 mo se ilustra en la Figura 3. El tiempo para alcanzar un  
estado estacionario está entre 10 y 15 minutos. La dismi-  
nución en la corriente es causada por una absorción del  
oxígeno disuelto por los microorganismos fijados del elec-  
trodo en el curso de la asimilación de la fuente de carbo-  
15 no de la solución de muestra. La velocidad de la disminu-  
ción de la corriente y de la disminución de la corriente  
en un estado estacionario dependen una de otra y son por  
consiguiente proporcionales a la concentración de la fuen-  
te de carbono. Por lo tanto, la concentración de la fuente  
20 de carbono puede calcularse a partir de la velocidad de la  
disminución de la corriente o de la disminución de la co-  
rriente en un estado estacionario en virtud de la relación  
lineal entre ellas.

25 Como los microorganismos del electrodo pueden  
asimilar la fuente de carbono rápidamente, el tiempo de  
inyección de la muestra es tan corto como de 1 a 10 minu-  
tos. En cuanto al tiempo de contacto de los microorganismos  
con la solución de muestra, es deseable que el tiempo sea  
tan corto como sea posible puesto que si los microorganis-  
30 mos permanecen en contacto con la solución de muestra du-

1 rante un tiempo largo, pueden ser asimilados por los mi-  
croorganismos otros compuestos orgánicos contenidos en la  
solución de muestra, tales como aminoácidos originando una  
absorción indeseable de oxígeno disuelto.

5 Puesto que la velocidad de disminución de corriente  
está influenciada por el pH y la temperatura, es nece-  
sario realizar el procedimiento de determinación a una tem-  
peratura constante que varía de 15 a 40°C y un pH que varía  
de 3,0 a 8,5. Cuando se determina una fuente de carbono  
10 volátil tal como ácido acético en un medio de cultivo, el  
pH del líquido acuoso en la cubeta de flujo debe mantenerse  
suficientemente por debajo del valor de pK del ácido acé-  
tico (4,75 a 30°C) puesto que la mayor parte de las molécu-  
las de ácido acético existen en forma de iones acetato por  
15 encima de los valores de pK, en los que no pueden pasar a  
través de una membrana permeable a los gases.

La velocidad de disminución de corriente está  
también ligeramente influenciada por la clase de la fuente  
de carbono. Por lo tanto, es deseable determinar la rela-  
20 ción entre una fuente de carbono que ha de determinarse y  
la velocidad de la disminución de corriente antes de la  
determinación.

El método del presente invento no es efectuado  
por otros compuestos orgánicos e iones inorgánicos coexis-  
25 tentes en un medio de cultivo. Por ejemplo, los L-aminoáci-  
dos tales como ácido L-glutámico, L-lisina, ácido L-aspar-  
tíco, vitaminas, proteínas de nucleótidos de base (enzima),  
péptidos, polisacáridos, agentes antiespumantes y agentes  
tensioactivos no afectan al método del presente invento.

30 El método del presente invento es más preferido

1 que un método convencional para determinar el poder reduc-  
tor de la fuente de carbono puesto que puede determinarse  
exactamente la concentración del sacárido en un medio de  
cultivo de fermentación de ácido L-glutámico. Mientras que  
5 la concentración no puede determinarse exactamente por el  
método para determinar el poder reductor tal como el método  
de Park-Johnson, puesto que una considerable cantidad de im-  
purezas reductoras está contenida generalmente en un medio  
de cultivo de fermentación de ácido glutámico.

10 De acuerdo con el presente invento se proporciona  
un método para determinar un L-aminoácido en un medio de  
cultivo o caldo de fermentación por medio de un electrodo  
microbiano. El método comprende medir la fuerza electromo-  
triz (F.E.M.) de un electrodo sensible a CO<sub>2</sub> gaseoso en un  
15 líquido acuoso, en el que la F.E.M. se produce de acuerdo  
con la reacción (I) realizada en condiciones anaerobias por  
los microorganismos fijados del electrodo microbiano. El  
cálculo de la concentración del L-aminoácido se hace por  
el empleo de la relación entre el logaritmo de (C=concen-  
20 tración de L-aminoácido) y la F.E.M. como se muestra en  
la Figura 14, en la que se aplica la ecuación de Nernst.

$$(II) \quad E = E_0 - \frac{2,303RT}{F} \log C$$

25 En esta ecuación E<sub>0</sub> es una diferencia de poten-  
cial asimétrica, R es la constante de los gases, T es la  
temperatura absoluta y F es la constante de Faraday.

Los microorganismos empleados de acuerdo con el  
presente invento son los que contienen y muestran activi-  
30 dad de L-aminoácido-descarboxilasa. Por ejemplo, se emplean

1 para determinar el ácido L-glutámico microorganismos que  
tienen una actividad de ácido L-glutámico-descarboxilasa  
tales como Escherichia coli ATCC 8739, Citrobacter freundii  
5 ATCC 10787, Clostridium welchii ATCC 13124, Rhodotorula  
glutinis IFO 0413. Se emplean preferiblemente para deter-  
minar L-lisina los que tienen actividad de L-lisina-des-  
carboxilasa tales como Escherichia coli ATCC 23226, Bacte-  
rium cadaveris ATCC 9760, Streptococcus faecalis ATCC 12984,  
10 Pseudomonas saccharophila ATCC 15946, Bacillus subtilis  
ATCC 15037, Lactobacillus casei ATCC 7469.

Para determinar la L-fenilalanina y la L-argini-  
na, se emplean preferiblemente los microorganismos que tie-  
nen actividad de L-fenilalanina- o L-arginina-descarboxi-  
15 lassa, tales como Streptococcus faecalis ATCC 8043, Esche-  
richia coli ATCC 10787.

Estos microorganismos pueden cultivarse en con-  
diciones aerobias o anaerobias de una forma convencional  
y las células microbianas obtenidas emplearse directamente  
como una forma de electrodo microbiano.

20 De acuerdo con el método del presente invento,  
además de células intactas, también se emplean preferible-  
mente células liofilizadas o células microbianas que están  
tratadas con un disolvente orgánico y/o un agente tensio-  
activo. Como disolvente orgánico para este fin, se emplean  
25 acetona, etanol, metanol, isopropanol, n-propanol, tolueno  
y éter.

Los agentes tensioactivos empleados de acuerdo  
con el presente invento son los que tienen fuerte poder  
osmótico pero que no perjudican la actividad de la enzima.  
30 Por ejemplo, se emplean preferiblemente bromuro de cetil-

1 trimetilamonio, bromuro de cetilpiridinio, lauril-sulfato  
de sodio, éter alcohólico de polietileno, y alcohol-betaí-  
na. Por ejemplo, las células microbianas que se cultivan,  
recogen y lavan con agua se sumergen en el líquido acuoso  
5 que contiene una cantidad sustancial de agente tensioacti-  
vo y/o se tratan con disolventes orgánicos y a continuación  
se secan a una temperatura baja. Las células microbianas  
así obtenidas contienen  $10^6$ /g de células vivas y se emplean  
preferiblemente durante un tiempo tan largo como dos años.

10 El electrodo microbiano empleado de acuerdo con  
el presente invento para determinar L-aminoácidos se forma  
fijando los microorganismos antes descritos a un electrodo  
sensible a  $\text{CO}_2$  gaseoso de una forma similar a la que se  
describe anteriormente en el método para formar el electro-  
15 do microbiano empleado para la determinación de una fuente  
de carbono.

Un electrodo sensible a  $\text{CO}_2$  gaseoso empleado de  
acuerdo con el presente invento puede ser de cualquier ti-  
po convencional.

20 La Figura 11 muestra un electrodo microbiano  
que comprende un diafragma 3 del electrodo tal como una  
membrana de silicona a la que se fijan los microorganismos,  
la capa de microorganismos 1, el separador 1' tal como un  
trozo de papel de filtro, membrana de diálisis o un cuerpo  
25 sólido similar 2 tal como una membrana de filtro Milipore  
(marca registrada de Milipore Ltd., Co.) y una red de ny-  
lon, el electrodo de pH 4' y una solución 7 del electrolit-  
o interno tal como un líquido acuoso que contiene  $\text{NaHCO}_3$   
y  $\text{NaCl}$ .

30 Un diagrama esquemático del método del invento

1 - está ilustrado en la Figura 12 que es similar al ilustrado  
en la Figura 2 excepto que el gas  $N_2$  se inyecta en el sistema de determinación por la boquilla de inyección 13' en lugar de aire u  $O_2$  gaseoso.

5 En la Figura 12 se muestra un electrodo microbio-  
no 10, una cubeta de flujo 11, un tope de caucho 12, 12',  
la boquilla de inyección de  $N_2$  gaseoso 13', boquillas de  
inyección de la solución vehículo 15, solución de muestra  
14, medidor de pH o medidor de iones 18' y un registrador  
10 18.

Se inyecta una solución vehículo que tiene valores de pH de 3,5 a 5,5 y  $N_2$  gaseoso en el sistema de determinación desde la boquilla 14 y 15 a un caudal constante respectivamente, y la temperatura en la cubeta de flujo se mantiene a una temperatura constante que varía desde 20  
15 a 40°C durante la determinación.

La fuerza electromotriz del electrodo se registra visualmente por un registrador (línea base).

Después que la línea base ha alcanzado un valor constante, la solución de la muestra (un medio de cultivo, caldo cultivado o solución diluida) se inyecta en el sistema de determinación por una boquilla 14 durante 0,5 a 3 minutos a un caudal constante y a un intervalo de tiempo regular, se diluye con la solución vehículo circulante de modo que la concentración del L-aminoácido en la cubeta de flujo pueda ser de  $10^{-4}$  a  $10^{-1}$  M, y se alimenta en la cubeta de flujo.  
20  
25

En la pila de flujo, el L-aminoácido de la solución muestra se descompone por los microorganismos fijados del electrodo y se produce  $CO_2$  gaseoso de acuerdo con la  
30

1 reacción (I). El  $\text{CO}_2$  producido penetra a través de un dia-  
fragma del electrodo y cambia el pH de la solución 7 del  
electrolito del intervalo. El cambio de pH se determina  
5 por el medidor de pH o el medidor de iones  $\text{I}^8$  y se regis-  
tra por el registrador  $\text{I}^8$ .

Puede calcularse la concentración del L-aminoáci-  
do en la solución de muestra a partir de la ecuación de  
Nernst (II) anteriormente descrita.

10 Como solución vehículo empleada de acuerdo con  
el presente invento, es preferible una solución tampón 15  
que contiene ácido orgánico tal como ácido cítrico, ácido  
fumárico y ácido succínico, o una solución tampón de piri-  
dina-HCl. Entre ellas, se emplea más preferiblemente la  
solución tampón de piridina-HCl que contiene NaCl y  
15  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,5 g/dl).

De acuerdo con el presente invento, la reacción  
(I) en la cubeta de flujo debe llevarse a cabo en un esta-  
do anaerobio puesto que si la reacción (I) se lleva a cabo  
aeróbicamente, los microorganismos fijados asimilan mate-  
20 riales nutrientes derivados del medio de cultivo o caldo  
cultivado tal como sacárido y aminoácidos, es decir ocurre  
la respiración de los microorganismos y una gran cantidad  
de  $\text{CO}_2$  gaseoso que se produce por la respiración microbia-  
na hace imposible la determinación del L-aminoácido.

25 Se ha encontrado ahora que la producción de  $\text{CO}_2$   
gaseoso por acción de los microorganismos vivos disminuye  
completamente llevando a cabo la reacción (I) en un estado  
anaerobio, en el que la reacción (I) por los microorganis-  
mos vivientes prosigue lo bastante cuantitativamente para  
30 ser empleada para la determinación del L-aminoácido preten-

1 dido.

Un estado anaerobio en el que la reacción (I) se lleva a cabo de acuerdo con el presente invento es aquel bajo el cual no hay contenido oxígeno disuelto en un sistema de reacción de los microorganismos fijados y el estado anaerobio se mantiene no solamente por inyección de N<sub>2</sub> gaseoso sino también por otros gases inertes, tales como argón o helio en una solución vehículo que no contiene oxígeno disuelto.

10 Parecería que el método del presente invento está afectado por las impurezas derivadas de un medio de cultivo tales como sacáridos, ácidos orgánicos y otros aminoácidos, puesto que el método emplea microorganismos vivos. Sin embargo, el método del presente invento no está afectado por estas impurezas. Por ejemplo, un método para de-  
15 terminación de L-lisina que emplea un electrodo microbiano que comprende microorganismos fijados de Escherichia coli ATCC 23226 y electrodos sensibles al CO<sub>2</sub> gaseoso no está afectado por otros aminoácidos como se muestra en la Tabla  
20 siguiente.

<u>Amino-ácido</u>	<u>Fuerza electromotriz (F.E.M.)</u>
L-lisina	100,0
Glicina	1,3
L-alanina	1,3
25 L-valina	1,1
L-leucina	1,2
L-tirosina	7,6
L-triptófano	7,4
Acido L-glutámico	3,7
30 L-prolina	1,3

1

En este experimento, cada concentración de L-aminoácido en la solución de muestra es igual a la de L-lisina. La Tabla muestra que no hay aminoácido que tenga valores de F.E.M. mayores del 10% del de la L-lisina.

5

Otros aminoácidos que no se muestran en la Tabla anterior y otros compuestos orgánicos contenidos usualmente en un caldo de cultivo también se determinan de forma similar.

10

Se encuentra que el método para determinar L-lisina no está afectado por L-serina, L-treonina, L-cisteína, L-cistina, L-metionina, ácido L-aspártico, L-glutamina, L-fenilalanina, L-asparagina, L-histidina, L-arginina, L-ornitina.HCl, L-citrulina, L-isoleucina, ácido LD-láctico, ácido tartárico, ácido  $\alpha$ -cetoglutárico, ácido succínico, ácido málico, ácido fumárico, ácido cítrico, glucosa y urea.

15

Comparado con el método del presente invento, un método con ninhidrina ácida común para la determinación de L-lisina está afectado por otros aminoácidos tales como L-cisteína como se muestra en la Tabla siguiente.

20

Amino-ácido	
L-lisina	100%
L-cisteína	8%
L-cistina	3%
L-tirosina	11%
L-histidina	4%
L-prolina	17%
L-ornitina.HCl	8%

25

Es evidente de estos resultados que el método del presente invento es superior a un método de ninhidrina

30

16049

1       ácida común en selectividad.

5       Como se ha descrito antes con detalle, puede alcanzarse una determinación extremadamente rápida, sencilla y continua de una fuente de carbono y L-aminoácido en un medio de cultivo o caldo cultivado con mucha precisión y reproductibilidad. Este nuevo método para determinación será útil para la medida en el curso de la producción de una fuente de carbono y L-aminoácido en un medio de cultivo o caldo cultivado durante la fermentación y es especialmente necesario para un método de alimentación.

10       El invento se ilustrará ahora por los ejemplos siguientes. En los ejemplos, el símbolo % representa % p/v.

EJEMPLO 1

15       Se cultivó Brevibacterium flavum ATCC 14067, desarrollado en un cultivo en pico de flauta de agar nutriente, con agitación en un caldo nutriente complementado con 1% de glucosa a 30°C durante 24 horas. Una porción de 25 ml de un medio (volumen total: 100 ml) que contenía los componentes dados en la Tabla 1 se añadió a un matraz de 20       500 ml, se esterilizó a 120°C durante 15 minutos y se enfrió. Cada matraz se complementó con 0,5 ml de solución de urea al 30% esterilizada separadamente.

1

Tabla 1. Composición del medio (pH 6,0)

Componente	Concentración
Glucosa	4,0 g/dl
5 $K_2HPO_4$	0,1 g/dl
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1 g/dl
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	2 ppm
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	2 ppm
Extracto de soja	24 ml/l
10 Tiamina.HCl	100 mcg/l
Urea	0,6 g/dl

15

El medio se inculó con 0,5 ml del cultivo de semilla y se incubó con agitación a 30°C durante 24 horas. Las células se recogieron centrifugando 30 ml del caldo de cultivo y lavando con agua tres veces dando 5 ml de pasta de célula (1). Se obtuvo un electrodo microbiano (10) mostrado en la Figura 1 extendiendo un anillo de la pasta de célula sobre una membrana de Teflon (3) de un electrodo sensible al oxígeno disuelto del tipo polarógrafo (Beckman Modelo 777) cubriendo la pasta con una membrana de celofán (2) y fijando la parte superior con una banda de caucho (6). El electrodo (10) se insertó en una cubeta de flujo (11) por un relleno de caucho (12, 12') dando una cubeta de flujo de 0,5 ml. Se montó un sistema de medida continuo mostrado en la Figura 2 con la cubeta de flujo.

20

25

En la Figura 2 los números representan los significados siguientes, respectivamente:

30

16049

- 1 (10) Electrodo microbiano  
(11) Cubeta de flujo  
(12, 12') Relleno de caucho  
(18) Registrador
- 5 (16) Tubería para el fluido vehículo que contiene la muestra  
(13) Entrada de aire  
(14) Entrada de la muestra  
(15) Recipiente del fluido vehículo.

10 Para las medidas, se hizo fluir agua a un caudal de 5 ml/minuto soplando aire a una velocidad de 6 a 10 l/h. Así, el agua saturada de oxígeno entró en la cubeta de flujo como un fluido vehículo. La temperatura de entrada de la cubeta de flujo se ajustó a 30°C. Después que se estabilizó la corriente eléctrica del electrodo microbiano

15 (después de obtener una línea base estable), se inyectó una solución de glucosa al 1,12% a una velocidad de 0,1 ml/minuto. La corriente eléctrica del electrodo se registró variando el tiempo de inyección (anchura de impulsos) desde 0,5 minutos a 16 minutos. Los resultados se muestran

20 en la Figura 3 en la que el eje de abscisas muestra el tiempo (minutos) y el eje de ordenadas muestra una cantidad de oxígeno disuelto (valor relativo). El valor relativo 0 significa que el oxígeno disuelto es 0. "A" representa una línea base (el valor de agua saturada de oxígeno). En esta

25 Figura, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 muestran anchuras de impulsos de 0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 6,0 y 16 minutos, respectivamente. La corriente eléctrica del electrodo microbiano comenzó a disminuir unos cuantos segundos después de que se inyectó una muestra y alcanzó un nivel constante después de aproximadamente 10 minutos (corriente del estado esta-

30

1 cionario). A continuación, se inyectó glucosa a diversas concentraciones a un intervalo de 5 minutos con anchuras de impulsos de 30 segundos, con lo cual se examinó la relación entre la altura del pico y la concentración.

5 Se llevaron a cabo ensayos similares con fructosa, sacarosa, ácido glutámico, trehalosa y lactosa. Los resultados se muestran en la Figura 4 en la que el eje de abscisas representa la concentración en la cubeta de flujo y el eje de ordenadas representa la altura del pico calculada basándose en la glucosa (la altura del pico de la glucosa 1 mM es 100%). Se obtuvieron curvas de 1 a 6 con los significados siguientes, respectivamente:

- 10
- 1 : Glucosa
  - 2 : Fructosa
  - 15 3 : Sacarosa
  - 4 : Acido L-glutámico
  - 5 : Lactosa
  - 6 : Trehalosa

20 Se diluyeron melazas de caña de azúcar (abreviado como MC) de un contenido de azúcar de 0,9%. También se realizó un ensayo similar con la solución diluida con una anchura de impulsos de 30 segundos, con lo que se examinó la relación entre la concentración de azúcar y la altura del pico. La figura 5 muestra los resultados. En la Figura, los círculos abiertos representan los resultados que están muy de acuerdo con el valor teórico mostrado por la línea continua A que se obtuvo por cálculo (adición sencilla) basado en la composición del azúcar (sacarosa:glucosa:fructosa 60:20:20) de MC y en la curva patrón dada en la Figura 4.

25

30

1 La concentración de azúcar residual del caldo  
cultivado se midió con una anchura de impulsos de 30 segun-  
dos y se calculó basándose en la curva patrón de MC (valor  
teórico) en la fermentación del ácido glutámico que se rea-  
5 lizó con MC como material de partida. La Tabla 2 muestra  
los resultados.

Tabla 2. Concentración de azúcar residual del caldo de fermentación.

Tiempo (horas)	Producción de ácido L-glutámico (g/dl).	Azúcar residual (g/dl)	
		Electrodo microbiano	Método de Lehman- Schule
10		0,75	1,9
20		0,35	1,8
30	7,5	0,16	1,6

15 A las 30 horas de la fermentación, el método de  
acuerdo con el presente invento proporcionó la concentra-  
ción de azúcar residual de 0,16 g/dl que era la décima par-  
te de 1,6 g/dl que fue el valor obtenido de acuerdo con el  
20 método convencional.

La concentración de azúcar residual del caldo de  
fermentación se ensayó también por cromatografía en papel.  
Pero no había casi azúcar que pudiera ser asimilada por el  
microorganismo. Por consiguiente, los resultados obtenidos  
25 de acuerdo con el método convencional muestran sólo la ac-  
tividad reductora del compuesto reducible. Por el contra-  
rio, el método de acuerdo con el presente invento puede  
proporcionar una cantidad exacta de azúcar residual sin es-  
tar influenciado por el compuesto reducible y por el ácido  
30 glutámico que coexiste en el caldo de fermentación en una

1 concentración elevada.

Se ensayó la estabilidad del electrodo microbia-  
no alimentando 0,75% de solución de glucosa acuosa automá-  
ticamente con una anchura de impulsos de 30 segundos (tem-  
peratura: 30°C) y a un intervalo de 30 minutos en el sis-  
tema mostrado en la Figura 2 que se montó con el electrodo  
microbiano construido de acuerdo con la Figura 1. Los re-  
sultados se dan en la Figura 6 que muestra que no se obser-  
vó cambio durante la operación en continuo durante dos se-  
manas.

#### EJEMPLO 2

Se cultivó Trichosporon brasicae CBS 6382 en un  
medio de cultivo en pico de flauta de agar que contenía  
0,3 g/dl de extracto de malta, 0,3 g/dl de extracto de le-  
vadura, 0,3 g/dl de peptona, 1,0 g/dl de glucosa y 2,0  
g/dl de agar. Se recogieron células microbianas desarrolla-  
das en el pico de flauta y 0,3 g de las células húmedas se  
pusieron en suspensión en 5 ml de agua. Se secó la suspen-  
sión de células (3 ml) sobre una membrana de acetil-celu-  
losa porosa (tipo HA, tamaño de poros: 0,45 micras, diáme-  
tro: 47 mm y espesor: 150 micras, de Milipore Ltd.). A  
continuación se montó un electrodo microbiano ilustrado en  
la Figura 7 de la misma manera que se ha descrito en el  
Ejemplo 1, que era otro tipo de electrodo microbiano de  
acuerdo con el presente invento. La membrana (1') de acetil-  
celulosa porosa que retiene las células microbianas (1) se  
cortó en un círculo (diámetro: 14 mm) y se fijó sobre la  
superficie de una membrana de Teflon (3) (espesor: 50 mi-  
cras) de un electrodo sensible al oxígeno (modelo C-321,  
Denki Kagaku Keiki Co.) que se cubrió con una membrana per-

1 meable al gas (2) (membrana de Teflon porosa tipo PH, tama-  
ño de poro: 0,5 micras, Milipore Ltd.) o una membrana de  
caucho de silicona (Tipo D 606, Radiometer Co.) y a conti-  
5 nuación con una red de nylon (2'). Por consiguiente, los  
microorganismos se quedaron atrapados entre las dos membra-  
nas, con lo que se ensambló o montó así un electrodo micro-  
biano (10). El electrodo implicaba además un ánodo de alu-  
minio (5), una solución de electrolito de cloruro de pota-  
sio saturada (7), un aislador (25), un cátodo de platino  
10 (4) y un anillo de caucho (6) para fijar las membranas.

Además, la membrana de Teflon permeable a los gases se colocó sobre la superficie del electrodo y se cubrió con una red de nylon. Estas membranas se aseguraron con anillos de caucho como se ilustra en la Figura 7.

15 La Figura 8 muestra un diagrama esquemático del sistema. El sistema consistía en un electrodo microbiano (10), una camisa (19), una cubeta de flujo (11) (diámetro: 3 cm, altura: 2,7 cm, volumen: 19 ml, volumen del líquido: 3 ml), un agitador magnético (1000 r.p.m.) (20). Como una  
20 bomba (21), se empleó una bomba peristáltica (Modelo I, Technicon), y como tomador de muestra automático (14') y registrador de corriente (18), se emplearon respectivamente el modelo SC-160 FA (Toyo Kagaku Sangyo Co.) y Modelo ERB-6-10 o Modelo LER-12A (Yokogawa Electric Works Co.).

25 La temperatura de la cubeta de flujo (11) se mantuvo a  $30 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$  por paso de agua caliente (22) y (23) a través de la camisa (19). Se ajustó el agua corriente tamponada (15) hasta pH 3 con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1N y se saturó con aire (13). A continuación se transfirió a la cubeta de  
30 flujo (11) a una velocidad de 1,4 ml/minuto junto con 200

1 ml/minuto de aire (1.3). Cuando la corriente de salida del electrodo microbiano alcanzó un valor constante, se inyectó una muestra en el sistema a una velocidad de 0,8 ml/minuto durante intervalos de 3, 10 o 15 minutos.

5 La Figura 9 muestra curvas de calibración del electrodo microbiano, en la que el eje de abscisas representa la concentración del ácido acético (mg/l) y el eje de ordenadas representa la disminución de la corriente ( $\mu$ A). Se observó una relación lineal entre la disminución de la corriente y la concentración del ácido acético por debajo de 72 mg/l por el método de impulsos. La concentración mínima para la determinación era 5 mg de ácido acético por litro. La reproductibilidad de la diferencia de corriente se examinó empleando la misma muestra. La diferencia de corriente era reproducible dentro de  $\pm 6\%$  del error relativo cuando se empleó la muestra que contenía 54 mg/l de ácido acético. La desviación típica era 1,6 mg/l en 20 experimentos.

15 Se examinó la selectividad del electrodo microbiano para el ácido acético. La Tabla 3 muestra la selectividad del electrodo. El receptor no respondió a los compuestos volátiles tales como ácido fórmico y alcohol metílico y a los nutrientes no volátiles para microorganismos tales como glucosa e iones. Cuando el electrodo microbiano se cubrió con una membrana permeable a los gases, solamente pudieron penetrar los compuestos volátiles a través de la membrana. La respuesta al compuesto orgánico depende de la facilidad de asimilación de los microorganismos inmovilizados. La levadura que utiliza ácido acético, Trichosporon  
25 brasicae, no utilizó ácido fórmico ni alcohol metílico,

1 sino que utilizó ácido propiónico, ácido n-butírico y alcohol etílico. Por consiguiente, la existencia de dichos compuestos impide la determinación de ácido acético. Sin embargo, esos compuestos no están generalmente en una cantidad tan grande en los caldos de fermentación como para poder afectar a la determinación.

5  
Tabla 3. Respuesta del receptor del electrodo microbiano a diversos compuestos:

Compuestos	Concentración *	Disminución de la corriente (micro A) **
10 Acido acético	100 mg/l	0,18
Acido fórmico	100 mg/l	0
Acido propiónico	100 mg/l	0,17
Acido n-butírico	100 mg/l	0,21
15 Acido láctico	100 mg/l	0
Acido succínico	100 mg/l	0
Acido tartárico	100 mg/l	0
Alcohol metílico	40 mg/l	0
Alcohol etílico	40 mg/l	0,21
20 Glucosa	10 g/l	0
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	50 g/l	0

\* Concentración original (diluida 2,8 veces en la cubeta de flujo)

25 \*\* Intervalo del tiempo de inyección: 15 minutos.

El electrodo microbiano para el ácido acético se aplicó a un caldo de fermentación de ácido glutámico. Se diluyó el caldo de fermentación del ácido glutámico (se empleó ácido acético como fuente de carbono) (el grado de dilución de la mezcla era 170 veces) y se inyectó en el

1 sistema de medida automáticamente (el tiempo de intervalo  
de inyección era 10 minutos). Se determinó la concentración  
de ácido acético por el electrodo microbiano y por cromatografía gaseosa. Como se muestra en la Figura 10 en la que  
5 el eje de abscisas muestra el resultado por el electrodo microbiano (g/dl) y en ordenadas se muestra por cromatografía de gases (g/dl), se obtuvo un resultado consistente satisfactorio entre ellos. El coeficiente de correlación era 1,04 en 26 experimentos. Las células enteras en el  
10 caldo no afectaron a la determinación electroquímica del ácido acético. Se examinó la capacidad de usar de nuevo el electrodo microbiano para el ácido acético. Se emplearon soluciones de ácido acético (desde 18 mg/l hasta 72 mg/l) para ensayos de estabilidad a largo plazo del electrodo. La salida de la corriente del electrodo era casi  
15 constante durante más de 3 semanas y 1500 ensayos. Por consiguiente, las levaduras en el electrodo estaban vivas durante largo tiempo. El electrodo microbiano puede emplearse durante largo tiempo para el ensayo de ácido acético.  
20 En conclusión, el receptor del electrodo microbiano parece bastante prometedor y muy atractivo para la determinación de ácido acético en un caldo de fermentación.

### EJEMPLO 3

25 Se hizo desarrollar Escherichia coli ATCC 8739 a 30°C con agitación en un medio que contenía los componentes mostrados en la Tabla 4.

Después de 20 horas, se centrifugaron 50 ml del caldo del cultivo para recoger las células. Las células húmedas se lavaron bien con 50 ml de KCl 0,1M y se liofilizaron dando 0,6 g de células liofilizadas.

1 - Tabla 4. Composición del medio (pH 7,0)

Componente	Contenido
Glucosa	1,0 g/dl
5 Casamino-ácidos	1,0 g/dl
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,5 g/dl
Acido glutámico (sal de Na)	0,2 g/dl
Extracto de levadura	0,2 g/dl
Antiespumante (silicona de Toshiba)	0,1 ml/dl

10

Se pusieron en suspensión las células liofilizadas (1) (5 mg) en una pequeña cantidad de agua para obtener una pasta de células, que se extendió sobre una red de nylon (1') (diámetro: 10 mm). Se fijó a una membrana de silicona (3) de un electrodo sensible al dióxido de carbono gaseoso (4') (Modelo E 5037, Radiometer Co., Dinamarca) con una membrana de celofán (2) como se ilustra en la Figura 11, en la que (7) representa una solución de electrolito. Mezclas de  $\text{NaHCO}_3$ -NaCl.

15

20

El electrodo de dióxido de carbono microbiano (10) se insertó en una cubeta de flujo (11) (volumen: 0,5 ml) a través de un envase de caucho (12) (12') y se montó un sistema de medida como se muestra en la Figura 12. En la Figura se muestran las partes siguientes:

25

(13') Entrada de  $\text{N}_2$  gaseoso

(14) Entrada de la muestra

(15) Entrada de la solución tampón de vehículo

(18) Registrador

(18') Medidor del voltaje de salida.

30

Como un fluido vehículo, se alimentó una solución

1 - tampón de piridina-ácido clorhídrico 0,1 M, pH 4,4 (que  
contenía 0,5 g/dl de NaCl y 0,5 g/dl de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) desde (15)  
a un caudal de 5 ml/minuto y también se insufló  $\text{N}_2$  gaseoso  
5 en la cubeta de flujo desde (13') a un caudal de 1 l/minuto,  
y a continuación se registró el voltaje de salida con un  
registro (18) (línea base). Durante la medida, la tempe-  
ratura dentro de la cubeta de flujo se mantuvo a 30°C. Des-  
pués de 1 hora, se inyectaron sucesivamente una solución  
de ácido glutámico acuoso de 465 ppm y sus diluciones des-  
10 de (14) a un caudal de 1 ml/minuto con una anchura de im-  
pulsos de 3 minutos. Las muestras se diluyeron con la solu-  
ción tampón y se hicieron fluir en la cubeta de flujo, con  
lo que el electrodo microbiano comenzó a responder al cabo  
de unos cuantos segundos. La respuesta alcanzó un nivel  
15 de saturación después de 3 minutos y se obtuvieron en el  
registrador los picos que se ilustran en la Figura 13. En  
la Figura 13, el eje de ordenadas y el de abscisas repre-  
senta el voltaje de salida (mV) y el tiempo (horas), res-  
pectivamente. Había una relación mostrada en la Figura 14  
entre la altura del pico (ordenada) en la Figura 14 y el  
20 logaritmo común de la concentración del ácido glutámico  
(log C, en abscisas) en la cubeta de flujo. La curva de  
respuesta lineal obtenida tenía una pendiente de 60 mV/pC<sup>glu</sup>  
que estaba de acuerdo con un coeficiente del término de  
25 Nernst en la ecuación (II) (valor teórico: 60,16 mV).

Se cultivó Brevibacterium lactofermentum ATCC  
13896 con aireación y agitación a 30°C en un medio que  
contenía los componentes mostrados en la Tabla 5.

1 Tabla 5. Composición del medio

Componente	Contenido
Glucosa	6,0 g/dl
5 $\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,2 g/dl
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,08 g/dl
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,002 g/dl
Extracto de soja	0,1 ml/dl
Biotina	5 mcg/l
10 Vitamina B <sub>1</sub> sal de Na	200 mcg/l
Antiespumante (silicona de Toshiba)	0,01 ml/dl

15 El caldo de cultivo resultante se diluyó 100 veces, siendo la muestra A. A la muestra se añadieron varias cantidades de ácido L-glutámico de calidad reactivo, siendo las muestras B, C y D, respectivamente. La concentración del ácido L-glutámico de la muestra se calculó de acuerdo con la ecuación (II) a partir de la altura del pico obtenido por el sistema mostrado en la Figura 12. Los resultados se dan en la Tabla 6. Todos los valores obtenidos por el método de acuerdo con el presente invento coincidieron con los obtenidos por el método enzimático convencional (método del autoanalizador).

20

1 Tabla 6. Ensayo del ácido L-glutámico en el caldo cultivado.

Muestra	Concentración del ácido L-glutámico (g/dl)	
	Método de acuerdo con el presente invento	Método del autoanalizador (Método convencional)
A	1,74	1,70
B	2,70	2,68
C	4,16	4,18
D	6,10	6,18

10 EJEMPLO 4

Las células húmedas de E. coli obtenida en el EJEMPLO 3 se lavaron dos veces con KCl 0,1 M y se pusieron en suspensión en 5 ml de agua. A la suspensión se añadió  
 15 gota a gota 50 ml de acetona a temperatura ambiente. La mezcla se agitó de 5 a 10 minutos y se centrifugó bajo enfriamiento. La torta de la célula se lavó dos veces con acetona, una vez con éter y se secó en un desecador a vacío obteniéndose 0,6 g de células tratadas con acetona-  
 20 -éter.

Dichas células tratadas con acetona-éter (1-2 mg) se pusieron en suspensión en una cantidad pequeña de agua hasta que se formó una pasta, que se extendió sobre una malla de nylon (diámetro: 10 mm). La malla se fijó sobre  
 25 una membrana de silicona (3) de un electrodo sensible al dióxido de carbono gaseoso disuelto (modelo E 5036, Radiometer Co., Dinamarca) con una membrana de celofán (2) para obtener un electrodo microbiano (10) como se ilustra en la Figura 11.

30 La concentración del ácido L-glutámico se ensayó

1 con el electrodo microbiano por el mismo método que se ha  
 descrito en el Ejemplo 3. Los resultados eran los mismos  
 que se muestran en la Tabla 6. El valor de cada muestra  
 estaba de acuerdo con el obtenido por el método del auto-  
 5 analizador convencional en el que se empleó la enzima de  
 la calabaza.

#### EJEMPLO 5

Se hizo desarrollar Rhodotorula glutinis IFO  
 0413 en un matraz con agitación a 30°C durante 48 horas en  
 10 un medio que contenía los componentes que se muestran en  
 la Tabla 7.

Tabla 7. Composición del medio (pH 6,3).

Componentes	Contenido (g/dl)
15 Glucosa	1,0
Peptona	0,3
Extracto de malta	0,3
Extracto de levadura	0,3
L-glutamato de sodio	0,2

20 Las células húmedas recogidas centrifugando 50  
 ml del caldo cultivado se lavaron dos veces con KCl con  
 0,1 M y se pusieron en suspensión en 50 ml de una solución  
 acuosa que contenía 20 mg de bromuro de cetiltrimetilamonio.  
 25 La suspensión se agitó durante 5 a 10 minutos y a continua-  
 ción se trató con acetona y éter obteniéndose 0,6 g de cé-  
 lulas secas.

Se montó un electrodo microbiano con la prepara-  
 ción de células secas. Se midieron las concentraciones del  
 30 ácido L-glutámico en las muestras del caldo de fermentación

1 del ácido L-glutámico como se ha descrito en el EJEMPLO 3.  
 Los valores analíticos resultantes estaban en buena con-  
 cordancia con los obtenidos de acuerdo con el método del  
 autoanalizador convencional en el que se empleó la enzima  
 5 de la calabaza. En este caso, no se detectó actividad de  
 la enzima en las células sin el tratamiento con tensioac-  
 tivo, con lo que fue imposible el ensayo del ácido L-glu-  
 támico.

#### EJEMPLO 6

10 Se cultivó E. coli ATCC 23226 en un matraz de  
 fondo redondo con agitación a 30°C en un medio mostrado  
 en la Tabla 8. Después de un cultivo de 20 horas, se cen-  
 trifugaron 50 ml del caldo cultivado para recoger las cé-  
 lulas, que se lavaron bien con 50 ml de KCl 0,1 M y se  
 15 liofilizaron dando 0,6 g de células liofilizadas.

Tabla 8. Composición del medio (pH 6,5)

Componente	Contenido (g/dl).
Glucosa	1,0
20 Polipeptona	1,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5
Extracto de levadura	0,2
L-lisina.HCl	0,2
25 Antiespumante (silicona de Toshiba)	0,1 ml/l

Las células liofilizadas (1-2 mg) se pusieron  
 en suspensión en una pequeña cantidad de agua para formar  
 una pasta (1), que se extendió sobre una malla de nylon  
 (1') (diámetro: 10 mm). La malla se fijó sobre una membrana  
 30 de silicona (3) de un electrodo sensible al dióxido de car-

1 bono disuelto (Modelo E 5036, Radiometer Co., Dinamarca)  
con una membrana de celofán (2) como se muestra en la Figu-  
ra 11.

5 Se insertó el electrodo microbiano (10) en una  
pila de flujo (volumen: 0,5 ml) por relleno de caucho  
(12, 12') y se montó un sistema de medida como se muestra  
en la Figura 12.

10 Como fluido vehículo, se alimentó una solución  
tampón de piridina-ácido clorhídrico 0,1 M, pH 5,00 (que  
contenía 0,5 g/dl de NaCl, 0,5 g/dl de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 0,1 g/l  
de piridoxal-5'-fosfato) desde (15) a un caudal de 4 ml/  
minutos y se insufló también  $\text{N}_2$  gaseoso desde (13') en la  
cubeta de flujo (11) a un caudal de 0,2 l/minuto en la Fi-  
gura 12. El electrodo (10) se conectó con un medidor de  
15 pH (18') y con un registrador (18) con el fin de medir la  
fuerza electromotriz. Durante la medida, la temperatura en  
la cubeta de flujo se mantuvo a 30°C. Se inyectó sucesiva-  
mente una solución acuosa de 5 g/l de L-lisina y su mues-  
tra diluida desde la entrada de la muestra (14) a un cau-  
dal de 1 ml/minuto durante 3 minutos.

20 La muestra se diluyó con la solución tampón y se  
hizo fluir en la cubeta de flujo (11). Al mismo tiempo co-  
menzó a responder el electrodo microbiano (10). La respues-  
ta alcanzó un nivel saturado después de 3 minutos y se re-  
25 gistraron picos similares a los que se muestran en la Figu-  
ra 13, en la que el eje de ordenadas y abscisas represen-  
tan la fuerza electromotriz (mV) del electrodo y el tiempo,  
respectivamente. Hubo una relación similar a la mostrada  
en la Figura 4 entre la altura del pico en la Figura 13 y  
30 la concentración de L-lisina en la cubeta de flujo (11).

1 La curva de respuesta lineal obtenida tenía una pendiente de 58 mV/pC<sub>Lis</sub> que estaba casi de acuerdo con un coeficiente del término de Nernst en la ecuación (II) (valor teórico: 60,16 mV, (30°C)).

5 Se cultivó Brevibacterium lactofermentum ATCC 13869 a 30°C con aireación y agitación en un medio mostrado en la Tabla 9. Durante el cultivo se añadió una solución de 40 g/dl de urea manteniendo el pH del caldo a 6,5-8,0.

10 Tabla 9. Composición del medio (pH 7,0).

Componente	Contenido
Glucosa	10,0 g/dl
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 g/dl
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,1 g/dl
Tiamina-HCl	10 mg/dl
Soja hidrozilizada (Mieki <sup>R</sup> )	1 ml/dl

20 El caldo cultivado se diluyó 20 veces, siendo la muestra A. Se añadieron diversas cantidades de L-lisina de calidad reactivo a dicha muestra A, siendo las muestras B, C y D.

25 Las alturas de los picos se leyeron con estas muestras de acuerdo con el sistema mostrado en la Figura 12 y se determinaron sus concentraciones de L-lisina empleando la curva de calibración que se trazó midiendo la altura del pico de la solución patrón de acuerdo con el mismo sistema.

30 Los resultados se dan en la Tabla 10. Cada valor de la muestra estaba en buen acuerdo con el que se obtuvo

1 por el método manométrico de Warburg convencional en el que se empleó la enzima de Bacterium cadaveris.

Tabla 10. Ensayo de L-lisina en el caldo cultivado.

5	Muestra	Concentración de L-lisina (g/dl)	
		Método por el presente invento	Método manométrico de Warburg. (Método convencional)
	A	1,32	1,32
	B	3,44	3,40
10	C	5,86	5,89
	D	6,50	6,45

#### EJEMPLO 7

15 Se cultivó Lactobacillus casei ATCC 7469 (Ensayo N° 1) con agitación en un medio que contenía 10% de leche desnatada, 0,5% de clorhidrato de L-lisina y 100 mcg/l de piridoxal. Se cultivaron Streptococcus faecalis ATCC 12984 (ensayo N° 2), Pseudomonas saccharophila ATCC 15946 (Ensayo N° 3), Bacillus subtilis ATCC 15037 (Ensayo N° 4) y Myxococcus virescens ATCC 25203 (Ensayo N° 5) con agita-

20 ción en un medio que contenía 1% de extracto de carne, 1% de polipeptona, 0,5% de NaCl, 0,5% de clorhidrato de L-lisina y 100 mcg/l de piridoxal. También se cultivó Aspergillus niger ATCC 6278 (Ensayo N° 6) con agitación en un ex-

25 tracto de Kogi complementado con 2% de glucosa, 0,1% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y carbonato de calcio. Después de una incubación de 24 horas, se centrifugaron 50 ml de cada caldo de cultivo para recoger las células. Se lavaron las células húmedas dos veces con KCl 0,1 M y se pusieron en suspensión en 5 ml de agua. A la suspensión se añadió 5 ml de acetona

1 gota a gota a temperatura ambiente y se obtuvieron 0,5-0,6  
 5 gramos cada una de células tratadas con acetona-éter de  
 acuerdo con el método que se ha descrito en el EJEMPLO 4.  
 (Aproximadamente se detectaron  $10^6$  células/g de células  
 10 vivas en la preparación de células tratadas por cultivo  
 sobre un agar nutriente). Se montaron electrodos microbia-  
 nos con estas preparaciones de células activas de la misma  
 forma que se ha descrito en el EJEMPLO 4 y se determinaron  
 las concentraciones de L-lisina de las muestras del caldo  
 de fermentación de L-lisina siguiente. Los valores resul-  
 tantes coincidían bien con los contenidos de acuerdo con  
 el método de ninhidrina ácida convencional como se muestra  
 en la Tabla 11.

Tabla 11. Ensayo de L-lisina en los caldos de fermentación  
 de L-lisina.

Muestra	Concentración de L-lisina (g/dl)						
	Método por el presente invento					Método con ninhi- drina ácida con- vencional	
	Ensayo N°						
	1	2	3	4	5	6	
A	2,54	2,49	2,53	2,55	2,49	2,50	2,54
B	3,60	3,59	3,64	3,63	3,64	3,65	3,62
C	4,20	4,21	4,24	4,24	4,25	4,21	4,25

25

EJEMPLO 8

Se cultivó Streptococcus faecalis (ATCC 12984 a  
 37°C durante 15 horas en un medio que contenía 3% de casei-  
 na hidrolizada por tripsina, 1% de glucosa y 0,1% de auto-  
 lizado de levadura. Se trataron las células recogidas de  
 la misma forma que se ha descrito en el EJEMPLO 4, dando

30

1 0,5 g de una preparación de células tratadas con acetona-  
 -éter, con lo que se construyó un electrodo microbiano. Se  
 añadieron varias cantidades de L-fenilalanina a los caldos  
 de fermentación del ácido L-glutámico, siendo la muestra  
 5 A, B y C, respectivamente. La concentración de L-fenilala-  
 nina en cada muestra ensayada con el electrodo se comparó  
 con el valor obtenido por el método de cromatografía de  
 líquidos. El valor de cada muestra obtenida por ambos mé-  
 todos estaba muy de acuerdo respectivamente como se mues-  
 tra en la Tabla 12. La preparación de células tratadas con  
 10 acetona-éter mantenían su actividad durante 6 meses, aunque  
 la actividad de la preparación de las células sin el trata-  
 miento se mantuvo solamente durante un mes en un refrigera-  
 dor.

15 Tabla 12. Ensayo de L-fenilalanina en un caldo de fermen-  
 tación de ácido L-glutámico.

Muestra	Concentración de L-fenilalanina (g/dl)	
	Método por el presente invento	Método por cromatogra- fía de líquidos.
20 A	0,82	0,83
B	1,88	1,92
C	2,95	3,00

#### EJEMPLO 9

25 Se cultivó E. coli ATCC 10787 de la misma forma  
 que se ha descrito en el EJEMPLO 8. Las células recogidas  
 se trataron del mismo modo que se ha descrito en el EJEM-  
 PLO 4, obteniendo 0,3 g de una preparación de células tra-  
 tadas con acetona-éter. Se construyó un electrodo microbia-  
 30 no con la preparación de células tratadas. Se añadieron

1 - varias cantidades de L-arginina a los caldos de fermenta-  
 ción del ácido L-glutámico, siendo las muestras A, B y C,  
 respectivamente. La concentración de L-arginina en cada  
 muestra se ensayó por el método del electrodo de acuerdo  
 5 con el presente invento, que se comparó con el valor obte-  
 nido por el método de cromatografía en líquidos. El valor  
 obtenido por ambos métodos estaba muy de acuerdo respecti-  
 vamente como se muestra en la Tabla 13.

10 Tabla 13. Ensayo de la L-arginina en el caldo de fermenta-  
 ción del ácido L-glutámico.

Muestra	Concentración de L-arginina (g/dl).	
	Método por el presente invento	Método por cromatografía de líquidos
A	1,25	1,15
15 B	6,37	6,44
C	10,56	10,85

#### BREVE EXPLICACION DE LOS DIBUJOS

20 La Figura 1 es una vista en corte simplificada del electrodo microbiano indicado en el EJEMPLO 1 equipado con un electrodo sensible al oxígeno convencional, que es adecuado para determinar fuentes de carbono no volátiles.

25 La Figura 2 es un diagrama esquemático de un sistema de determinación que emplea el electrodo microbiano de la Figura 1.

La Figura 3 es una gráfica que indica la relación entre el lapso de tiempo y la concentración del oxígeno disuelto (indicación relativa) cuando se inyecta 1,12% (p/v) de solución acuosa de glucosa en la pila de flujo a un caudal de 0,1 ml/minuto cambiando consecutiva-

1 mente las anchuras de impulsos.

5 La Figura 4 es una gráfica que indica la relación entre la concentración de diversas fuentes de carbono (1. Glucosa, 2. Fructosa, 3. Sacarosa, 4. Acido L-glutámico, 5. Lactosa, 6. Trehalosa), y la concentración del oxígeno disuelto (indicación relativa) cuando se inyectan varias concentraciones de diversas fuentes de carbono en la cubeta de flujo a una anchura de impulsos de 30 segundos, en un intervalo de 5 minutos.

10 La Figura 5 es una gráfica que muestra la conformidad del resultado de la determinación (círculo blanco) de la concentración de una solución acuosa de melazas de caña de azúcar por el método de este invento con la línea teórica (línea A) que se prepara y se basa en la línea patrón de la Figura 4.

15 La Figura 6 es una gráfica que indica la estabilidad del electrodo microbiano de la Figura 1 cuando se inyecta 0,75% (p/v) de una solución acuosa de glucosa en el sistema de la Figura 2 a una anchura de impulsos de 30 segundos (30°C) en un intervalo de 30 minutos (indicándose en el eje de abscisas, horas).

20 La Figura 7 es una vista en corte simplificada de una modificación del electrodo microbiano equipado con un electrodo sensible al oxígeno convencional indicado en el Ejemplo 2 que es adecuado para determinación de fuentes de carbono volátiles.

25 La Figura 8 es un diagrama esquemático de un sistema de determinación que emplea el electrodo microbiano de la Figura 7.

30 La Figura 9 es una gráfica que muestra la rela-

1      ción de la concentración del ácido acético (mg/l) y la  
disminución de la corriente ( $\mu$ A) indicada en el Ejemplo 2.

5      La Figura 10 es una gráfica que muestra la con-  
formidad de los resultados del presente método (el eje  
de abscisas) con el de la cromatografía gaseosa (eje de  
ordenada) cuando se determina una muestra de solución acuosa  
de ácido acético.

10      La Figura 11 es una vista en corte simplificada  
de una modificación del electrodo microbiano equipado con  
un electrodo sensible al dióxido de carbono gaseoso con-  
vencional indicado en el Ejemplo 3, que es adecuado para  
la determinación de L-aminoácido.

15      La Figura 12 es un diagrama esquemático de un  
sistema de determinación que emplea el electrodo microbia-  
no de la Figura 11.

20      La Figura 13 es una gráfica que indica la rela-  
ción entre la fuerza electromotriz (en mV) y la concentra-  
ción de solución acuosa de ácido L-glutámico cuando se  
inyectan consecutivamente varias concentraciones del áci-  
do al caudal de 1 ml/minuto con una anchura de impulsos  
de 3 minutos en la cubeta de flujo de la Figura 12.

25      La Figura 14 es una gráfica que muestra la con-  
formidad de los resultados de la determinación de la Figu-  
ra 13 con la línea teórica calculada por la ecuación de  
Nernst.

REIVINDICACIONES

5

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

10

1ª.- Un método para determinar la concentración de una fuente de carbono y un L-aminoácido en un medio de cultivo o solución de caldo cultivado, que comprende las operaciones de: (a) poner en contacto dicha solución aeróbicamente, en el caso de una fuente de carbono o anaeróbicamente en el caso de una L-aminoácido, con un electrodo microbiano que consiste en células microbianas fijadas o microorganismos inmovilizados y un electrodo sensible al oxígeno en el caso de una fuente de carbono o un electrodo sensible al dióxido de carbono gaseoso en el caso de un L-aminoácido, siendo capaces dichas células microbianas o microorganismos inmovilizados de metabolizar aeróbicamente dicha fuente de carbono y consumir con ello el oxígeno de dicha solución; o capaces de descarboxilar anaeróbicamente a dicho L-aminoácido y liberar por tanto dióxido de carbono en dicha solución; (b) medir electroquímicamente la velocidad de disminución de la corriente o la disminución de la corriente en estado estacionario debido al consumo de oxígeno por dichas células microbianas o microorganismos, que corresponden a la concentración de dicha fuente de carbono, o medir la fuerza electromotriz generada por la liberación

15

20

25

30

del dióxido de carbono debido a la descarboxilación por dichas células microbianas o microorganismos, que responden a la concentración de dicho L-aminoácido; y (c) determinar o registrar con ello la concentración de dicha fuente de carbono o dicho aminoácido en dicha solución.

2ª.- Un método según la reivindicación 1ª, en el que, cuando dicha fuente de carbono es volátil o no volátil, dicho microorganismo se fija a la superficie del diafragma de dicho electrodo sensible al oxígeno y se cubre con una membrana dispuesta sobre él.

3ª.- Un método según la reivindicación 1ª, en el que, cuando dicha fuente de carbono es no volátil, dicha membrana se selecciona entre el grupo consistente en membranas de celofán, de acetil-celulosa y semipermeables, filtro de Millipore y red de nylon con poros capaces de atrapar a dichos microorganismos.

4ª.- Un método según la reivindicación 3ª, en el que dicha fuente de carbono no volátil es un azúcar.

5ª.- Un método según la reivindicación 3ª, en el que, cuando dicha fuente de carbono es volátil, dicha membrana es permeable a los gases y se selecciona entre el grupo consistente en membranas de Teflon poroso, silicona, polibutadieno y polietileno.

6ª.- Un método según la reivindicación 1ª, en el que, cuando se determina la fuente de carbono, la medición de dicho consumo de oxígeno se efectúa determinando la velocidad de disminución de la corriente en dicho electrodo sensible al oxígeno.

7ª.- Un método según la reivindicación 1ª, en el que, cuando se determina la fuente de carbono, la medición

de dicho consumo de oxígeno se efectúa determinando la disminución de la corriente en estado estacionario de dicho electrodo sensible al oxígeno.

8ª.- Un método según la reivindicación 1ª, en el que, cuando se determina un L-aminoácido, dicho microorganismo se une directamente, o después de ser fijado en una matriz sólida, a la superficie del diafragma de dicho electrodo sensible al dióxido de carbono gaseoso y se cubre con una membrana dispuesta sobre él.

9ª.- Un método según la reivindicación 8ª, en el que dicho microorganismo es una célula microbiana.

10ª.- Un método según la reivindicación 8ª, en el que dicha membrana es una membrana de diálisis seleccionada entre el grupo consistente en membranas de celofán, de acetil-celulosa y semipermeables, filtros de Milipore y redes de nylon con microporos capaces de atrapar a dicho microorganismo.

11ª.- Un método según la reivindicación 1ª, en el que dicho L-aminoácido es un ácido L-glutámico.

12ª.- Un método para determinar la concentración de una fuente de carbono y un L-aminoácido en un medio de cultivo.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y para los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de CUARENTA Y TRES hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 14. DIC. 1979

P.A.

Fernando de Elizaburu  
Per Podes

