

ESTUDIO PRELIMINAR DE LA PRODUCCION DE ACIDO L-ASPÀRTICO CON *Pseudomonas fluorescens*

Juan C. Oviedo L^{*†}, Patricia Castrillón H^{*}, Margarita E. Ramírez C.^{*}, Diana M. Vanegas H.^{*}

**Universidad Pontificia Bolivariana, Cq. 1 #70-01, of. 11-259, Medellín, Colombia,
Centro de Estudios e Investigación en Biotecnología, CIBIOT, Facultad de
Ingeniería Química,*

Recibido 09 Junio 2009; aceptado 18 Junio 2009
Disponible en línea: 30 Junio 2009

Resumen: El ácido L-aspartico es un aminoácido no esencial con aplicaciones en las industrias química, farmacéutica y de alimentos. Se puede producir por síntesis química o biológica, sin embargo la primera tiene inconvenientes, siendo el más destacado la mezcla racémica producida. En este trabajo se empleo la cepa nativa de *Pseudomonas fluorescens* y ácido fumárico como fuente de carbono y energía. La primera etapa consistió en adaptar el microorganismo en medio sólido propio, sustituyendo parcialmente la fuente de carbono y energía desde el 20 % hasta el 80 % en las que presentó crecimiento destacado. La segunda etapa se realizó en fermentación líquida, en la cual se hicieron adaptaciones desde un 1% al 8%, mostrando turbidez hasta el 7 %. Posteriormente se realizaron las curvas de biomasa, consumo de sustrato y formación de producto y se ajustaron al modelo de Monod. La concentración máxima obtenida de ácido L- aspartico fue aproximadamente de 1.5mM. Copyright © 2007 UPB

Abstract: L-aspartic acid is a non-essential amino acid with applications in the chemical, pharmaceutical and food products. It is produced by chemical synthesis or biological, though the former has disadvantages, most prominently the racemic mixture produced. In this paper we use the native strain of *Pseudomonas fluorescens* and fumaric acid as a source of carbon and energy. The first step was to adapt the organism itself in a solid medium, partially replacing the source of carbon and energy from 20% to 80% in those presenting outstanding growth. The second stage was performed in liquid fermentation, in which adjustments were made from 1% to 8%, showing turbidity to 7%. Later there were the curves of biomass, substrate consumption and product training and followed the model of Monod. The maximum concentration obtained from L-aspartic acid was approximately 1.5 mM

Keywords: Aspartic Acid, Fumaric Acid, *Pseudomonas fluorescens*, Bioprocess

[†] Autor al que se le dirige la correspondencia:
Tel. (+574) 448883ext 6791, fax 4118779.
E-mail: juan.oviedo@upb.edu.co (Juan Oviedo).

1. INTRODUCCIÓN

El ácido L-aspartico es un aminoácido no esencial empleado como material de partida para una amplia variedad de aditivos para la industria farmacéutica y alimenticia por lo que varios procesos químicos y enzimáticos han sido descritos para su preparación ([Giselbrecht et al, 2001](#)).

Dentro de sus aplicaciones se destacan la producción del edulcorante aspartame (L-aspartil-L-fenilalaninametil ester). Es útil en la industria como material inicial o intermediario para la formación de surfactantes, secuestrante de iones metálicos, detergentes, cosméticos, síntesis de péptidos, productos farmacéuticos y coberturas y para la formación del polímero biodegradable de ácido poliaspartico (PAA). Este último puede ser utilizado como co-constructor o como secuestrante en detergentes y como polímero superabsorbente además de otras aplicaciones ([Eyal et al, 2001](#); [Sakano et al, 1999](#); [Stair et al, 2005](#); [Waller, 2001](#)).

Desde el punto de vista bioquímico, en el metabolismo de los monómeros, la conversión biológica del ácido fumárico a ácido aspártico es un proceso de transaminación no oxidativa, catalizado por un tipo de enzima amonoliasa; más específicamente por una enzima llamada aspartasa. Esta reacción se realiza en presencia de nitrógeno inorgánico en forma de alguna sal o NH_3 . La reacción es reversible por lo que se considera también un proceso de desaminación no oxidativa realizado por una enzima α -desaminasa ([Linden, 2004](#)). Tsuchida, se refiere al proceso como una transaminación ([Tshuida, 1986](#)). Ver [Fig. 1](#).

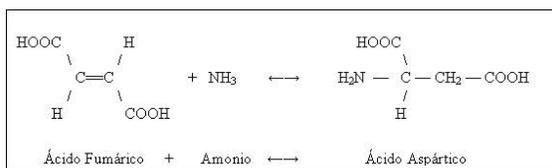


Fig. 1. Transaminación del ácido fumárico

Fuente: CONN, Eric E. and STUMPF P.R. Bioquímica fundamental. 3ª edición. Limusa, 1996. p. 433.

Aunque el ácido L-aspartico se produce por síntesis química, el costo de su producción industrial es alto debido a la separación de la

mezcla racémica. Sin embargo, la naturaleza provee catalizadores quirales en forma de enzimas o métodos enzimáticos útiles para producción de ácido L- aspártico ([Kato et al, 1999](#)).

El método para obtener ácido L-aspartico más conocido es cuando el ácido es obtenido de acuerdo a un proceso enzimático empleando ácido fumárico como material original en presencia de amonio y con la acción de la enzima aspartasa o un microorganismo productor de aspartasa ([Burn et al, 1998](#)).

Los sustratos empleados para bioconversión han sido, azúcares, hidrocarburos sin embargo, los más destacados son el ácido maleico y el ácido fumárico, tanto para la síntesis química como por la vía biológica. ([Giselbrecht et al, 2001](#); [Duc, Tshuida, 1986](#); [Eyal et al, 2001](#); [Sakano et al, 1999](#); [Stair et al, 2005](#); [Waller, 2001](#)).

El objetivo de este trabajo, consistió en determinar los parámetros cinéticos para la producción de ácido L aspártico empleando como sustrato el ácido fumárico, un ácido orgánico abundantemente producido en la ciudad de Medellín, además económicamente accesible. El microorganismo seleccionado fue la cepa nativa de *Pseudomonas fluorescens*, debido a que se adaptó al ácido fumárico y llevo a cabo la biotransformación del ácido fumárico. De otro lado este microorganismo se ha empleado en aplicaciones de biosíntesis, incluida la producción del ácido L-aspartico.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Selección del Microorganismo

Para la bioconversión del ácido fumárico a ácido L-aspartico a través de microorganismos se realizó una preselección de estos de acuerdo a los reportes bibliográficos ([Tshuida, 1986](#); [Mukouyama et al, 2001](#)) y a la disponibilidad de estos en el cepario del Centro de Estudios e Investigación en biotecnología (CIBIOT) el cual pertenece a la Universidad Pontificia Bolivariana. El microorganismo seleccionados fue la

Pseudomona fluorescens, la cual se han empleado para la biosíntesis de ácido L- aspártico.

2.2. Adaptación del microorganismo al medio de cultivo

Buscando la tolerancia y adaptación de la bacteria para que crecieran en medio del ácido fumárico y transformaran a ácido aspártico se realizó un proceso de adaptación cualitativo con las diferentes bacterias, al disminuir la concentración de la fuente de carbono en el medio de cultivo tradicional en una cantidad dada y suministrando dicha cantidad en ácido fumárico. Cuando la *Pseudomona fluorescens* presentó crecimiento en su medio tradicional, el Agar Pseudomonas (Merck) y en presencia de diferentes concentraciones de ácido fumárico, se cultivó en cajas de petri, en el medio reportado por [Mukouyama y Yasuda \(2001\)](#) el cual contiene Acido fumárico (Andercol), Sulfato de amonio (Montedison), KH_2PO_4 (Merck) K_2HPO_4 (Montedison), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck), NaOH (Merck), Urea y se ajusto pH con una solución de NaOH al 50%. Una vez adaptado el microorganismo, se hacían repiques en medio sólido y líquido para mantener su viabilidad.

2.3. Montaje del bioproceso

En Una vez adaptado el microorganismo, es cultivado en uel medio [Mukouyama & Yasuda \(2001\)](#) con algunas modificaciones ([Zangrandi et al 1976](#)). El procedimiento se llevo a cabo en un earlenmeyer 500 mL que contenía 300 mL del medio de cultivo en agitación en el agitador orbital Unimax 1010 DT a 150 rpm. La aireación se suministró por una bomba de aire Elite799 TM. El aire de la bomba pasaba a través de un filtro MFS 25 syringe; el montaje contaba además con una salida de aire a una solución de Sulfato de Cobre. Todo se esterilizo en una autoclave vertical a 15 psi durante 15 minutos.

2.4. Cuantificación del Sustrato

Se empleo un polarografo 746 VA Trace Analyzer Metrohom. Para la lectura del ácido fumárico en el polarógrafo, en cada muestra, se utilizaron 25 mL de solución soporte de ácido

maléico, igual a la utilizada en la medición del consumo de sustrato para los reactores de cuatro litros; 25 μL del sobrenadante del medio de cultivo y 25 μL de la solución del estándar de ácido fumárico preparada con una concentración de 70 g/L.

2.5. Cuantificación del producto

Para la determinación de la formación de producto, el acido L-aspártico, inicialmente se planteó el empleo de un método en el que el reactivo de ninhidrina sugerido por [Nam Sun Wang \(2006\)](#) para la determinación de aminoácidos adicionando 1 mL de la solución de ninhidrina a 5 mL de muestra en un tubo de ensayo, cubrirlo con plástico o con su tapa para agitar, dejar reaccionar entre 80-100° C durante 4 a 7 minutos, dejar enfriar a temperatura ambiente en un baño de agua fría; permitiendo la formación del complejo de ninhidrina de color púrpura que absorbe la mayor cantidad de luz en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm. El equipo empleado fue Shimadzu UV 1606 PC. De otro lado, se procedió a la recuperación de éste y evaluar su composición en un espectrofotómetro infrarrojo, Protégé 460 spectrometer ESP Nicolet. La muestra tomada se centrifugó a 6000 rpm 15 minutos, separando el sobrenadante y mezclarlo con una solución de ácido fumárico en agua hasta un pH de 3 y 4. Esta mezcla, se dejó en agitación magnética durante una hora hasta que la temperatura bajó a 28° C y se llevaron al proceso de obtención del cristales. El ácido L-aspártico de referencia que se utilizo fue grado analítico marca Merck

2.6. Crecimiento de Biomasa

El método empleado fue el de peso seco. El sobrenadante se separó para ser centrifugado por segunda vez como se mencionó anteriormente y se almacenó para la determinación de consumo de sustrato y formación de producto. El botón, se empleó para la determinación del crecimiento de biomasa en base al peso seco. En consecuencia; el botón se resuspendió en 6mL de agua destilada y se agitó en un vortex Heidolph Reax control, esta nueva suspensión, se vertió en un tubo de vidrio; pesado previamente en la balanza analítica Sartorius BP 221 S; se centrifugó a 4500 rpm durante 15 minutos, después de los cuales, en el tubo de ensayo quedaron, un sobrenadante, que se descartó y un nuevo botón, que se llevó al horno a

65° C hasta el día siguiente cuando se determinó el peso del tubo con el botón seco.

Una vez se obtuvieron los parámetros cinéticos de consumo de sustrato, crecimiento de biomasa y formación de producto, se elaboró un análisis cinético aplicando la cinética de Monod para establecer una relación funcional entre la velocidad específica de crecimiento (μ) y la concentración de sustrato (S)

3. RESULTADOS Y ANALISIS

A continuación en la tabla 1 se muestran los resultados de adaptación del microorganismo a los cambios de concentración de fuente de carbono y energía.

Tabla 1. Adaptación de la *Pseudomonas fluorescens* al ácido fumárico en medio sólido

% P/V Ac. Fumárico	% Disminución Medio Sintético	Crecimiento
0,97	18-20	Abundante
1,94	33-40	Abundante
2,9	48-60	Abundante
3,87	80	Abundante

De los resultados de la Tabla 1., se deduce que las bacterias, en cajas de petri, en sus respectivos medios de cultivo sólidos, se desarrollaron al disminuir el agar reactivo original en un 20% con respecto a la cantidad total del agar reactivo recomendado por el fabricante y se utilizó el ácido fumárico en el valor correspondiente. Posteriormente, se llevaron a cabo los procesos de adaptación en medio líquido. Dicho procedimiento se hizo con el fin de determinar el máximo de tolerancia adaptada por los microorganismos. Los resultados aparecen en la tabla numero 2.

El desarrollo de turbidez en el medio de cultivo líquido con el ácido fumárico al 3% se observó a los tres días de cultivo. Los cultivos en los medios líquidos con el ácido fumárico al 4% y 5% respectivamente presentaron turbidez después de dos días de cultivo en agitación. Después de

dos días de cultivo en estas condiciones, se utilizó cada uno para inocular cajas de petri con el mismo medio sólido y con el ácido fumárico al 4% y 5% respectivamente. Sin embargo, a pesar del medio líquido presentar turbidez leve y llevar dos días en agitación, no se presentó crecimiento en las cajas de petri. Debido a que en los medios sólidos con concentraciones de ácido fumárico de 4% y 5% no se presentó fácilmente el crecimiento bacterial, se evaluó la viabilidad de la bacteria en el respectivo medio de cultivo y se preparó agar y se inocularon con la *Pseudomonas fluorescens* del medio líquido con el 4% de ácido fumárico. Como resultado de esto, al día siguiente, la bacteria presentó crecimiento en el agar, mientras que en el medio sólido con el 4 % de ácido fumárico, el crecimiento fue tenue y solamente se visualizó dos días después.

Tabla 2. Adaptación de la *Pseudomonas fluorescens* al ácido fumárico en medio líquido

% Ácido fumárico	Turbidez
1	SI
3	SI
4	SI
5	SI
6	SI
7	SI
8	NO

Puesto que al inicio del proyecto; se esperaba que se presentaría un comportamiento clásico de un proceso de fermentación, en el que a medida que se consume el sustrato, se forma el producto y al final del proceso, cuando el sustrato se agota, se obtiene la mayor cantidad de producto; no se realizó un estudio previo de consumo de sustrato y formación de producto en un medio de cultivo con una baja concentración de ácido fumárico (1%), sino que se pasó directamente a adaptar las bacterias a aumentos en la concentración de este ácido desde 1 hasta 7%. Cuando se logró la adaptación de la *Pseudomonas fluorescens* al medio de cultivo con el ácido fumárico al 7 % se dejaron desarrollar las fermentaciones, esperando encontrar el ácido L-aspartico al final del desarrollo del cultivo para aplicarle la prueba de ninhidrina.

Considerando la posibilidad de la inhibición por sustrato y teniendo en cuenta que en el proceso de adaptación de las bacterias a aumentos sucesivos en la concentración de sustrato, no se evaluó la formación del ácido L-aspartico ni en los medios de cultivo con bajas concentraciones de ácido fumárico ni en los días iniciales del desarrollo de las fermentaciones, se realizaron repiques de a la bacteria a un medio líquido con una concentración de ácido fumárico de 3% aproximadamente. Adicionalmente, para confirmar la inhibición del microorganismo por ácido fumárico, se realizaron cultivos al 3% y 7% observándose un desarrollo de turbidez más rápido que en el medio de cultivo al 7%, puesto que, mientras después de cinco días de cultivo, el medio al 3% ya presentaba turbidez, el medio al 7% no presentaba aumento en el desarrollo de ésta. Este repique al 3% se consideró un paso intermedio, puesto que el propósito en la disminución en la concentración de sustrato fue regresar al medio de cultivo establecido por [Mukouyama y colaboradores \(2001\)](#) con el ácido fumárico al 1% para realizar el cultivo bajo condiciones aeróbicas y cuantificar a esta concentración, el consumo de sustrato y la formación de producto desde el momento de la inoculación, antes de someter los microorganismos a altas concentraciones del ácido fumárico. Y de esta manera, determinar, si el ácido L-aspartico se forma en algún momento dado del desarrollo del cultivo, aunque no permanezca hasta el final, cuando se consume el ácido fumárico.

Con estos ajustes, se llevaron a cabo los perfiles de sustrato, producto y biomasa, además de la determinación de los parámetros cinéticos, como se dijo anteriormente a partir del modelo de Monod.

Las curvas del comportamiento cinético para el consumo de sustrato (Acido Fumárico), Biomasa y producto (Acido L- Aspartico) se muestra en la [Fig. 2](#).

En la [Fig. 2](#), se observa claramente la disminución del ácido fumárico a través de los días y de forma más lineal, pudiéndose decir que al tercer día, se acaba el ácido fumárico. En el segundo día, la concentración se redujo a menos de la mitad. En el caso de la biomasa se tomaron muestras hasta el quinto día de desarrollo del cultivo y después se tomó otra muestra con éste propósito el día ocho, los datos obtenidos

permiten confirmar lo obtenido en la primera repetición cuando, después del quinto día, se observa un aumento de biomasa aún cuando el ácido fumárico está prácticamente agotado.

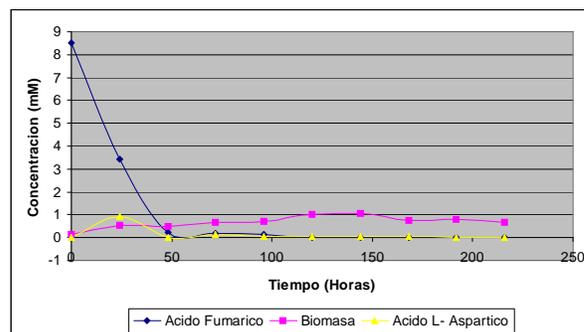


Fig 2. Cinética del Bioproceso para la Producción de Acido L- Aspartico

De acuerdo a la [Fig. 2](#) se diría que el microorganismo alcanza la fase estacionaria alrededor del día cinco. Sin embargo, esto difiere de los resultados obtenidos por [Zagranti y Peri \(1977\)](#) cuando trabajando con *Bacillus* ATCC 31177 observaron que el microorganismo alcanzaba la fase estacionaria en 18 a 20 horas. Se cree que el microorganismo sigue creciendo después del agotamiento del ácido fumárico porque emplea el ácido L-aspartico como sustrato ([Mukouyama et al, 2001](#)).

Aunque se esperaba el proceso convencional en el que la formación de producto aumenta con el transcurso de los días, en la medida que la concentración del ácido fumárico disminuye. A partir de los datos de la [Fig. 2](#), se establece que el primer día, en el momento de la inoculación, es cuando se forma más aminoácido (Aproximadamente 1,5mM) y que durante el primer día se sigue formando aunque en menor cantidad, por lo que se vé en la muestra tomada seis horas después. En el segundo día, todavía se presenta alguna formación de aminoácido, correspondiente a una concentración aproximada de 0,6 mM del aminoácido. Una probable explicación de lo anterior, podría ser debido a que el inóculo, durante su desarrollo, produce enzima y más aún, si lleva tres a cinco días en crecimiento; hay lisis celular, se aumenta la concentración de enzima en el inóculo, que al ser vertido en el reactor, de donde se toman las muestras para la determinación de consumo de sustrato y formación de producto, se forma el aminoácido, especialmente en el primer día de desarrollo del cultivo para la toma de muestras, como se observó con la prueba de ninhidrina.

[Sonawane y colaboradores \(2003\)](#) encontraron que la especie de *Pseudomona fluorescens* ATCC21973 transforma fumarato de diamonio a aspartato de amonio en 35 horas a 58° C con un rendimiento molecular mayor de 95%. [Tshuida \(1986\)](#) encontró que *Bacillus subtilis* NRRLB-15536, como productor de la enzima aspartasa puede lograr la máxima producción del enzima y el mayor crecimiento microbiológico en 7-8 horas comparado con un período de 3 días cuando se emplea *E. coli*.

[Zangrandi y colaboradores \(1977\)](#), encontraron que *Bacillus* ATCC 31177 tuvo un período de incubación de 18 horas en un medio de cultivo acuoso que contenía fumarato de amonio 60 g/L, K₂HPO₄ 2 g/L, MgSO₂.7H₂O 0,5 g/L y extracto de levadura 2 g/L y que al inocularla a un caldo con ácido fumárico creció rápidamente y alcanzó la fase estacionaria en 18-20 horas, la concentración de ácido L-aspartico en ese momento fué de 0,5 %p/v hasta alcanzar la concentración de 41 g/L en 56 a 60 horas.

Por lo anterior sería razonable que el ácido fumárico se reduzca en forma drástica en los dos primeros días del cultivo y que en las primeras 24 horas se forme el aminoácido. Si se tiene en cuenta que estequiométricamente, por cada mol de ácido fúmarico se forma una mol de ácido L-aspartico. La formación del aminoácido es poca con respecto al ácido fumárico consumido. En consecuencia, el ácido fumárico probablemente está siendo consumido para producir biomasa o CO₂.

Por otro lado, para la obtención del ácido L-aspartico es importante tener en cuenta el comportamiento del amonio durante el desarrollo del cultivo puesto que según [Duc \(1976\)](#) a pH alcalino el amonio se vuelve gaseoso. Además, con el sistema de aireación trabajado pudo haber pérdidas de ésta molécula, alterando su proporción recomendada con respecto al ácido fumárico, para la formación del ácido L-aspartico ([Eyal et al, 2001](#)). Esto es importante, porque si bien se consideró el ácido fumárico, como el sustrato limitante, la falta de amonio, también limita la formación del aminoácido. Y según los resultados obtenidos, aun habiendo ácido fumárico en el medio, no se formaba del aminoácido.

Con los datos experimentales obtenidos se ajustó al modelo de Monod a durante el crecimiento de *Pseudomona fluorescens* en el medio de cultivo con ácido fumárico al 1%. El modelo de Monod está indicado en la Ecuación 1

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \quad (1)$$

Donde μ, μ_{\max}, K_s y S representan, respectivamente, velocidad Especifica de crecimiento, velocidad máxima especifica de crecimiento, constante de Monod y concentración de sustrato. La ecuación 2 indica el ajuste obtenido.

$$\mu = \frac{0.0097 * S}{0.013 + S} \quad (2)$$

Los datos experimentales muestran que el crecimiento del microorganismo se ajustó al modelo de Monod puesto que el error obtenido fue de $5,92 \times 10^{-5}$. Para la cinética de formación de producto se empleó el modelo exponencial decreciente ilustrado en la ecuación 3.

$$P = ae^{-bt} + c \quad (3)$$

Los datos experimentales se ajustaron al modelo cinético propuesto en la Ecuación 3 empleando el método numérico de mínimos cuadrados. La cinética de formación de producto obtenida se muestra en la Ecuación 4.

$$P = 0.116e^{(-27,97t)} + 0.0065 \quad (4)$$

Los datos experimentales y el modelo propuesto muestran que la concentración de producto disminuye en forma exponencial, el error del modelo obtenido es de $3,32 \times 10^{-4}$ lo que muestra la validez del mismo.

El modelo cinético muestra que para un tiempo de fermentación infinito, la concentración de producto se acerca a 0,0065 g/L, esto se evidencia en los datos experimentales entre 72 a 144 horas de fermentación.

La constante b en el modelo representa la velocidad de desaparición del producto formado, para el modelo esta constante cinética fue de $27,97 \text{ h}^{-1}$. Esto indica que a las 27,97 horas de fermentación la concentración de producto disminuye hasta alcanzar un valor estable.

4. CONCLUSIONES

Las La cepa de *Pseudomona fluorescens* del laboratorio de microbiología de la Universidad Pontificia Bolivariana, si produce el aminoácido ácido L-aspartico en una concentración aproximada de 1,5mM.

El ácido L-aspartico se forma en los dos primeros días de desarrollo del cultivo cuando es inoculado con un pre-inóculo de cinco días de desarrollo.

Bajo las condiciones de laboratorio estudiadas, en un medio de cultivo con el ácido fumárico al 1%, el crecimiento de la cepa nativa de *Pseudomona fluorescens* de la UPB obedece a los parámetros cinéticos $\mu_{max} = 0,0097h^{-1}$ y $K_s = 0,013g/L$.

AGRADECIMIENTO

Los autores de este articulo quieren desean dar las gracias a Centro Integrado para el Desarrollo de la Investigación, CIDI de la UPB por el apoyo económico que brindado para llevar a cabo este proyecto y a la empresa Andercol por los aportes en reactivos y equipos que hicieron en el tiempo que duro la investigación.

REFERENCIAS

- Brun, Daniel; Lahary, Pierre-Yves and Thierry, Jean- Francois. Preparation of L-aspartic acid. Estados Unidos. Patente No. 5,488,155; Ene. 30, 1996.
- Eyal, Aaron. Jansen; Robert J. Vitner; Asher. Cami; Pierre. Et al Process for the production of aspartic acid condensate. U. S. Patent No. 6,344,348; Feb. 5, 2002.
- Duc, Nguyen-Cong. Method of making L-aspartic acid from fumaric acid. U. S. Patent No. 3,933,586; Ene. 20, 1976.
- Giselbrecht, Karl-heinz and Schaller, Josef. Process for preparing L-aspartic acid. U. S. Patent No 6,258,572; Jul. 10, 2001.
- Kato, Naoki et al. Method for producing L-aspartic acid. U. S. Patent No. 5,541,090. 5,741,681; Abr.21, 1998.
- Linden, Guy y Lorient, Denis. Bioquímica Agroindustrial: revaloración alimentaria de la producción agrícola. Zaragoza : Acribia, 1996. p. 366-378.
- Mukouyama, Masaharu and Yasuda, Shinzo. Methods for producing a succinamida polymer,

- an aspartic acid polymer and L-aspartic acid. U. S. Patent No. 6,300,105; Oct. 9, 2001.
- Sakano, Koichi, Hayashi, Takaya and Mukouyama, Masaharu. Process for production of L- aspartic acid. U. S. Patent No. 5,541,090; Jul. 30, 1996.
- Sonawane, Avinash. Klöppner, Ute. Hövel, Sven. Völker, Uwe and Röhm, Klaus-Heinrich. Identification of Pseudomonas proteins coordinately induced by acidic amino acids and their amides: a two-dimensional electrophoresis study. En: Microbiology Vol.149 (2003), p. 2909-2918.
- Stair, Jacqueline L. and Holcombe, James A. Metal remediation and preconcentration using immobilized short-chain peptides composed of aspartic acid and cysteine. En: Microchemical Journal 81 (2005) 69– 80
- Sun Wang, Nam. Amino acid assay by ninhydrin colorimetric method. [En línea]. Meryland, University of Meryland.<<http://www.glue.umd.edu/~NSW/ENCH485/lab3a.htm>> [Consulta: Feb. 2006]
- Tshuida, Yoshihisa. Method of making aspartic acid and purifying aspartase. U. S. Patent No. 4,569,911; Feb.11, 1986.
- Waller, Andrew Stuart. Process for the production of L-aspartic acid. U. S. Patent No. 6,280,980. Ago. 28, 2001.
- Zangrandi, Vitorio and Peri, Paolo. Process for the production of L-aspartic acid by fermentation of hydrocarbons. U. S. Patent No. 4013508. Mar. 22 de 1977.

SOBRE LOS AUTORES

Juan C. Oviedo L.

Investigador del CIBIOT y adscrito a la Facultad de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Pontificia Bolivariana. Magíster en Biotecnología y Estudiante de doctorado en ciencias farmacéuticas y alimentarias de la Universidad de Antioquia. Las áreas de trabajo son Bioprocesos y transformación de residuos agroindustriales por métodos biológicos.

Patricia Castrillón H.

Ingeniera Agrónoma de la Universidad Nacional Sede Medellín y Magister en Biotecnología de la Universidad Pontificia Bolivariana.

Margarita E. Ramírez C.

Profesora de la Universidad Pontificia Bolivariana en la Facultad de Ingeniería Química. Doctora en Ciencias de la Universidad Federal de Rio de Janeiro. Directora de Centro de Estudios e Investigación en Biotecnología, CIBIOT. Trabaja en temas de bioprocesos y biotecnología ambiental.

Diana M. Vanegas H.

Profesora de la Universidad Pontificia Bolivariana en la Facultad de Ingeniería Química. Estudiante de Doctorado en Ingeniería área de materiales de la misma universidad.