



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

(IZTAPALAPA)

DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA

EFECTO DE LOS IONES METALICOS EN LA
PRODUCCION DE ACIDO CITRICO POR
Aspergillus niger CULTIVADO EN MEDIO SOLIDO

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

PRESENTA

I.B.I. MARIA DEL ROSARIO PERALTA PEREZ

DR. ERNESTO FAVELA TORRES
DR. MARIANO GUTIERREZ ROJAS
DR. SERGIO HUERTA OCHOA
DR. RICHARD AURIA

PRESIDENTE
SECRETARIO
VOCAL
VOCAL

MEXICO, D. F.

NOVIEMBRE 1996

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
(IZTAPALAPA)

DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA



Casa abierta al tiempo

T E S I S

PRESENTADA EN LA UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

“EFECTO DE LOS IONES METALICOS EN LA PRODUCCION
DE ACIDO CITRICO POR *Aspergillus niger*
CULTIVADO EN MEDIO SOLIDO”

POR

MARIA DEL ROSARIO PERALTA PEREZ
ING. BIOQUIMICO INDUSTRIAL

PRESENTADA EL 5 DE NOVIEMBRE DE 1996 ANTE EL JURADO
COMPUESTO POR:

Dr. Ernesto Favela Torres
Dr. Mariano Gutiérrez Rojas
Dr. Sergio Huerta Ochoa
Dr. Richard Auria

Presidente
Secretario
Vocal
Vocal

Dedicado:

A Dios, por ser siempre generoso conmigo.

A Tata, la inspiración de mi vida.

A mami, por enseñarme con su inmenso amor a disfrutar la vida
y a mi trabajo, por exigirme ser mejor cada día.

A Chayo, por sus cuidados y su cariño.

A Luis Oscar, por su paciencia y por llenar mi vida de ilusiones.

CONTENIDO

	Página
Contenido	<i>i</i>
Agradecimientos	<i>iv</i>
1. Resumen	1
2. Introducción	3
3. Revisión Bibliográfica	5
3.1. Producción de ácido cítrico	5
3.1.1. Regulación metabólica de la síntesis de ácido cítrico.	6
3.1.2. Condiciones de cultivo que inducen la síntesis del ácido cítrico.	8
3.2. Efecto de los iones metálicos	11
3.2.1. Hierro	11
3.2.2. Cobre	12
3.2.3. Zinc	13
3.2.4. Manganeseo	13
3.2.5. Magnesio	15
3.3. Fermentación en medio sólido	16
3.3.1. Definición	16
3.3.2. Ventajas y desventajas	17
3.3.3. Soportes	17
4. Objetivo.	20
4.1. Objetivos generales	20
4.2. Objetivos particulares	20
5. Hipótesis	20
6. Materiales y métodos	21
6.1. Medios de cultivo	21
6.2. Aislamiento y conservación de la cepa	22
6.2.1.- Conservación en glicerol	23

7.3.4. Medio con 45 ppm de metales	57
7.3.5. Medio con 180 ppm de metales.	58
Conclusiones	61
7.4. Distribución de iones metálicos	62
7.4.1. Distribución de hierro	64
7.4.2. Distribución de cobre	66
7.4.3. Distribución de magnesio	67
7.4.4. Distribución de zinc	69
7.5.5. Distribución de manganeso	70
Conclusiones	71
8. Conclusiones generales.	72
9. Bibliografía.	74

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se llevó a cabo en la Planta Piloto de Fermentación Sólida del Depto. de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana (Iztapalapa), con el apoyo económico de CONACyT, bajo la dirección del Dr. Ernesto Favela Torres y el Dr. Mariano Gutiérrez Rojas a quienes agradezco profundamente su apoyo y su confianza ya que gracias a su experiencia y a la atención que me brindaron fue posible concluir con el proyecto.

Una especial mención al grupo de Aguas de la Universidad, especialmente al M.en C. Oscar Monroy Hermosillo por permitirme realizar los análisis de metales en su laboratorio, ya que fueron de gran importancia para el trabajo.

Al Dr. Gerardo Saucedo y al Dr. Sergio Huerta agradezco sus comentarios, siempre enriquecedores, así como sus palabras de apoyo en los momentos más difíciles.

A Francisco, Tina y Judy, por su confianza; y a la Dra. Judith Guzmán por su apoyo incondicional.

A todos mis compañeros de la Planta Piloto, por brindarme un agradable lugar de trabajo y por su comprensión, su apoyo y sus palabras de aliento.

A todos aquéllos que de alguna manera contribuyeron a la realización del trabajo.

G R A C I A S.

1. Resumen.

Desde hace varios años la producción de ácido cítrico por Fermentación en Estado Sólido (FES) se ha propuesto como una alternativa a la Fermentación en Medio Sumergido (FmS) debido a que los iones metálicos, que en medio líquido deben estar en concentraciones sumamente bajas provocando un alto incremento en los costos de producción, en FmS no constituyen un problema tan grave y aún cuando se cultiva al hongo sobre sustratos que contienen altas concentraciones de estos metales, el ácido cítrico se sigue produciendo. El motivo de estas discrepancias entre los dos tipos de cultivo no se ha explicado satisfactoriamente.

Por esta razón, se cultivó *Aspergillus niger* a diferentes concentraciones iniciales de metales en FES utilizando amberlita como soporte debido a que los estudios cinéticos de *Aspergillus niger* sobre soportes modelo, como esta resina, son de gran utilidad para evitar la complejidad estructural y nutritiva del sustrato sólido natural.

Cuando el hongo se cultivó en un medio sin metales se observó una baja velocidad de consumo de glucosa (0.65 mg glu/g r.s. * h); mientras que al aumentar la concentración de iones metálicos en el medio esta velocidad se incrementó cerca de diez veces. En el medio sin metales nunca se observó esporulación y el rendimiento de biomasa con respecto al sustrato ($Y_{x/s}$) presentó un valor muy bajo (0.07 g bio/g glu); mientras que al aumentar la concentración de iones metálicos el $Y_{x/s}$ máximo se presentó a las 24 h llegando a un valor entre 0.09 y 0.11 g bio/g glu. En los tres casos, el $Y_{x/s}$ varió con respecto al tiempo, como consecuencia de los cambios en las condiciones ambientales en que se desarrolló el microorganismo (disminución de la fuente de carbono, aumento de la humedad, disminución del pH, producción de metabolitos, etc.).

Como respuesta al elevado estrés osmótico de los medios de cultivo, provocado por la elevada concentración de azúcar y de los iones metálicos, se acumularon polioles como trehalosa, eritrol y glicerol; la concentración máxima así como la velocidad de síntesis y de consumo dependió del medio de cultivo. De este modo, más del 90% del carbono destinado a la formación de metabolitos se usó para sintetizar trehalosa en el medio sin metales, donde el estrés osmótico fue provocado únicamente por la glucosa, mientras que el 80% de la glucosa en el medio con 45 ppm se destinó a la síntesis de eritrol y el 60% a la síntesis de glicerol durante las primeras etapas del desarrollo del microorganismo en un medio con 180 ppm de metales, posteriormente en este mismo medio de cultivo, el 80% del carbono total inicial se dirigió a la síntesis de ácido cítrico, sugiriendo que cuando las condiciones de

estrés son extremas (debido a la concentración de azúcar y de iones metálicos) el osmorregulador preferido por el hongo bajo estas condiciones de cultivo es el glicerol aún cuando representa un mayor costo energético.

El glicerol actuó como iniciador de la acumulación de cítrico ya que se observó que el inicio del consumo de glicerol coincidió con la producción máxima de ácido cítrico.

Finalmente se encontró que todos los iones metálicos usados (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} y Zn^{2+}), se precipitaron en diferente proporción en la amberlita desde el tiempo inicial, siendo el hierro el que se precipitó en mayor cantidad (cerca del 80%) como consecuencia de su baja solubilidad; posteriormente la fracción insoluble se incrementó a través del tiempo, pero no puede atribuirse sólo al hongo debido a que el incremento encontrado es diez veces superior a lo reportado en la literatura como constituyente del micelio. Las causas que provocaron este fenómeno de insolubilización pueden atribuirse a precipitación de los metales por la liberación de iones sulfato y fosfato de la amberlita como respuesta a la modificación del microambiente por el microorganismo.

2. Introducción.

Las FES son cultivos que se han usado desde tiempos remotos y presentan notables ventajas en comparación a los cultivos líquidos. Una de las ventajas más importantes de las FES es que se obtienen productos más concentrados, como lo han demostrado estudios sobre la producción de ácido cítrico empleando diversos soportes y fuentes de nutrientes; una importante ventaja de la producción del ácido cítrico por este método radica en que la concentración de iones metálicos (limitante en FmS, debido a que es necesario disminuir su concentración, con lo cual se elevan los costos de producción) no constituye un problema y el ácido se sigue sintetizando aún en presencia de concentraciones elevadas de iones metálicos, particularmente Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} , a pesar de esto, no hay reportes que expliquen las diferencias en los dos medios de cultivo, y esta mayor tolerancia a concentraciones de iones metálicos en FES sólo se ha tratado de explicar a través de problemas de transferencia de masa dado lo complejo de los sistemas. Por esta razón, el presente trabajo se enfocó a evaluar las consecuencias de cultivar a un hongo, *Aspergillus niger*, en un medio sin metales y con altas concentraciones iniciales de Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} , buscando establecer una relación entre la concentración de estos metales y las cinéticas de metabolitos producidos haciendo un énfasis especial en la producción de ácido cítrico.

Para los estudios de FES se usó amberlita IRA-900 como soporte, pretratado para disminuir su capacidad de intercambio, puesto que es una resina de intercambio aniónico fuerte.

A fin de determinar cuál era el efecto de los iones metálicos en la producción de ácido cítrico en FES, se planteó la hipótesis de que, por problemas de transferencia de masa propios del sistema, los iones no estaban disponibles para el hongo y no era capaz de tomar la cantidad suficiente del medio por lo que el proceso de síntesis de ácido cítrico no se inhibía.

La tesis se divide en cinco partes: en primer lugar la revisión bibliográfica que ofrece panorama de los procesos implicados en el sistema con el cual se trabajó; el planteamiento de los objetivos y las hipótesis; los materiales y métodos usados en todo el trabajo y finalmente los resultados obtenidos divididos en cuatro partes:

1) Se evaluó la producción de biomasa y el consumo de glucosa. Esto se llevó a cabo a fin de determinar si la glucosa era consumida en su totalidad y determinar cuál era su destino final.

II) Se evaluó la producción de metabolitos, a fin de saber qué metabolitos se produjeron, puesto que la literatura reporta que las especies de *Aspergillus* son capaces de acumular polioles y ácidos orgánicos, especialmente ácido cítrico.

III) Se realizaron balances de materia y energía, estos proporcionan una clara idea del uso que la célula le da a la glucosa y además proporciona una idea del consumo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono y agua que no fueron cuantificados en los experimentos y que sin embargo ayudan a entender el fenómeno. Por otra parte brindaron valiosa información acerca del costo energético que representa para la célula la síntesis de los metabolitos explicando porqué se producen los más costosos bajo condiciones extremas.

IV) Se evaluó la distribución de los iones metálicos en el soporte y en la fracción soluble.

3. Revisión bibliográfica.

La revisión bibliográfica está dividida en tres subcapítulos, en el primero se aborda el tema del ácido cítrico en cuanto a su producción comercial y a la regulación de su síntesis por microorganismos, en el siguiente subcapítulo se presentan algunas definiciones y características acerca de la fermentación en medio sólido (FMS) y finalmente se aborda el tema de los iones metálicos haciendo énfasis en su efecto fisiológico, particularmente en la producción del ácido cítrico.

3.1. Producción de ácido cítrico

El ácido cítrico es un ácido orgánico no tóxico ampliamente utilizado en la industria farmacéutica y la de los alimentos. Tiene tres aplicaciones principales:

1. *Acido*: se le emplea como acidulante, para ajustar pH y como acentuador de sabor.
2. *Buffer*: es un excelente amortiguador de pH en el rango de 2.5 a 6.5.
3. *Quelante*: secuestra cationes, especialmente se le usa en el tratamiento de aguas duras.

Diversas industrias han dirigido sus esfuerzos en la producción a escala industrial de este ácido; hacia 1992 se estimó que la producción mundial fue de 500,000 ton anuales, de las cuales sólo 18,000 fueron producidas en México. La demanda del ácido cítrico se incrementa año con año, por lo que las industrias que lo producen se ven obligadas a buscar la forma más económica, eficiente e incluso nuevos procesos para poder satisfacer la demanda (Shakaranand y Lonsane, 1994).

El ácido cítrico se produce, a escala industrial, por cultivo superficial o sumergido. Para ello se han usado microorganismos tales como *Candida spp* y *Aspergillus niger*, éste último se emplea preferentemente por su gran capacidad de acumulación de ácido cítrico (Atkinson, 1983).

Se ha reportado que usando *A. niger* se logran producciones, a nivel laboratorio, de hasta 90% en peso de ácido cítrico a partir de sacarosa; producciones más bajas pueden deberse a la degeneración de la cepa, a la presencia de iones metálicos o a la desviación del metabolismo para producir otros ácidos (Kubicek y Röhr, 1982).

Los estudios fisiológicos de la producción de ácido cítrico por *Aspergillus niger* en medio sumergido se han enfocado principalmente a dos aspectos (Kubicek y Röhr, 1982):

1. A la regulación metabólica de la producción de ácido.
2. A la regulación del catabolismo del ácido producido.

La producción de ácido cítrico ha sido objeto de estudio de los últimos 90 años y desde 1963 se ha considerado como el resultado de un malfuncionamiento metabólico de *Aspergillus niger* a bajos valores de pH y elevadas concentraciones de azúcar bajo condiciones de limitación de crecimiento, definición que puede considerarse un resumen de los motivos que inducen a su acumulación (Trumpy y Millis, 1963).

El crecimiento puede limitarse en base a deficiencias nutricionales; generalmente, el hongo se cultiva en un medio limitado de nitrógeno, fosfato y iones metálicos. Se ha sugerido que la acumulación de citrato por deficiencia de nutrientes se provoca debido a que se favorece la conversión de metabolitos intermediarios en material celular, estos intermediarios se acumulan y tienen que salir, tal es el caso del citrato (Wold y Suzuki, 1976a).

La fermentación para la producción de ácido cítrico se puede dividir en dos fases consecutivas:

- 1) Una fase de crecimiento, cuando las células proliferan y no se observa acumulación de citrato.
- 2) Una fase de acumulación, cuando el citrato se excreta pero no se observa una gran proliferación de células. La preferencia por alguna de las fases parece estar controlada por el Zn^{2+} : altas concentraciones de zinc mantienen la fase de crecimiento; bajo condiciones de deficiencia de zinc hay una aparente transición hacia la fase de acumulación de cítrico (Wold y Suzuki, 1976b)

3.1.1. Regulación metabólica de la síntesis de ácido cítrico

Las especies de *Aspergillus* acumulan ácidos orgánicos en grandes cantidades. Usan dos vías distintas para el catabolismo de la glucosa: Embden-Merhof-Parnas (EMP) y la vía de las pentosas (HMP). Se pueden apreciar dos grupos de metabolitos acumulados: aquellos productos formados por intermediarios glicolíticos (polioles) y aquellos relacionados con la operación del ciclo de los ácidos tricarbónicos (ácidos orgánicos). La formación de polioles y ácidos orgánicos muestra una relación recíproca, así que la alta acumulación de polioles está asociada a una baja producción de ácidos

orgánicos y viceversa, esto sugiere un punto regulatorio común. La acumulación de estos metabolitos depende de las condiciones de cultivo en las cuales se desarrolle el microorganismo.

Se ha observado que cuando *A. niger* se cultiva en un medio con elevada concentración de azúcar se ve obligado sintetizar polioles con la finalidad de mantener un balance de su presión osmótica interna con la presión osmótica externa (Brown y Simpson, 1974). Por esta razón, los polioles son denominados “solutos compatibles”, como ejemplos se pueden citar eritrol, glicerol, manitol, arabinol y trehalosa, entre otros; estos compuestos además pueden ser usados como carbohidratos de reserva. El glicerol es el principal osmoregulador, su biosíntesis requiere de gliceraldehído 3 fosfato como precursor, uno de los productos de la vía HMP, por lo que se ha sugerido que en las primeras etapas de crecimiento esta vía es predominante (Legisa y Matthey, 1986a y b).

El glicerol comienza a acumularse en el citoplasma y también parte se excreta al medio, cuando la concentración intracelular del glicerol es elevada, inhibe parcialmente a la 6-fosfogluconato deshidrogenasa, que constituye el principal sitio regulador de la vía HMP, por lo que el metabolismo por esta vía se detiene y se orienta hacia la vía EMP. Por otra parte, el glicerol acumulado también inhibe a la enzima isocitrato deshidrogenasa, que cataliza el paso de la isocitrato a α -cetoglutarato en el ciclo de Krebs, favoreciendo la acumulación del ácido cítrico (Legisa y Matthey, 1986b). De esta forma se empieza a acumular el cítrico hasta que su concentración es tan elevada que inhibe totalmente a la fosfogluconato deshidrogenasa por lo que se detiene la vía HMP y cesa la síntesis de glicerol; el glicerol se empieza a consumir paulatinamente y cuando desaparece hay suficiente cítrico como para disminuir el pH intracelular de 7.1 a 6.5, la isocitrato deshidrogenasa es muy sensible a pequeñas disminuciones de pH por lo que este evento bloquea a la enzima y el citrato se sigue acumulando (Legisa y Kidric, 1989).

La vía EMP debe estar desinhibida para lograr la acumulación del ácido cítrico, su regulación en *A. niger* parece involucrar al menos tres enzimas clave: la hexoquinasa, la fosfofructoquinasa y la piruvato quinasa; siendo la fosfofructoquinasa la enzima que se considera el punto regulatorio más importante de la vía por ser susceptible a varios controles finos: activación por fructosa 2,6 bifosfato, AMP y NH_4^+ así como inhibición por fosfoenolpiruvato, citrato y ATP (Voet y Voet, 1990). Cuando esta enzima está inhibida el flujo a través de esta vía se hace muy lento por lo que la síntesis de ácido cítrico se vuelve también muy lenta así que se propuso que la fosfofructoquinasa es el punto de control metabólico más importante en la biosíntesis de ácido cítrico (Ma. y col. 1985).

También la aconitasa y la α -cetoglutarato deshidrogenasa, enzimas presentes en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, deben estar inhibidas para lograr la acumulación del ácido (Nâuser, 1966). La aconitasa cataliza la reacción reversible de isomerización de citrato e isocitrato con cis aconitato y requiere de Fe^{2+} como cofactor; mientras que la α -cetoglutarato cataliza la descarboxilación oxidativa de un α -ceto ácido (α -cetoglutarato) rindiendo la segunda molécula de CO_2 y NADH, esta enzima requiere Mn^{2+} o Mg^{2+} como cofactor. Por esta razón, se piensa que la concentración de iones metálicos debe ser baja en el medio de cultivo para lograr grandes acumulaciones del ácido.

La aconitasa, la isocitrato deshidrogenasa y la α -cetoglutarato deshidrogenasa tienen energía libre negativa y constituyen puntos de control del ciclo de Krebs (Voet y Voet, 1990). Todos los puntos de regulación mencionados se muestran en la Figura 3.1.

Bajo condiciones de estrés osmótico debido a las altas concentraciones de azúcar en el medio de cultivo, *A. niger* tiene a capacidad de formar glucosa oxidasa la cual cataliza la formación de δ -gluconato a partir de glucosa. La formación de esta enzima es inducida por elevadas concentraciones de glucosa en presencia de bajas concentraciones de otros constituyentes como nitrógeno y fosfatos (Roehr y col., 1992). La formación de glucosa oxidasa parece ser la respuesta común al incremento de la fuente de carbono, se forma H_2O_2 el pH tiende a disminuir por lo que es posible que inhiba a la isocitrato deshidrogenasa favoreciendo también la acumulación de ácido cítrico. Se ha reportado que casi toda la glucosa oxidasa se localiza extracelularmente, sin embargo, también se ha detectado actividad intracelular en los peroxisomas.

3.1.1.2. Condiciones de cultivo que inducen la síntesis del ácido cítrico.

La formación de todos los ácidos orgánicos se incrementa bajo condiciones de fuerte aireación. Una elevada tensión de O_2 induce una vía alternativa de respiración estimulando la producción de intermediarios de la glicólisis.

El pH también tiene una marcada influencia por ejemplo, a pH ligeramente neutro produce ácido gluconico, málico y oxálico mientras que el cítrico aparece en cantidades significativas cuando el pH está abajo de 2.5. Como ya se mencionó en 3.1.1.1., hay reportes donde se explica el papel del pH en términos de inactivación de algunas enzimas (Legisa y Kidric, 1989); algunas enzimas difieren en sus

propiedades cinéticas y regulatorias cuando los cambios de pH son superiores a una unidad como es el caso de la isocitrato deshidrogenasa.

En general, sólo los azúcares que puedan ser consumidos rápidamente por el hongo promueven altas tasas de acumulación de ácidos. Roehr y col. (1992) propusieron que elevadas concentraciones de la fuente de carbono apropiada conduce a la represión de la α -cetoglutarato deshidrogenasa. Kubicek-Pranz (1990) cultivó *A. niger* con baja y alta concentración de sacarosa y en esta última indujo la acumulación de ácido cítrico. Esta inducción es paralela a un incremento de la concentración intracelular de fructosa 2,6 diP la cual es necesaria para la activación de la glicólisis.

Bajas concentraciones de fosfato y de nitrógeno favorecen la acumulación de ácidos orgánicos. Una estricta deficiencia de fosfatos parece requerirse por la glucosa oxidasa y la formación de gluconato (Roehr et al, 1992). Se sabe que el nitrógeno debe ser limitante en cultivos continuos y por lote alimentado pero no está muy claro como es que el NH_4^+ intracelular favorece la producción.

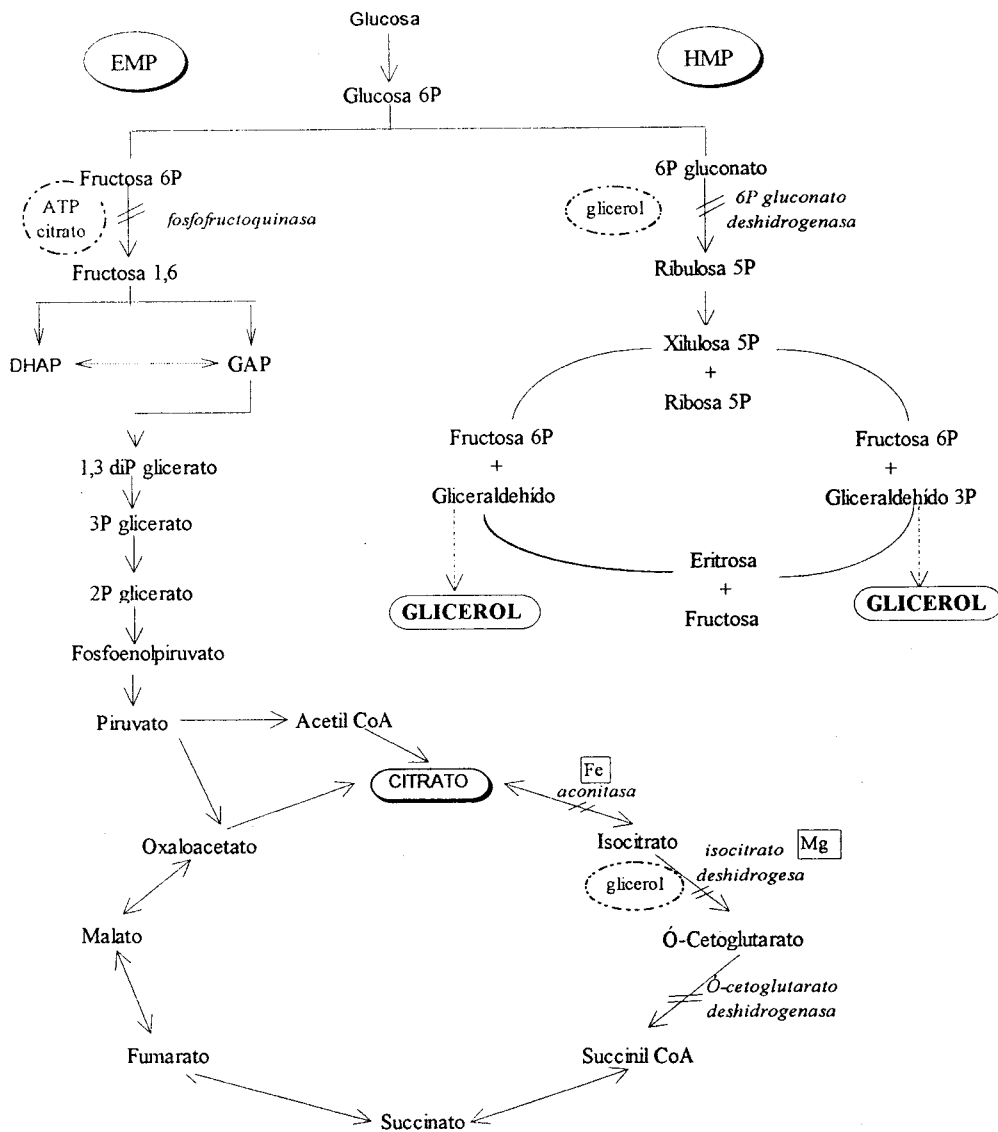


Figura 3.1. Regulación de la producción del ácido cítrico.

// Puntos de regulación. - - - - - Compuestos que inhiben Cofactores.

3.2 Efecto de los iones metálicos.

La identificación de la función precisa que juegan los minerales en la fisiología de los microbios se dio lenta y esporádicamente durante el primer centenario de la microbiología. Se encontró que la cantidad de metal que es necesaria y tolerada por las células microbianas para su crecimiento puede ser distinta a la requerida y/o permitida para llevar a cabo procesos fisiológicos específicos.

En el año de 1951 apareció el primer reporte donde se concluye que la deficiencia parcial de metales traza provocan un incremento en la producción de ácido cítrico cuando se usa *Aspergillus niger* como inóculo en medio sumergido o superficial. En este reporte se dice que tanto el Zn^{2+} como Fe^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} y Mg^{2+} afectan el "coeficiente de economía" de la célula (definido como peso del micelio/glucosa usada) (Chester y Rolinson, 1951). A partir de entonces existen diversos estudios encaminados a esclarecer el papel que juegan estos iones en la acumulación del ácido cítrico por *A. niger*.

El Cu^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} y el Zn^{2+} son considerados "elementos traza" y normalmente la cantidad adecuada de estos metales para el desarrollo de los microorganismos está presente como contaminación de otros constituyentes del medio, mientras que el Mg^{2+} es considerado como un micronutriente y se le ha reconocido como un elemento esencial de las células desde hace 60 años (da Silva y Williams, 1993). Se ha estimado que la composición de la biomasa en cuanto a estos metales es: 15 mg Fe^{2+} /100g biomasa seca; 5 mg Mn^{2+} /100 g biomasa seca; 5 mg Zn^{2+} /100 g biomasa seca y un mg Cu^{2+} /100g biomasa seca. Cada uno de estos iones juegan un papel específico en los procesos que llevan a cabo los microorganismos, aunque hay algunos trabajos pioneros en cuanto al efecto conjunto de varios de estos iones metálicos, sin embargo los resultados no son muy claros y es difícil interpretarlos (Shakaranand y Lonsane, 1994).

3.2.1 Fierro.

El fierro está involucrado en diversos procesos esenciales de las células debido a su característica estructura atómica; es un cofactor que presenta dos valencias con una reactividad dentro de un amplio rango de potencial de oxidación-reducción (Byers y Arceneaux, 1977). Su estado de oxidación y su habilidad de transferencia de electrones puede modificarse debido al ambiente (Guerinot, 1994).

La deficiencia de hierro se refleja generalmente en una inhibición parcial o total del crecimiento (Pirt, 1975; Byers y Arceneaux, 1977), por lo que se considera un factor de crecimiento esencial en las etapas tempranas de la fermentación. Por otra parte, el hierro puede tener gran influencia en el metabolismo celular debido a su capacidad catalítica por lo que posiblemente posea funciones regulatorias; en este sentido, se sabe que el ciclo de Krebs y la cadena respiratoria presentan enzimas que requieren hierro; bajo condiciones de limitación de hierro, los microorganismos aerobios pueden satisfacer parcialmente sus requerimientos energéticos mediante la glicólisis y mantener inhibida parcialmente a la aconitasa lo que favorece la acumulación de ácido cítrico. En un cultivo sumergido, no se trabaja con concentraciones mayores de 0.2 ppm de este metal (Shakaranand y Lonsane 1994). La asimilación de hierro presenta dos problemas para los microbios: a) primero deben asimilarlo; b) deben regular cuánto toman ya que su exceso puede provocar estragos celulares. Dada su baja solubilidad, para poder asimilarlo, los microorganismos han desarrollado la capacidad de producción de ciertos quelantes denominados “sideróforos” los cuales se excretan al exterior, atrapan la forma férrica y posteriormente son transportados al interior de las células, tanto los sideróforos como los sistemas de transporte son regulados en base a la disponibilidad del hierro. Específicamente, los hongos producen dos sideróforos de tipo cíclico: fericromo y fericromo A (Guerinot, 1994).

3.2.2. Cobre.

El cobre es un cofactor enzimático necesario para las peptidasas y debe estar presente en la oxidasa terminal de la vía respiratoria de las levaduras; por lo que es necesaria su presencia en las mitocondrias y su deficiencia provoca el alargamiento de las mismas, afectando los procesos que en ella se llevan a cabo.

Aparentemente la presencia de este ión metálico no provoca un decremento tan drástico en la producción de ácido cítrico y experimentalmente se ha observado que 100 ppm favorecen una alta producción de ácido cítrico aunque no se ha aclarado cuál es la razón de esta acumulación de ácido (Roukas y Kotzekidou, 1986).

3.2.3. Zinc.

Todos los sistemas vivos requieren pequeñas cantidades de zinc para crecer y efectuar su metabolismo normal. Se sabe que el zinc es esencial para:

- i) Activar a más de 25 enzimas, la glucosa 6-fosfato y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa, enzimas clave de la glicólisis de *Aspergillus niger*.
- ii) El metabolismo de ácidos nucleicos y la división celular.
- iii) Interactuar con las proteínas, ayudando a mantener su conformación nativa, así como con las proteínas de las membranas.
- iv) Estabilizar los microtúbulos, que son organelos esenciales en los movimientos intracelulares de los procesos de división celular así como de motilidad.
- v) Estabilizar los ribosomas.

Varios estudios han sugerido que el Zn^{-2} y el Cu^{+2} son requeridos en los procesos de transcripción y de replicación celular (Failla, 1977).

Al parecer el Zn^{2+} controla la alternativa crecimiento-acidogénesis, bajas concentraciones de este ión favorecen la acumulación de ácido cítrico (10.9 ppm) y casi no afectan el crecimiento del micelio, mientras que concentraciones elevadas del metal (170 ppm) provocan un drástico decremento en la producción del ácido favoreciendo el crecimiento de las células (Roukas y Kotzekidou, 1987). Para la producción de ácido cítrico, en fermentación sumergida se trabaja hasta con 0.3 ppm de Zn^{2+} .

El Zn^{2+} también influye en sistemas enzimáticos asociados con el metabolismo de azúcares en *A. niger*, se ha propuesto que este metal es necesario para inducir la síntesis de fosfofructoquinasa, pero se desconoce el mecanismo de activación de la enzima.

3.2.4 Manganeseo.

El manganeseo se requiere para la síntesis de muchos metabolitos secundarios, estimula la esporulación de bacterias y es esencial para el funcionamiento de muchas enzimas. Para un gran número de enzimas, el Mn^{2+} puede servir como cofactor alternativo del Mg^{2+} ; algunas veces una enzima de una fuente microbiana que parece tener un requerimiento específico por Mn^{2+} puede usar Mg^{2+} , Zn^{2+} o Co^{2+} (Silver y Jasper, 1977).

En cuanto a la morfología del hongo, el déficit de manganeso provoca que el micelio sea fuertemente vacuolado, septado y con gruesas y espesas paredes celulares. Esto podría estar relacionado con la pérdida de orientación apical del crecimiento y la desorientación del transporte de vesículas. Los cambios inducidos por la deficiencia de Mn^{2+} en levaduras y hongos han sido atribuidos en parte a cambios en el metabolismo del AMP cíclico, los cuales afectan la proteína quinasa-dependiente de las vesículas de transporte de los microtúbulos.

Varios autores sugieren que la deficiencia de Mn^{2+} es obligatoria para tener elevadas concentraciones de citrato debido a que este ión puede actuar como cofactor de la isocitrato deshidrogenasa. Otra sugerencia radica en que la deficiencia de Mn^{2+} puede provocar daño en la síntesis de macromoléculas, posiblemente induce un incremento de la degradación de proteínas y como consecuencia se eleva la concentración miceliar de NH_4^+ , por lo que la fosfofructoquinasa se activa acelerándose la glicólisis. Esta teoría ha sido soportada mediante el aislamiento de cepas mutantes en las cuales la PFK es parcialmente insensible al citrato y simultáneamente son menos sensibles a la presencia de Mn^{2+} con respecto a la acumulación del ácido cítrico. La razón del deterioro de la síntesis de proteínas ha sido asumida como un malfuncionamiento de los ribosomas (Ma y col. 1985).

También se ha observado que se inhibe la síntesis de triglicéridos y fosfolípidos y que ocurren cambios en la tasa de ácidos grasos saturados e insaturados y la cantidad de lípidos de las membranas plasmáticas aisladas y de la pared celular del hongo. Estos se resúmen en la tabla 3.2.

Tabla 3.2. Cambios en la composición de la pared celular en presencia (+) y en ausencia (-) de manganeso en *Aspergillus niger*.

Constituyentes	%pared celular peso seco	
	Mn+	Mn-
Carbohidratos	80.75	64.95
Aminoazúcares	7.8	18.05
Proteínas	2.9	2.4
Lípidos	0.5	0.5

Kisser y col. 1980

Elevadas concentraciones de manganeso pueden modificar la permeabilidad de la membrana dificultando la excreción del cítrico (Kubicek y Röhr, 1982). Dado que se modifica la composición

lipídica de la membrana celular y se sabe que los lípidos influyen en el transporte a través de la membrana, se ha sugerido que bajo condiciones de deficiencia de este ion se favorece la excreción del ácido cítrico durante la etapa de crecimiento micelial (Legisa y Kidric, 1989). El nivel usado para la producción de ácido cítrico en cultivo sumergido es de 0.2 ppb.

3.2.5. Magnesio.

El magnesio es el segundo catión intracelular más abundante y es cofactor de más de 300 enzimas. Tiene una función estructural en los tejidos, proteínas y membranas, y probablemente tiene la función de modular el metabolismo intracelular (Wacker, 1993).

Hay estudios que han demostrado que las células son capaces de acumular selectivamente magnesio y discriminar entre varios cationes lo que sugiere la existencia de complejos sistemas para el transporte. El magnesio es un elemento esencial, los procesos biológicos en que participa son:

- i) Síntesis de DNA y RNA.
- ii) Síntesis de proteínas.
- iii) Transporte de membrana.
- iv) División celular.
- v) Fosforilación oxidativa.

El Mg^{2+} se asocia con los ribosomas y está estrechamente ligado a ellos. Una parte del magnesio está asociado con la pared de las bacterias y se le asocia con el mantenimiento de la pared celular, una pequeña disminución en el medio de la concentración de este metal provoca una disminución de la porosidad de la membrana (entendiendo por "porosidad" a la capacidad de excluir polioles y azúcares neutros) probablemente ésta sea una de las razones por las cuales una deficiencia de este ión favorece la acumulación de ácido cítrico.

Se ha propuesto que el Mg^{2+} es esencial para la división celular, posiblemente promueve el rompimiento de los microtúbulos que involucran la división nuclear.

Su concentración intracelular depende, en algunos hongos como *Penicillium chrysogenum*, de la concentración de otros iones como el Fe^{3+} y el PO_4^{4-} en el medio de crecimiento así como de la etapa de desarrollo del hongo y de su tasa de crecimiento.

El Mg^{2+} es esencial para el crecimiento y el metabolismo de *A. niger*. Para obtener altas concentraciones de ácido cítrico se ha sugerido, para cultivo en medio líquido, emplear concentraciones no mayores a 2 mg/l (Shakaranand y Lonsane, 1994).

3.3. Fermentación en Medio Sólido.

3.3.1. Definición.

La fermentación en Medio Sólido (FMS) se refiere al tratamiento de un material húmedo, no suspendido en el agua y sin escurrimiento acuoso, que permite el desarrollo de una fermentación empleando uno o varios microorganismos. La FMS se distingue de los cultivos sumergidos por el hecho de que el crecimiento microbiano y la formación de producto ocurren sobre la superficie del material sólido (Mudgett, 1986). La utilización de las técnicas de FMS para el aprovechamiento de diferentes materiales, se realiza cotidianamente en países orientales desde los orígenes mismos de la cultura (Gutiérrez y Favela, 1992).

En los sustratos sólidos se observa una mezcla gas-líquido-sólido en la cual la fase acuosa está íntimamente asociada a la superficie sólida en varios estados de adsorción y está en contacto con una fase gaseosa continua con el gas externo del ambiente (Mudgett, 1986).

Se han obtenido resultados muy satisfactorios en las FMS cuando se trabaja con hongos filamentosos pues presentan una mayor versatilidad y facilidad de manejo. Entre las ventajas que presentan estos microorganismos se puede decir que crecen a bajos pH con lo que se evitan eventuales contaminaciones bacterianas, esporulan fácilmente y son medianamente productores de enzimas, antibióticos u otro producto de interés (Gutiérrez y Favela, 1992).

Se ha sugerido en trabajos recientes que la FMS vence la represión catabólica y la inhibición por producto final y se inducen cambios en las características de las enzimas (Shakaranand y col., 1992), en este sentido se han producido enzimas amilolíticas con una estabilidad mayor a las obtenidas por cultivo líquido (Shan y col., 1991) o bien con patrones regulatorios completamente diferentes y más favorables (Ramesh y Lonsane, 1991). También se ha observado una mayor excreción de enzimas al

medio como la α -galactosidasa que en fermentación en medio sumergido se produce intracelularmente (Shankaranand y col., 1992).

3.2.2. Ventajas y desventajas.

Los procesos de FMS tienen grandes ventajas sobre las fermentaciones líquidas, aunque también presentan desventajas. Ambas se listan en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Ventajas y desventajas de la FMS

VENTAJAS:

- i) Algunos sustratos sólidos pueden ser enriquecidos sólo con agua o con algún nutriente.
- ii) Los productos se obtienen muy concentrados reduciéndose los efluentes contaminantes.
- iii) Los productos de fermentación pueden ser extraídos mediante la adición directa de solventes, o mantenerse almacenados en refrigeración hasta su extracción.
- iv) Algunos de los productos pueden incorporarse directamente como alimento para animales.
- v) Las condiciones de crecimiento microbiano son más favorables por asemejarse a las de su hábitat natural.
- vi) La baja humedad del medio reduce los problemas de contaminación por lo que en muchos casos no se requieren condiciones estrictas de esterilidad.
- vii) Los rendimientos de producto pueden ser mucho más altos que los logrados en cultivos líquidos.

DESVENTAJAS:

- i) Las fermentaciones que requieren agitación continua implican un gran consumo de potencia.
- ii) Las adiciones de agua en etapas tempranas de la fermentación incrementan el riesgo de contaminación bacteriana.
- iii) Es necesario inocular una alta concentración de esporas.
- iv) Algunos sustratos agrícolas usados como soporte necesitan pretratamiento.
- v) Se tiene poco conocimiento sobre la ingeniería de los sistemas por lo que se dificulta el escalamiento.
- vi) Suelen presentarse problemas de transferencia de calor y masa, que conducen a que se presenten gradientes de temperatura, pH, sustratos, etc.
- vi) Las variables fisicoquímicas no se controlan fácilmente.
- vii) Es difícil la cuantificación de la biomasa.

Mudgett, 1986.

3.2.3. Soportes.

La elección del soporte constituye un punto importante para tener resultados satisfactorios en una FMS, en general las partículas pequeñas proveen una gran área superficial para la transferencia de

calor y el intercambio gaseoso, en general el soporte sobre el que se desarrollará el microorganismo de interés debe tener las siguientes características:

1. Ser inertes.
2. Porosidad y espacios libres disponibles.
3. Con resistencia mecánica para poder ser empacados.
4. Capacidad de retención de agua y nutrientes solubles.

Algunos ejemplos de soportes que se han empleado son bagazo de caña (Lakshminarayana y col., 1975); desechos de manzana (Hang y Woodams, 1987); cáscara de naranja (Aravantinos-Zafirís y col., 1994); desechos de piña (Tran y Mitchel, 1994) así como bagazo de yuca (Soccol, 1996) entre otros. En estos últimos casos el soporte también constituyó la fuente de carbono y energía del microorganismo, por lo que el estudio se vuelve más complejo. Para simplificar un poco la complejidad del sistema, en investigaciones recientes se han buscado “soportes modelo” que buscan evitar la heterogeneidad estructural así como la irregularidad de las partículas en cuanto a forma y tamaño, con la finalidad de facilitar el estudio del sistema (Auria y col., 1990).

Un soporte con el cual se han realizado algunos estudios recientes es la amberlita, la cual es considerada como un soporte modelo (Auria, 1990; Gutiérrez, 1995a y Gutiérrez, 1995b). La amberlita IRA-900 es una resina de intercambio aniónico base fuerte constituida por poliestireno de trimetil amonio que posee una estructura y tamaño de partícula bien definida; porosidad, densidad y propiedades químicas conocidas (Auria, 1990; Amar, 1994).

Las áreas en las que se aplican las FMS son muy numerosas y el potencial de nuevas aplicaciones aún está poco explotado. Uno de los productos que ha provocado el interés de algunos investigadores es el ácido cítrico. El primer reporte que se tiene es de Cahn y fue publicado en 1936, posteriormente, en 1975 apareció otro trabajo más acerca de la producción de ácido cítrico en medio sólido usando *Aspergillus niger* como inóculo y bagazo de caña de azúcar como soporte; en ambos reportes se menciona una gran producción de ácido cítrico (hasta 62.8% en peso) (Lakshminarayana y col., 1975).

El cultivo en medio sólido se perfila como una posible opción para la producción de ácido cítrico. Se sabe que una quinta parte del ácido cítrico que se produce en Japón es por cultivo en medio sólido y en 1974 la producción ascendió a 4,000 ton/año. Se usaba como fuente de carbono almidón y salvado de arroz (Yamada, 1977).

También se han probado otros soportes y fuentes de carbono para la producción de este ácido, como pulpa de manzana, añadiendo metanol al medio para alcanzar altas producciones de cítrico (Hang y Woodams, 1987). Se ha visto que las tasas de producción de ácido cítrico y consumo de sustrato en medio sólido usando pulpa de manzana se ven fuertemente influenciadas por:

- a) La tasa de aereación.
- b) La temperatura de la fermentación.
- c) La cantidad inicial de sustrato.
- d) El tamaño del inóculo.

Así, fue posible obtener producciones aproximadamente de 130 g de ácido cítrico por kilogramo de pulpa de manzana fermentada (Hang, 1988).

Estudios más recientes, en Australia se ha propuesto el uso de cáscara de piña que es un subproducto de la extracción del jugo de la fruta como soporte y fuente de nutrientes para la producción de ácido cítrico por fermentación en medio sólido obteniéndose un rendimiento del 62.5% en base al azúcar consumido (Tran y Mitchell, 1995).

Se ha observado que usando como soporte amberlita y haciendo crecer a *Aspergillus niger* No. 10 en altas concentraciones de azúcar (hasta 450 mg/g r.s.) en un medio limitado sólo por nitrógeno se obtuvieron concentraciones de hasta 120 mg/g r.s. de ácido cítrico (Córdova, 1994).

Una gran desventaja de la FmS para la producción de ácido cítrico es que la cantidad de metales traza (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+}) necesariamente deben encontrarse en niveles muy bajos cuando *Aspergillus niger* es cultivado en medio sumergido a fin de inhibir enzimas claves que favorecen la acumulación del ácido, por lo que se necesita pretratar el agua de proceso o los extractos crudos que se usan para la fermentación usando columnas de intercambio iónico o agregando agentes quelantes como ferrocianidina o EDTA, lo cual incrementa los costos de producción (Wold y Suzuki, 1976a; Roukas y Kotzekidou, 1987).

Estas discrepancias en la producción de ácido cítrico por FMS y medio sumergido se han atribuido a la naturaleza heterogénea de los materiales empleados (como cereales) y a los gradientes de concentración de los iones metálicos y sales minerales del medio, a que los minerales presentes no estén disponibles para la célula debido a las limitaciones del agua (Shakaranand y Lonsane, 1994). Sin embargo, no se tiene una clara idea de los motivos que provocan estas discrepancias.

4. Objetivos.

4.1. Objetivo general.

Determinar los mecanismos que influyen en la producción de ácido cítrico en presencia de diferentes concentraciones de los siguientes iones metálicos: Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} y Mg^{2+} en fermentación en medio sólido.

4.2. Objetivos particulares.

1. Realizar cinéticas de biomasa, consumo de azúcar y producción de metabolitos empleando medios de cultivo que favorezcan la producción de ácido cítrico y modificando la concentración inicial de iones metálicos.
2. Realizar balances de materia y energía de las diferentes fermentaciones.
3. Evaluar la distribución de los iones metálicos en las fermentaciones realizadas.

5. Hipótesis.

Debido a la complejidad del sistema y a los problemas de transferencia de masa que se presentan en el medio sólido, los iones metálicos, en elevadas concentraciones iniciales, no están disponibles para el microorganismo por lo que se favorece la síntesis de ácido cítrico.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1. Medios de cultivo.

Se trabajó con diferentes medios de cultivo, en todos los casos se empleó agua desionizada, la composición de los medios se especifican en la Tabla 6.1:

Medio A: Empleado para la propagación de esporas previo a la conservación de la cepa.

Medio B: Medio para la producción de esporas que se usaron como inóculo de las fermentaciones sólidas.

Medio C: Para la producción de biomasa empleada para establecer las técnicas de digestión de muestras y determinación de biomasa.

Medio D: Para todas las fermentaciones en medio sólido.

Tabla 6.1. Composición de los medios de cultivo.

Componente	A (g/l) Propagación.	B (g/l) Producción de esporas	C (g/l) Producción de biomasa	D (g/l) Cultivo Sólido
Glucosa	30	30	300	300
KH ₂ PO ₄	1	2.47	2.47	2.47
K ₂ HPO ₄	--	--	--	--
(NH ₄) ₂ SO ₄	3	2.2	6.6	6.6
CaCl ₂	--	0.48	0.48	0.48
KCl	0.5	--	--	--
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5	0.38	0.38	variable
NaCl	--	0.32	0.32	0.23
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01	0.124	0.124	variable
Oligoelementos	--	1 ml	1 ml	1 ml *
Agar	15	15	--	--

* La solución de oligoelementos es la misma sin tomar en cuenta las fuentes de Zn, Mn y Cu debido a que éstas se adicionaron aparte hasta completar las concentraciones iniciales deseadas de metales.

La solución de oligoelementos es la siguiente:

Componente	Concentración g/l
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2.2
H ₃ BO ₃	1.1
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.5
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.16
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.16

Para las fermentaciones sólidas las fuentes de Fe, Mg, Mn, Cu y Zn se adicionaron hasta completar 45 y 180 mg de metal por gramo de resina seca, otro de los medios no fue suplementado con estos iones.

Los medios A, B y C se esterilizaron a 150 psi durante 15 min, el medio D no fue esterilizado debido a que durante las FES no se trabajó con condiciones estrictas de asepsia.

6.2. Aislamiento y conservación de la cepa.

La cepa con la que se trabajó fue *Aspergillus niger* No. 10, debido a que existen varios trabajos previos que demuestran que es capaz de crecer en altas concentraciones de glucosa y puede acumular ácido cítrico (Raimbault y Alazard, 1980; Oriol y col., 1988; Córdova, 1994).

Fue necesario aislar una colonia a fin de garantizar un cultivo axénico para posteriormente conservarla y tener una reserva suficiente para realizar todos los estudios.

Se trabajó con dos viales conservados en glicerol, estos viales se colocaron en un baño de agua a 35°C durante 15 min., posteriormente cada uno se vació en un matraz de 250 ml que contenía 30 ml de PDA previamente esterilizado. Se incubaron a 35°C durante cuatro días (tiempo en el cual se logró una esporulación abundante). Posteriormente se sembraron por estría cuatro cajas petri que contenían el medio A, se incubaron 2 días a 35°C y se seleccionó una colonia para resembrarla nuevamente repitiendo esta operación hasta completar dos ciclos.

La colonia aislada de esta manera se sembró por estría en 5 tubos inclinados que contenían 15 ml de medio de cultivo A y se incubaron por cuatro días a la misma temperatura, tiempo en el cual esporularon abundantemente. Para cosechar las esporas, se agregó a uno de estos tubos 8 ml de tween al 0.05% y se agitó con un vórtex. Se tomaron 1.5 ml de la suspensión de esporas obtenida

para agregarla a cinco matraces de trabajo con el mismo medio de cultivo y se incubaron durante 5 días a la misma temperatura.

Se procedió después a la conservación empleando dos métodos: *i*) conservación en glicerol; *ii*) liofilización de la cepa

6.2.1. Conservación en glicerol.

La congelación con glicerol garantiza la viabilidad de las esporas por varios meses, así que las esporas conservadas por este método fueron las empleadas rutinariamente en los experimentos.

Las esporas de un matraz de trabajo fueron cosechadas con una solución de glicerol al 10% como crioprotector. Un ml de esta suspensión de esporas (con una concentración de $32.5 \cdot 10^6$ esp/ml) se colocó en cada uno de 20 viales previamente esterilizados, y fueron conservados a -20°C .

6.2.2. Liofilización de la cepa.

Las esporas de un matraz de trabajo se cosecharon con tween 80 al 0.05% obteniéndose una suspensión con una concentración de $75 \cdot 10^6$ esp/ml. Un ml de esta suspensión se colocó en 9 ml de leche descremada como crioprotector y de esta nueva suspensión se tomaron 0.5 ml y se colocaron en las ampolletas para liofilizar. Estas ampolletas se congelaron con nitrógeno líquido y se sellaron al vacío. Se obtuvieron en total 9 ampolletas con la cepa liofilizada.

6.3. Conteo de esporas.

El conteo de esporas se realizó en la cámara de Neubauer con el siguiente procedimiento:

A la cámara de Neubauer se le adicionó suspensión de esporas previamente diluida para tener entre 20 y 50 esporas por cuadro. Se observó en el microscopio Zeiss, con el objetivo de 40X, y se procedió a contar 13 cuadros seleccionados al azar. El promedio de esporas por cuadro, se transformó a concentración de esporas (esporas/ml), considerando que 25 cuadros contienen $1 \cdot 10^{-4}$ ml. Las esporas que normalmente se contaron bajo este método fueron $1 \cdot 10^8$ esp/ml.

6.4. Tratamiento de la Amberlita IRA-900.

La amberlita IRA-900 es una resina de intercambio aniónico fuerte (Rohm and Hass, de México) y es necesario darle un previo tratamiento a fin de saturarla y evitar a la absorción de iones que forman parte del medio de cultivo y son esenciales para el desarrollo del hongo. El tratamiento consistió en adicionar una solución de KH_2PO_4 34 g/l y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 33 g/l a la resina en relación 2 ml:1 g resina. Se dejó en contacto durante 1 hr a 35°C , se filtró y adicionó solución nueva repitiendo el proceso hasta completar 4 tratamientos (Gutiérrez y col., 1995). Finalmente se lavó con agua desionizada en relación 1.5:1 poniéndola en agitación suave durante 15 min. hasta completar 3 ciclos. El lavado es muy importante ya que con él se pretende eliminar el exceso de amonio y potasio los cuales podrían modificar el comportamiento metabólico del microorganismo. Finalmente, se secó durante 24 h a 70°C , y se conservó en frascos de vidrio secos para su posterior uso.

6.5. Fermentaciones en medio sólido.

Se trabajó con columnas de vidrio de 1.1 cm de diámetro interno y 15 cm de altura; se usó un tapón de algodón en la parte inferior para evitar la salida de material y se empacaron con 7 g de amberlita IRA-900 impregnada con medio de cultivo e inóculo en una relación de 1.5 ml de medio por 1 g de resina seca. La altura del empaque fue de 10.6 cm. Finalmente en la parte superior de la columna se colocó un pedazo de algodón para capturar condensados.

Las condiciones de cultivo fueron las siguientes:

Temperatura de incubación: 35°C
Flujo de aire: 50 ml/min.
Concentración de inóculo: $2.7 \cdot 10^7$ esporas/g r.s.
pH inicial en el medio: 2.8
Condiciones de esterilidad: ninguna

La suspensión de esporas se agregó al medio de cultivo antes de aforarlo, con la finalidad de no modificar las concentraciones de los constituyentes y después se agregó a la resina seca, se agitó vigorosamente para homogeneizar cada vez que se empacó una columna.

6.6. Análisis fisicoquímicos.

Todos los análisis fueron realizados por duplicado empleando dos columnas por cada tiempo, el contenido de las columnas se homogeneizó con ayuda de una espátula..

6.6.1. Humedad.

Se pesó aproximadamente un gramo de resina fermentada y se puso a secar durante 24 h a 60°C, pasado este tiempo se volvió a pesar y por diferencia de peso se calculó el porcentaje de humedad, en gramos de agua por gramo de materia húmeda.

6.6.2. pH

Se pesó un gramo de resina fermentada y se agregó 10 ml de H₂O destilada. Se puso en agitación con ayuda de un agitador magnético durante 10 min. y después se tomó la lectura de pH (Conductronic, mod. 20). El sobrenadante obtenido se filtró y guardó en el congelador para el posterior análisis cromatográfico, como se especifica en 6.6.4.

6.6.3. Cuantificación de biomasa.

Se usó el método del colorante ligado a la proteína, usando el reactivo de Bradford (1976). El procedimiento fue el siguiente:

6.6.3.1. Tratamiento de las muestras.

A un g de resina fermentada se le agregaron cinco ml de H₃PO₄ 0.25 M y se mantuvo en baño maría a ebullición durante siete min., se dejó enfriar y se centrifugó durante 15 min. a 4000 r.p.m.; se tomó un ml del sobrenadante y se agregó cinco ml del reactivo de azul de Coomassie y se leyó la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro (Shimadzu, UV-160A) usando como blanco un ml de H₃PO₄ 0.25 M + cinco ml de reactivo.

Bajo estas condiciones de hidrólisis ácida no se logra liberar la proteína contenida en las esporas por lo cual, si se presenta esporulación del microorganismo habrá una subestimación de la biomasa (Córdova, 1994).

6.6.3.2. Curva estándar.

Para la elaboración de las curvas estándar de biomasa, se trabajó usando micelio de *Aspergillus niger* No. 10 crecido sobre placas de agar con el medio C. El contenido de cada placa se vació en un vaso de precipitado de 500 ml y se le agregó agua destilada a 60 +/- 2°C a fin de fundir el agar; posteriormente se filtró y lavó el micelio cuidando de eliminar totalmente el agar.

Finalmente, el micelio obtenido se secó durante 24 h a 39°C sobre papel aluminio; posteriormente se trituró en un mortero.

Se tomaron 50 mg de micelio triturado seco y se disolvieron, con ayuda de un macerador de tejidos, en H₃PO₄ 0.75 M a fin de obtener una suspensión con una concentración de biomasa de un mg/ml. Partiendo de esta suspensión se prepararon diluciones (mínimo 10 puntos). Se les agregó a cada ml de suspensión cinco ml de reactivo de Bradford y se procedió a leer la absorbancia a 595 nm, obteniéndose una línea recta ($r^2=0.973$) misma que fue usada para encontrar las concentraciones problema.

6.6.4. Cuantificación de azúcares polioles y ácido cítrico.

El sobrenadante recuperado de la medición de pH se filtró usando una membrana de 0.45 µm. La cuantificación de estos compuestos se realizó por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC); Perkin Elmer con bomba isocrática y binaria modelo LC-250, inyector (Rheodyne) modelo LC-7125, integrador modelo LC-1020 Accesorios: Kit de filtración de solventes Micropore, jeringa Hamilton (100 µl), sonicador Branson mod. 2200.

Condiciones cromatográficas:

Precolumna: Rezex Organic Guard
Columna: Rezex Organic Acids
Fase móvil: H₂SO₄ 5 mM.
Velocidad de flujo: 0.6 ml/min.
Temperatura de la columna: 60°C.
Volumen de inyección: 70 µl.
Detector: Índice de Refracción. (Modelo LC-30)

Con la columna empleada y las condiciones establecidas el cromatógrafo resuelve durante la misma corrida azúcares, polioles y ácido cítrico con los siguientes tiempos de retención:

Tabla 6.2. Tiempos de retención de los compuestos analizados.

Compuesto	Tiempo de retención (min)
Trehalosa	9.753
Acido cítrico	10.700
Glucosa	11.446
Fructosa	12.326
Eritrol	14.339
Glicerol	16.113

6.6.5 Cuantificación de iones metálicos solubles e insolubles.

La cuantificación de metales se llevó a cabo con un espectrómetro por emisión de plasma (ICP Perkin-Elmer), la sensibilidad del aparato permitió detectar concentraciones superiores a 0.01 ppm. Para evitar contaminaciones de las muestras fue necesario pretratar todo el material que iba a estar en contacto con ella.

6.6.5.1. Pretratamiento del material en contacto con la muestra.

Todo el material que estuvo en contacto con las muestras se lavó cuidadosamente con agua corriente y jabón y se remojó durante toda una noche en agua acidificada con HNO_3 (con un pH entre 2 y 3), posteriormente se enjuagó abundantemente con agua desionizada y se secó dejándolo escurrir. Con este tratamiento se favorece la desorción de iones metálicos tanto del material de vidrio como del de plástico. Todas las muestras y los estándares de metales empleados se guardaron en recipientes de plástico.

Los estándares de metales (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+}) fueron comerciales (TITRISOL de Merck). Para los análisis, se prepararon estándares múltiples que contenían Zn, Fe, Mn, Mg y Cu en concentraciones de 0.01 ppm, 0.1 ppm, 1.0 ppm y 5 ppm; además de un blanco que recibió un tratamiento similar al de las muestras. Las curvas patrón obtenidas, leyendo los cinco estándares, tuvieron coeficientes de correlación de 0.999 en todos los casos.

6.6.5.2. Tratamiento de las muestras.

Para realizar los análisis, se pesó aproximadamente un gramo de resina fermentada por duplicado y se agregaron ocho ml de H₂O desionizada fría; se puso en agitación usando un baño de hielo para conservar la integridad de la membrana celular. Después de 10 min. se filtró el sobrenadante usando papel Whatman 41 y este sobrenadante (considerado como la fracción “soluble”) se acidificó con 10 µl de HNO₃ y se guardó en refrigeración.

La amberlita filtrada se recuperó del papel filtro y se le agregó cinco ml de HNO₃, se colocó en tubos de vidrio y se puso en baño maría por 20 min. Pasado este tiempo se agregaron cinco ml de H₂O desionizada y se procedió a filtrar usando papel Whatman 41; el sobrenadante recuperado (considerado como la fracción insoluble) también se guardó en refrigeración.

Este procedimiento se esquematiza en la figura 6.1.

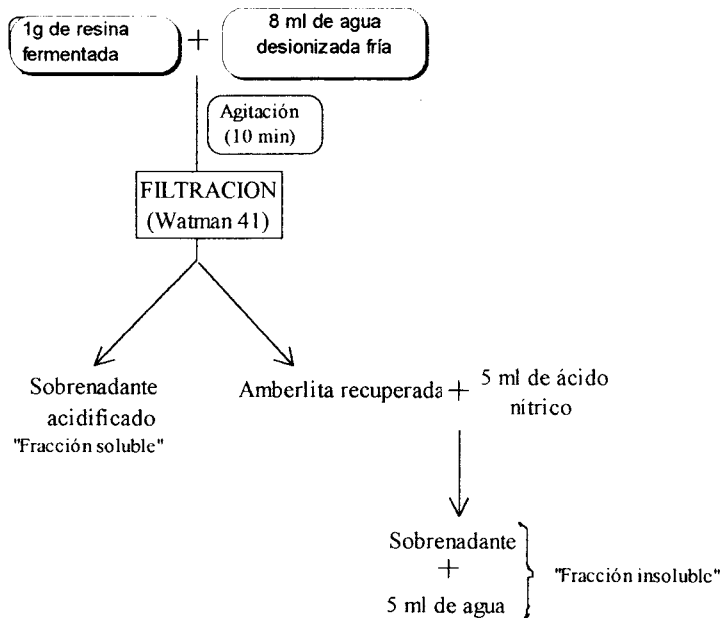


Figura 6.1. Tratamiento de las muestras para el posterior análisis en el espectrómetro por emisión de plasma.

7. Resultados y discusión

Este capítulo se subdivide en cuatro partes: consumo de glucosa y producción de biomasa, en donde se presentan las cinéticas correspondientes y además se realiza el cálculo de $Y_{x/s}$; producción de metabolitos, donde se presentan las cinéticas de producción de todos los metabolitos cuantificados en cada caso; balances de materia y energía, donde se muestran los balances para cada una de las reacciones microbianas; distribución de iones metálicos, en donde se presenta la distribución de iones metálicos solubles e insolubles en la matriz de la amberlita, así como su relación con los distintos parámetros medidos.

7.1. Consumo de glucosa y producción de biomasa.

Los carbohidratos constituyen los componentes esenciales de todos los organismos vivos y son las biomoléculas más abundantes. La glucosa es el carbohidrato más sencillo, su degradación proporciona a los microorganismos la energía y el carbono necesarios para la biosíntesis de otros componentes esenciales. Su consumo y ruta catabólica dependerá del tipo de microorganismo y del medio en el cual se desarrolle.

En esta etapa se estudió el efecto de diferentes concentraciones de iones metálicos en el consumo de azúcar y producción de biomasa. Se trabajó con dos medios de cultivo con una alta concentración inicial de glucosa (350 mg/g r.s.) y diferentes concentraciones de nitrógeno; además se modificó la concentración inicial de los iones metálicos en el medio.

En la Figura 7.1 se presentan los resultados correspondientes al consumo de glucosa (mg glucosa/g m.s.) con respecto al tiempo para los medios balanceados en iones metálicos. Puede observarse que cuando el hongo crece en un medio con exceso de nitrógeno, la tasa de consumo de glucosa es muy elevado (8.45 g glu/g m.s.*h), llegando a consumirse casi en su totalidad a las 48 h, mientras que cuando se cultivó en un medio limitado en nitrógeno la tasa de consumo fue de aproximadamente la mitad.

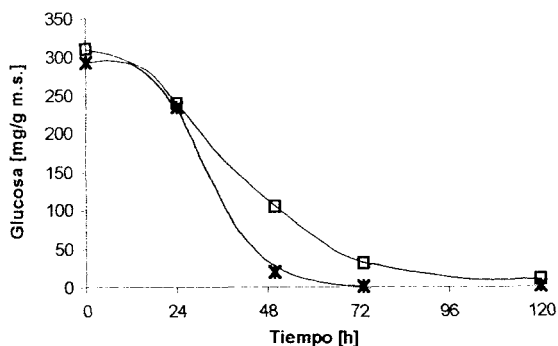


Figura 7.1. Consumo de glucosa. * Medio con exceso de nitrógeno; □ Medio limitado en nitrógeno y balanceados en metales.

El nitrógeno es metabolizado para proveer de proteínas, ácidos nucleicos y otros polímeros a la pared celular. Normalmente el nitrógeno en los hongos constituye entre 4 y 7% de la biomasa de los hongos (Scragg, 1988). Para la producción de ácido cítrico usando *Aspergillus niger*, se ha observado que es importante limitar la cantidad de nitrógeno en el medio con la finalidad de lograr un máximo de biomasa con el máximo nivel de conversión de carbohidratos en ácido cítrico (Pintado y col., 1993). En este caso, como puede observarse en la Tabla 7.1., cuando el hongo fue cultivado en un medio rico en nitrógeno el catabolismo se aceleró y se llegó a consumir la glucosa casi en su totalidad (99.5%) en 48 h, con una velocidad de consumo de 8.45 g glu./g m.s.*h, y no se observó producción de ácido cítrico. Puede suponerse que la glucosa fue usada para la producción de otros metabolitos y para el mantenimiento del microorganismo; mientras que cuando existió limitación de nitrógeno se llegó a consumir el 96.6% sólo después de 120 horas de fermentación y una velocidad de consumo de 4.24 g glu./g m.s.*h. Cabe señalar que en el medio limitado en nitrógeno el hongo esporuló mientras que cuando se cultivó en un medio rico en nitrógeno nunca se observó formación de esporas.

Tabla 7.1. Glucosa consumida al final de la fermentación y máximas velocidades de consumo de glucosa con respecto al medio de cultivo empleado.

Conc. de metales ppm	% Glucosa consumida en 120 h	q máx. g glu./g m.s.*h
Medio rico en nitrógeno	99.5	8.45
Medio limitado nitrógeno	96.6	4.25

Una vez determinada la velocidad de consumo de glucosa en el medio balanceado en iones metálicos se procedió a evaluar este parámetro empleando concentraciones mayores de metales (45 y 180 mg metal/g r.s.) y limitando al hongo en metales (no fueron adicionados al medio de cultivo). En todos estos casos, se evaluó la producción de biomasa debido a que se consideró un parámetro importante pues era necesario evaluar si la glucosa consumida era usada para producción de más biomasa cuando se modificaba la concentración inicial de iones metálicos; en base a la estimación de este parámetro fue posible la evaluación de los gramos de resina seca (g r.s.) a cada tiempo, ya que este valor no es constante debido al importante consumo de glucosa.

En la Figura 7.2. se muestra el consumo de glucosa con respecto al tiempo con medios limitados en nitrógeno y ricos en glucosa empleando diferentes concentraciones iniciales de iones metálicos; se observa que cuando los metales no están presentes en el medio el consumo de glucosa se vuelve muy lento (0.65 g glu/g r.s.*h) mientras que cuando estos se encuentran en el medio el consumo se acelera hasta 4.05 y 5.67 g glu/g r.s.*h para 45 y 180 ppm, respectivamente.

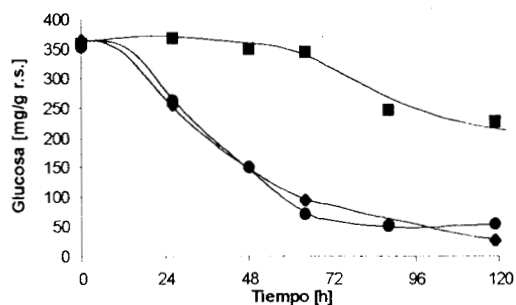


Figura 7.2. Consumo de glucosa en un medio limitado en nitrógeno y con diferentes concentraciones de metales. ■ Sin metales; ◆ 45 ppm de metales; ● 180 ppm de metales.

Llama la atención que en los tiempos finales de la fermentación la glucosa fue consumida casi en su totalidad para todos los casos excepto para el medio sin metales. Esto puede observarse mejor en la Tabla 7.2. Cuando el hongo crece bajo condiciones de limitación de nitrógeno y de metales la glucosa consumida es casi una tercera parte de la glucosa que se consume en los otros casos, este bajo consumo coincide con una baja producción de biomasa como se observa más adelante; esto debido a que es necesaria la presencia de una cantidad mínima de metales para llevar a cabo procesos

metabólicos fundamentales para la célula como el ciclo de Krebs (que requiere Fe^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+}) como cofactores (Voet y Voet, 1990), por otra parte se sabe que metales como el Zn^{2+} y el Cu^{2+} son requeridos en los procesos de transcripción y replicación celular (Failla, 1975).

Tabla 7.2. Glucosa consumida y máxima velocidad de consumo de glucosa con respecto a la concentración de iones metálicos.

Conc. de metales ppm	% Glucosa consumida	q máx. g glu/g r.s.*h
0	37.1	0.65
45	92.5	4.27
180	84.8	5.67

Estos resultados difieren a lo encontrado por Córdova (1994), en donde el consumo de glucosa para medios con alta concentración de azúcar (450 mg glu/g r.s.) siempre observó un residuo de glucosa en los tiempos finales de la fermentación sugiriendo que no se lograba un consumo total de la glucosa; sin embargo, hay que hacer notar que en ese caso la fase de adaptación del microorganismo fue de 20 h, siendo más larga que la observada en este trabajo (15 h, obteniéndose un máximo de crecimiento a las 24 h de fermentación) y el máximo crecimiento lo registró entre las 30 y 40 h de cultivo lo cual puede interpretarse como un lento catabolismo general del microorganismo en contraste con el catabolismo más acelerado en este caso. Aunque la concentración de glucosa en el medio de cultivo adsorbido en la amberlita fue el mismo en los dos casos (300 g/l), las diferencias en el tiempo inicial pueden atribuirse a la diferencia de humedad entre el reporte de Córdoba (cerca de 48%) y el presente estudio (44%), al retener más solución de nutrientes, también se retiene una mayor cantidad de glucosa.

En cuanto a la velocidad de consumo de glucosa, de las tablas 7.1. y 7.2. se observa que la máxima se presentó cuando el hongo creció en un medio rico en nitrógeno (en 48 h se consume casi la totalidad de la glucosa), mientras que la mínima velocidad se encontró cuando el hongo se cultivó en un medio sin metales. Sin embargo no existe gran diferencia para los medios con altas concentraciones de metales (de 4.27 a 5.66 g glu/g amb.*h) y el medio balanceado (4.24 g glu/g amb.*h) lo que sugiere que una vez presentes las cantidades adecuadas de iones metálicos, concentraciones superiores de metales no afectan la velocidad máxima de consumo de glucosa aunque su destino final sí pudiera verse afectado.

Debido a que la velocidad de consumo de azúcar daba una idea de que la fase de adaptación era corta (aproximadamente 15 h) se procedió a determinar la cantidad de biomasa producida empleando el método modificado de Bradford (Córdova, 1994; Bradford, 1976). Estos resultados se presentan en la Figura 7.3, donde se muestra la producción de biomasa con respecto al tiempo. Se observa que en todos los casos se presentó una fase de germinación muy corta (aproximadamente 15 h) y se alcanzó el máximo de producción de biomasa en 24 h; este valor coincide con el reportado por Auria y col. (1990) empleando la misma cepa de *Aspergillus* crecida sobre amberlita IRA-900 pero en un medio sin limitación de nitrógeno y con un pretratamiento diferente que no incluía las sales del medio de cultivo (sulfato de amonio y fósforo de potasio).

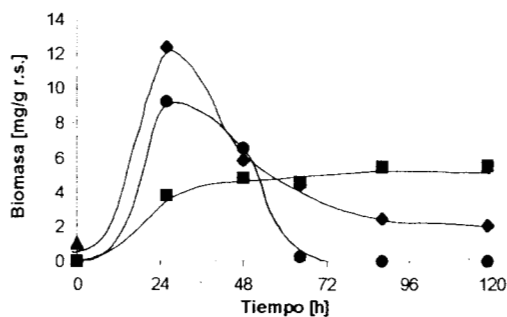


Figura 7.3. Producción de biomasa en un medio limitado en nitrógeno y con diferentes concentraciones de metales. ■ Medio sin metales; ● Medio con 45 ppm de metales; ▲ Medio con 180 ppm de metales

Debido a que sólo se midió biomasa micelial por el método empleado, se puede tener una idea cuantitativa de la producción de esporas debido a que la caída de las curvas puede relacionarse con la esporulación ya que no se está detectando proteína pues ésta no ha sido liberada, por lo que aparentemente para 180 ppm se presentó el mayor descenso de la curva indicando una mayor esporulación.

Los resultados indican que al incrementarse la concentración de iones metálicos en el medio de cultivo también se incrementa la esporulación; esto puede atribuirse a que se está incrementando la presión osmótica externa disminuyendo la A_w , se ha reportado que la A_w óptima para la esporulación es ligeramente menor que la óptima para el desarrollo del micelio en *Trichoderma viride* (Gervais, 1988).

También se puede suponer que la presencia de iones metálicos en fermentación en medio sólido fue necesaria para la estimulación de la esporulación del hongo, esta hipótesis está soportada en la revisión realizada por Silver y Jasper en 1977, pues se sabe que la presencia de Mn^{2+} es necesaria para la esporulación de algunos tipos de microorganismos como *Bacillus*; sin embargo, hay que tomar en cuenta que bajo condiciones de limitación de metales la producción de biomasa fue baja como puede observarse en la Tabla 7.3 y el hongo no sigue creciendo aunque posiblemente existan espacios disponibles para el crecimiento del hongo (Laukevics y col., 1985) por lo que no se presentaron las condiciones de estrés que estimulan la esporulación.

Tabla 7.3. Concentración máxima de biomasa a diferentes concentración de iones metálicos.

Conc. de metales ppm	Conc. máxima de biomasa mg/g r.s
0	5.51
45	12.41
180	9.27

El hecho de que se haya producido casi la mitad de biomasa en ausencia de metales en comparación a los otros casos puede deberse a que el Mn^{2+} y el Fe^{2+} han sido reportados como esenciales y se sabe que su deficiencia provoca, en cultivos líquidos por lotes de *Agrobacterium tumefaciens*, limitaciones en la tasa del crecimiento y concentración de biomasa (Pirt, 1975). Aparentemente, también en medio sólido se requiere de estos iones metálicos para lograr una buena producción de biomasa.

Con los datos anteriores fue posible el cálculo del rendimiento de biomasa con base en el sustrato consumido $Y_{x/s}$ (Quintero, 1990); de este modo, en la Figura 7.4. se presenta el desarrollo de $Y_{x/s}$ (mg biomasa producida/mg sustrato consumido) con respecto al tiempo y para cada concentración de metales. Se observó que este valor no es constante con respecto al tiempo, varía alcanzando un valor máximo (0.10 mg biomasa/mg glucosa) muy semejante a las 24 h en medios con concentraciones altas de metales (45 y 180 ppm) mientras que para el medio sin metales se alcanzó a las 48 h siendo este valor equivalente a dos terceras partes de los otros (0.07 mg biomasa/mg glu).

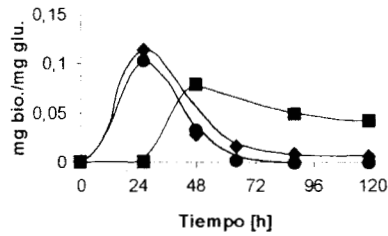


Figura 7.4 $Y_{x/s}$ con respecto al tiempo. ■ Medio sin metales; ◆ Medio con 45 ppm de metales; ● Medio con 180 ppm de metales

Teóricamente $Y_{x/s}$ es constante cuando las condiciones del cultivo permanecen constantes (Quintero, 1990), sin embargo en estos resultados experimentales $Y_{x/s}$ varía con respecto al tiempo. Es importante recordar que las condiciones del cultivo cambiaron para cada tiempo debido a que se consume la glucosa y se modifica el potencial osmótico, se produce la biomasa y metabolitos por lo que consecuentemente se modifica el pH y dicha modificación puede llegar a provocar inhibición de las enzimas además de que se partió de un medio desbalanceado dadas las elevadas concentraciones de metales en el medio de cultivo.

Se realizó un experimento similar, en donde se trabajó con una concentración inicial de metales de 90 ppm, pero la concentración inicial de glucosa fue de 520 mg/g r.s. Dichos resultados se presentan en la figura 7.5., en esta figura se muestran por un lado el consumo de glucosa y por el otro $Y_{x/s}$ con respecto al tiempo. Se observa que $Y_{x/s}$ varía con respecto al tiempo, alcanzando un máximo a las 26 h de fermentación para posteriormente descender conforme la glucosa se consume. Independientemente de la concentración inicial de glucosa, el $Y_{x/s}$ no es constante.

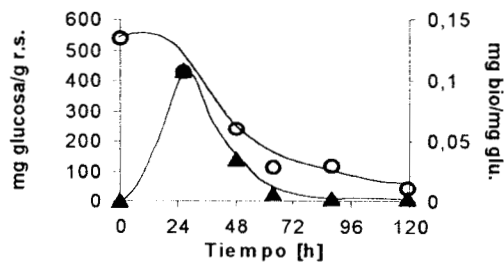


Figura 7.5. ○ Consumo de glucosa, ▲ $Y_{x/s}$ con respecto al tiempo

Conclusiones

Los resultados anteriores sugieren que en fermentación en medio sólido las concentraciones altas de metales (45 y 180 ppm) modifican ligeramente la velocidad de consumo de azúcar (de 4.46 g glu/g amb.*h a 5.23 g glu/g amb.*h) y la producción máxima de biomasa (de 12 mg/g r.s. a 9 mg/g r.s.). Sin embargo, $Y_{x/s}$ máximo no se afecta; este valor no es constante en el transcurso de la fermentación debido a que se partió de medios desbalanceados además de que las condiciones cambian en el transcurso del tiempo.

Bajo condiciones de ausencia de metales el $Y_{x/s}$ máximo es más bajo que el observado en presencia de elevadas concentraciones de metales al igual que la producción máxima de biomasa (5.5 mg/g r.s.) y la velocidad de consumo de azúcar (0.65 g glu/g amb.*h), lo cual puede atribuirse a la falta de cofactores metálicos necesarios para llevar a cabo en forma eficiente procesos básicos de la célula como son el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la vía de las pentosas y la cadena respiratoria.

7.2. Producción de metabolitos.

Las especies de *Aspergillus* usan básicamente dos vías distintas para el catabolismo de la glucosa: la vía Embden-Meyerhof-Parnas (hexosa bifosfato) y la vía de las pentosas (hexosa monofosfato). Es posible distinguir dos grupos de metabolitos: aquellos productos formados por intermediarios glicolíticos (polioles) y aquellos relacionados con la operación del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (ácidos orgánicos). La formación de polioles y ácidos orgánicos muestra una relación inversa. La acumulación de polioles está asociada generalmente con una baja producción de ácidos orgánicos y viceversa. Su producción y acumulación se debe al tipo y concentración de fuente de carbono, nitrógeno, pH, cantidad y tipo de iones metálicos, entre otros (Roeh y col., 1992). Es bien conocido el hecho de que los hongos, cuando son cultivados en altas concentraciones iniciales de azúcar pueden acumular carbohidratos de reserva como polioles y trehalosa (Blumenthal, 1976); además, la producción de estos compuestos constituye una estrategia de los microorganismos para mantener el balance de la presión osmótica actuando como solutos compatibles (Hocking, 1993).

Debido a su importancia fisiológica y a que son un indicativo de la actividad metabólica del microorganismo estos compuestos fueron cuantificados en todos los casos.

7.2.1 Producción de ácido cítrico.

Se sabe que es necesario trabajar con condiciones limitantes de metales en FmS para favorecer la acumulación de ácido cítrico sugiriéndose las siguientes concentraciones:

Tabla 7.4. Concentraciones sugeridas para la acumulación de ácido cítrico en FmS.

Catión	Conc. óptima* mg/l	Conc. óptima** mg/l
Fe ²⁺	-----	2
Cu ²⁺	0.000	0.1
Zn ²⁺	0.075	0.3
Mg ²⁺	-----	2
Mn ²⁺	0.056	<0.2 ppb

*Según Roukas y Kotzekidou, 1987.

**Según Shankaranand y Lonsane, 1994.

Sin embargo, en condiciones de cultivo en medio sólido no es necesaria una deficiencia tan estricta en cuanto a iones metálicos. De este modo se procedió a evaluar la producción de ácido cítrico en los medios de cultivo.

En la Figura 7.6. se observa la producción de ácido cítrico en los medios limitado y no limitado en nitrógeno, cuando la concentración de iones metálicos fue balanceada.

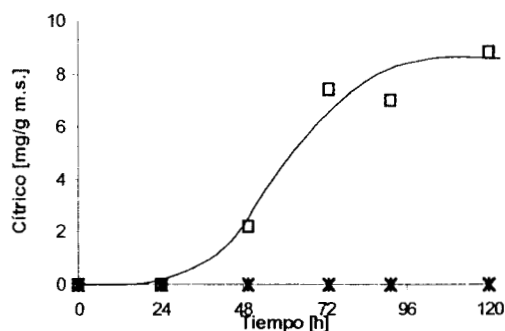


Figura 7.6. Producción de ácido cítrico en medios balanceados en metales. * Medio con exceso de nitrógeno; □ Medio limitado en nitrógeno y balanceado en metales.

Se puede observar que para lograr la acumulación del ácido cítrico cuando se cultiva a *Aspergillus niger* en medio sólido, es necesario limitarlo en nitrógeno, esto coincide con los reportes de la literatura para cultivo sumergido y superficial. (Miall, 1978; Bigelis y Arora, 1992).

En la figura 7.7 se observa que el ácido cítrico comienza a acumularse poco antes de las 48 h y su velocidad de formación es muy alta (0.52 mg cítrico/g r.s.*h), casi al término de la fermentación se observa un consumo lento (0.16 mg cítrico/g r.s.*h). Es importante señalar que cuando se trabajó con un medio sin metales así como con 45 ppm de iones metálicos no se observó producción de ácido cítrico.

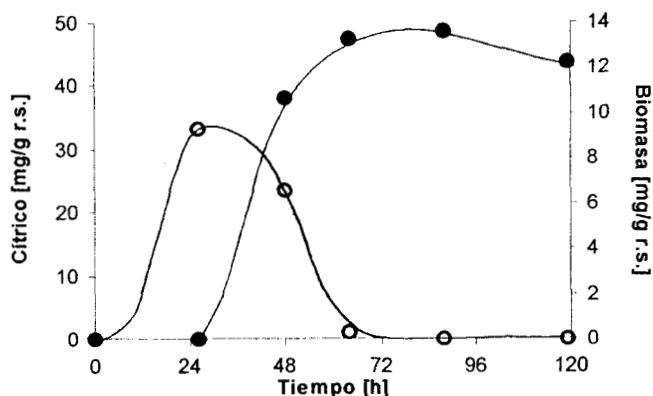


Figura 7.7. Medio con 180 ppm de metales. ● Ac. cítrico. ○ Biomasa.

Llama la atención que al comparar con la curva de biomasa, se observa que la acumulación del ácido se inicia después de 24 h de cultivo, momento en el que se encuentra el valor máximo de biomasa y coincide también con el inicio de la esporulación del hongo, mostrando un perfil similar al de los metabolitos secundarios sin estar asociado al crecimiento, lo cual contrasta fuertemente con lo reportado con la literatura ya que se considera al ácido cítrico como un metabolito primario parcialmente asociado al crecimiento. La explicación que puede darse en este caso es que el inicio de la acumulación del cítrico coincide con el consumo de glicerol (Figura 7.8.) y en este caso el glicerol fue el iniciador de la síntesis de ácido cítrico.

El hecho de que no se haya encontrado cítrico en el medio que carecía de metales se puede deber a que es necesaria una cantidad mínima de cofactores metálicos para llevar a cabo la cadena respiratoria. En este sentido, el cobre debe estar presente en la vía respiratoria de los hongos y se ha reportado que una deficiencia de este metal y de hierro modifica la morfología de las mitocondrias afectando la vía respiratoria (Downiw y Garland, 1972). Como se sabe, el ácido cítrico se sintetiza durante el ciclo de Krebs (intramitocondrial) y requiere una gran aireación por lo tanto, bajo condiciones de deficiencia total de metales no es posible su acumulación. La ausencia de ácido cítrico y de glicerol en 45 ppm sugiere que al no producirse glicerol tampoco se propició la síntesis de ácido cítrico.

7.2.2. Producción de glicerol.

El glicerol es el principal osmorregulador posiblemente por ser el más pequeño, y se ha propuesto que es el iniciador de la acumulación del ácido cítrico en cultivo líquido por *Aspergillus niger* (Legisa y Matthey, 1986 y 1988). En la Figura 7.8. se observa la producción de glicerol en los medios limitado en nitrógeno y no limitado en nitrógeno, en los dos casos se observó la acumulación de pequeñas cantidades de glicerol así como una rápida velocidad de producción y de consumo.

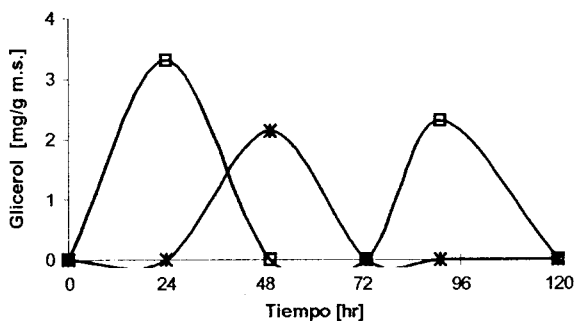


Figura 7.8. Producción de glicerol. * Glicerol en un medio con exceso de nitrógeno; □ Glicerol en un medio limitado en nitrógeno.

Para el medio con exceso de nitrógeno, el consumo del glicerol ocurre rápidamente a partir de las 48 h, momento en el cual más del 90% de la glucosa ya ha sido consumida (Figura 7.1.) lo cual sugiere que en este caso el glicerol constituye una fuente de carbono en el medio y que se consume rápidamente probablemente porque su función de osmorregulador ya no se requiere. Mientras que en el caso del medio limitado en nitrógeno, se observan dos máximos de glicerol y la producción está desfasada casi en 24 h respecto al caso anterior, en este cultivo se observó acumulación de cítrico (Figura 7.6.), que coincide con el inicio del consumo del glicerol.

En la Figura 7.9. se muestra la producción de glicerol para el caso de 180 ppm, para 0 y 45 ppm no se encontró glicerol, la producción máxima (5 mg glicerol/g r.s.) es muy semejante cuantitativamente al caso del medio limitado en nitrógeno y balanceado en metales. También se observa que el máximo de glicerol se alcanzó una vez que se consumieron dos terceras partes de glucosa, sugiriendo que el estrés osmótico ha disminuido y las concentraciones intracelulares de glicerol bloquean a la isocitrato

deshidrogenasa deteniendo la síntesis de glicerol e iniciando su consumo como fuente de carbono, acumulando ácido cítrico simultáneamente.

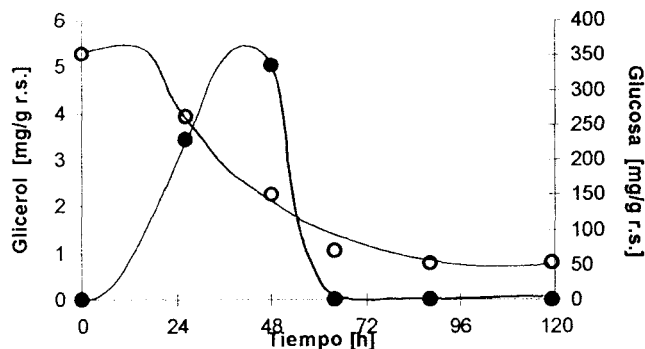


Figura 7.9. Medio con 180 ppm de metales ● Producción de glicerol. ○ Consumo de glucosa

Aparentemente, en FMS el glicerol se sintetizó como una respuesta al elevado estrés osmótico como consecuencia de altas concentraciones de glucosa y metales hasta alcanzar un nivel capaz de bloquear a la isocitrato deshidrogenasa y favorecer la acumulación del cítrico, este efecto inhibitorio parece ser superior a la estimulación de las enzimas aconitasa y α -cetoglutarato deshidrogenasa por iones metálicos; cuando se consume el glicerol parece existir la concentración de cítrico suficiente como para disminuir el pH intracelular e inhibir a la isocitrato deshidrogenasa. Estos efectos no se observan en los medios sin metales y con 45 ppm debido a que no se observó acumulación de glicerol pues parece no ser necesaria su síntesis a ese nivel de estrés osmótico.

7.2.3. Producción de eritrol.

El eritrol es otro importante metabolito que se ha reportado como osmorregulador en hongos que crecen en altas concentraciones de azúcar. En la Figura 7.10 se muestra la producción de eritrol para los medios con limitación y exceso de nitrógeno, la máxima producción se alcanzó al mismo tiempo, pero en el medio no limitado en nitrógeno es cuatro veces superior a la del medio limitado en nitrógeno y su velocidad de producción y de consumo también son sensiblemente mayores: en el medio rico en nitrógeno la velocidad de producción (0.39 mg eritrol/g m.s.*h) fue tres veces superior

al medio limitado en nitrógeno (0.13 mg eritrol/g m.s.*h); análogamente el consumo fue más rápido en el medio rico en nitrógeno (0.47 mg eritrol/g m.s.*h) que en el medio limitado (0.06 mg eritrol/g m.s.*h). Esta discrepancia se puede relacionar con el rápido catabolismo de glucosa observado en el medio rico en nitrógeno sugiriendo que no hay necesidad de mantener una gran cantidad de osmorreguladores en el medio, mientras que para los otros casos donde el consumo de glucosa ocurre más lentamente, se favorece la presencia de osmorreguladores en concentraciones más altas. La presencia de eritrol bajo condiciones de elevadas concentraciones de azúcar ya ha sido reportado como uno de los principales osmorreguladores en medio sólido (Gutiérrez y col., 1995).

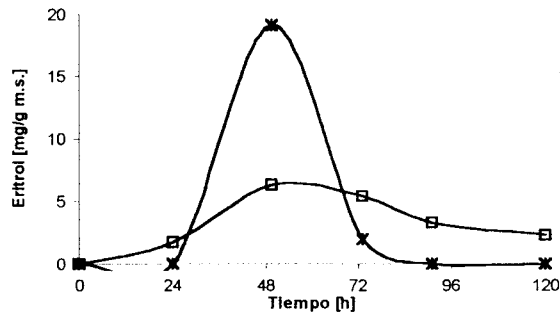


Figura 7.10. Producción de eritrol. * Medio con exceso de nitrógeno; □ Medio limitado en nitrógeno y balanceado en metales.

En la Figura 7.11., se observa la producción de eritrol a diferentes concentraciones iniciales de metales con respecto al tiempo. En términos generales, la tendencia es de incrementarse en forma rápida y luego descender alcanzando un valor mínimo y muy semejante alrededor de las 120 h, en los casos en que el hongo fue cultivado en medios con 45 y 180 ppm de metales, mientras que en el medio sin metales no se observó producción de eritrol.

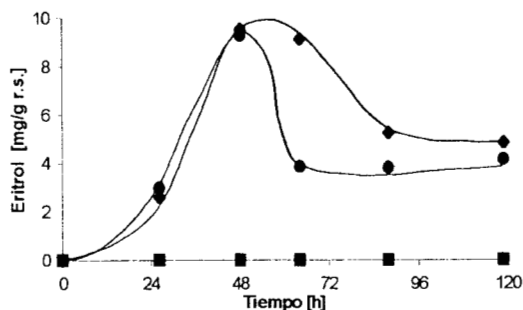


Figura 7.11. Producción de eritrol en un medio limitado en nitrógeno y con diferentes concentraciones iniciales de metales.

■ Medio sin metales; ◆ Medio con 45 ppm de metales; ● Medio con 180 ppm de metales

Las máximas velocidades de producción y de consumo de eritrol se muestran en la Tabla 7.4. Se observa que son iguales en los casos de altas concentraciones de metales mientras que las velocidades de consumo varían dependiendo de la concentración de iones metálicos, presentándose un consumo cinco veces más rápido en el medio con 180 ppm de metales en comparación al de 45 ppm.

Tabla 7.4. Velocidades máximas de formación y consumo de eritrol.

	Concentraciones iniciales de metales.		
	Sin metales	45 ppm	180 ppm
Vel. máx. formación mg eritrol/g r.s.*h	0	0.19	0.9
Vel. máx consumo mg eritrol/g r.s.*h	0	0.07	0.34

Se ha reportado que estos polioles son los principales osmorreguladores para cultivos de *Aspergillus niger* en medio líquido (Legisa y Mattey, 1986; Legisa y Kidric, 1989) y en medio sólido (Gutiérrez, et. al., 1995). Aparentemente tanto el glicerol como el eritrol son también los osmorreguladores más importantes cuando el hongo es sometido a un fuerte estrés osmótico debido a la presencia de elevadas concentraciones de metales.

7.2.4. Producción de trehalosa.

Uno de los principales metabolitos de reserva es la trehalosa. La trehalosa es un α - α diglucósido y es el disacárido más común en los hongos. Se ha observado que este disacárido puede encontrarse junto con otros polioles. En la Figura 7.12. se observa la producción de trehalosa para el caso del medio limitado y no limitado en nitrógeno.

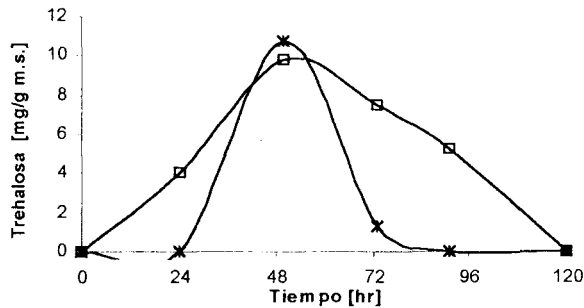


Figura 7.12. Producción de trehalosa. * Medio con exceso de nitrógeno; □ Medio limitado en nitrógeno y balanceados en metales.

La trehalosa es el metabolito que se produjo en mayor concentración en ambos casos, esto puede atribuirse a que el hongo la está formando como metabolito de reserva. Para el medio rico en nitrógeno la velocidad de producción (0.23 mg trehalosa/g m.s.*h) y de consumo (0.26 mg trehalosa/g m.s.*h) son muy rápidos y similares entre sí mientras que en el caso del medio limitado en nitrógeno la velocidad de producción (0.19 mg trehalosa/g m.s.*h) y la de consumo (0.14 mg trehalosa/g m.s.*h) son más bajas. El consumo depende de las condiciones externas, la escasez de fuente de carbono en el medio provocará el consumo de carbohidratos de reserva (Blumenthal, 1976) por lo que el consumo, en ambos casos se inicia a las 48 h momento en el cual comienza a agotarse la fuente de carbono.

En la Figura 7.13. puede observarse que varía el tiempo en el que se alcanza la concentración máxima de trehalosa en los medios con diferente concentración inicial de metales. Cuando se trabajó con 180 ppm se encontró que el tiempo máximo de producción fue de 64 h, mientras que para 45 ppm el máximo se alcanzó casi 24 h antes y para el medio sin metales se observó que la producción permanece casi constante a partir de las 96 h y no hay consumo probablemente debido a que aún

existe glucosa disponible del medio de cultivo; en los demás casos la trehalosa se consume como consecuencia de la falta de glucosa en el medio a las 120 h de fermentación.

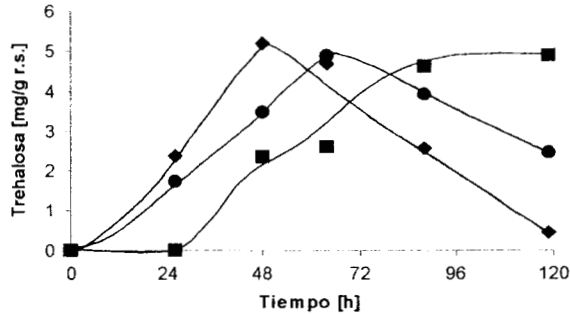


Figura 7.13. Producción de trehalosa en un medio limitado en nitrógeno y con diferentes concentraciones iniciales de metales.
 ■ Medio sin metales; ◆ Medio con 45 ppm de metales; ● Medio con 180 ppm de metales

Las velocidades máximas de producción y consumo de trehalosa se muestran en la Tabla 7.5. Se observó que la máxima velocidad de formación fue para el medio con 45 ppm de metales (0.11 mg trehalosa/g r.s.*h), y la mínima fue para el medio sin metales (0.05 mg trehalosa/g r.s.*h). En cuanto a las velocidades de consumo, se observó que la más alta fue para el medio con 45 ppm (0.06 mg trehalosa/g r.s.*h), mientras que no se observó consumo en el medio sin metales.

Tabla 7.5. Velocidades máximas de formación y consumo de trehalosa.

	Concentración inicial de metales		
	Sin metales	45 ppm	180 ppm
Vel. máx. formación mg trehalosa/g r.s.*h	0.05	0.11	0.07
Vel. máx consumo mg trehalosa/g r.s.*h	0	0.06	0.04

Existen estudios que muestran que la trehalosa se encuentra presente en las conidias de algunos hongos y se consume durante la germinación de las esporas, después ocurre una nueva síntesis de trehalosa por el micelio (Hocking, 1993). Esto coincide con los resultados experimentales para 45 y

180 ppm en donde ocurre la síntesis y posterior consumo una vez que esporuló el hongo, mientras que para 0 ppm, donde no se presentó esporulación, el hongo no consume la trehalosa.

7.2.5. Análisis de la distribución del carbono de la glucosa en los diferentes metabolitos.

Debido a que se observó la acumulación de diferentes metabolitos en *Aspergillus niger* dependiendo de la concentración inicial de iones metálicos, se estudió la distribución del carbono procedente de la glucosa en los diferentes metabolitos.

La Figura 7.14. muestra el cambio del carbono total, expresado en mmol, contenido en todos los metabolitos detectados (ácido cítrico, glicerol, eritrol y trehalosa) con respecto al tiempo para los medios con diferente concentración inicial de metales. Se observó que, a excepción del medio sin metales, en los otros casos se alcanzó un máximo de producción alrededor de las 48 h, a partir de entonces existe un decremento conforme pasa el tiempo. La concentración final para el medio sin metales fue cercana a 0.01mmol/g r.s. mientras que para el medio con 45 ppm fue de 0.02 mml/g r.s. y para el medio con 180 ppm de metales fue de 0.14 mmol/g r.s. La tendencia indica que al incrementarse la concentración de iones metálicos en el medio de cultivo se favorece una mayor producción y acumulación de metabolitos, específicamente, el hecho de que la diferencia entre el medio con 45 ppm y el de 180 ppm de iones metálicos radica en la gran producción de ácido cítrico. Estas diferencias pueden atribuirse por un lado a que existen los cofactores necesarios en la célula para que ésta realice su metabolismo en forma más acelerada y además se favoreció la acumulación de una cantidad de glicerol tal que estimuló la síntesis de ácido cítrico en el medio de cultivo además de la necesidad de formar polioles para osmorregular el citoplasma con el medio externo (Legisa y Kidric, 1989).

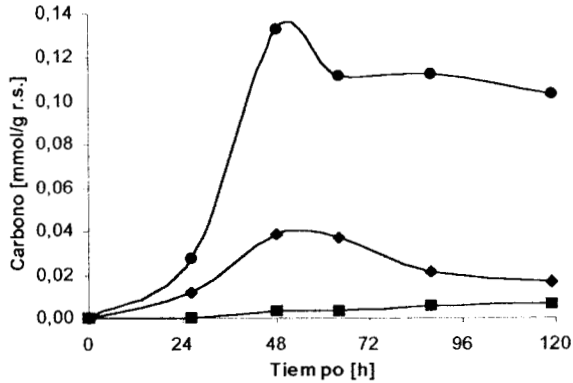


Figura 7.14. Producción total de metabolitos totales expresado en mmol de C. ■ Medio sin metales; ◆ Medio con 45 ppm de metales; ● Medio con 180 ppm de metales .

Como se observa en la figura 7.14., bajo condiciones de altas concentraciones de iones metálicos en el medio, el hongo tiende a producir metabolitos que posteriormente se consumen, lo cual es atribuible a que ya se agotó la glucosa y se comienzan a consumir los metabolitos que había producido. Esto concuerda con la revisión de Roeh y col. (1992), quienes mencionan que la concentración de metales traza (particularmente Mn^{2+} , Fe^{3+} y Zn^{2+}) afectan el catabolismo de carbohidratos en especies de *Aspergillus niger*. No ocurre así cuando el hongo se desarrolla en un medio sin metales, en este caso el carbono de los metabolitos se incrementa lentamente, posiblemente como consecuencia de que aún existe glucosa disponible en el medio y no es necesaria la acumulación de reservas.

En la Figura 7.15. se muestran el rendimiento del carbono presente en los metabolitos en base al consumo de carbono en la glucosa a través del tiempo. Para 45 y 180 ppm existe un valor máximo alrededor de las 64 h y después desciende llegando, en el medio con 45 ppm de iones metálicos hasta 0.02 a las 120 h de fermentación; mientras que en el medio con 180 ppm el descenso fue más leve (de 0.3 a 0.15 mmol C met./mmol C glu.).

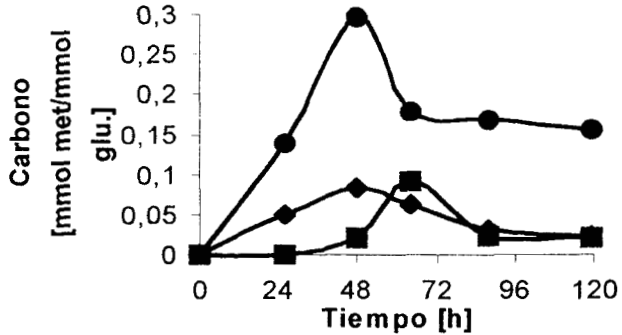


Figura 7.15. Producción total de metabolitos expresado en mmol de C. ■ Medio sin metales; ◆ Medio con 45 ppm de metales; ▲ Medio con 90 ppm de metales; ● Medio con 180 ppm de metales .

El mayor rendimiento se encontró en el medio con 180 ppm por lo que es a esta concentración de iones metálicos cuando se destina una mayor cantidad de carbono a la formación de metabolitos.

Con la finalidad de visualizar en qué metabolito se concentra la mayor cantidad de C se procedió a normalizar los resultados dividiendo la cantidad de cada uno de ellos (en mmol de C) entre la cantidad total de metabolitos producidos (mmol total de C presente en los metabolitos). Estos resultados se muestran en la Figura 7.16. Se obtuvo que para el medio sin metales todo el carbono se fue para la formación de trehalosa y no se presentó ningún otro metabolito. También se puede observar que para el medio con 45 ppm de iones metálicos la mayor cantidad de carbono fue destinada para la producción de eritrol, mientras que para el medio con 180 ppm se produjo preferentemente glicerol en las primeras horas de fermentación y posteriormente se acumuló ácido cítrico.

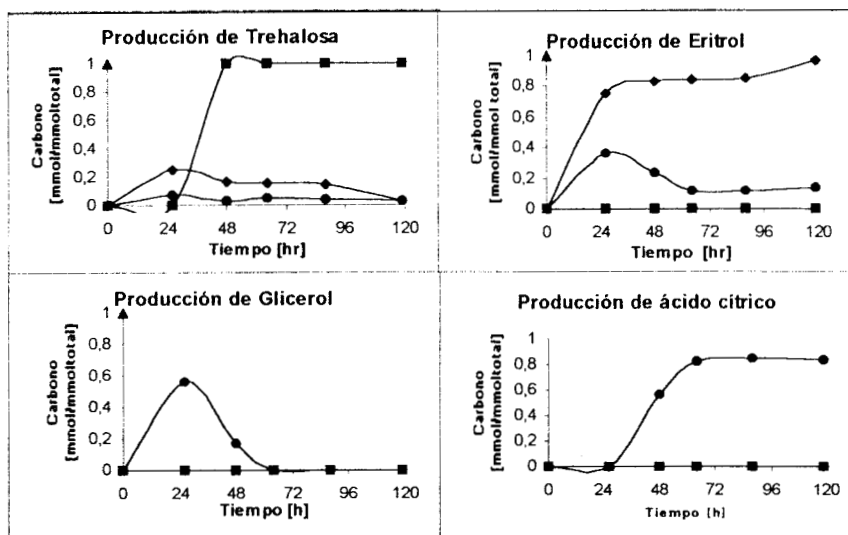


Figura 7.16. Producción total de metabolitos expresado en mmol de C. ■ Medio sin metales; ◆ Medio con 45 ppm de metales; ● Medio con 180 ppm de metales .

Conclusiones.

En presencia de altas concentraciones de iones metálicos (180 ppm) se favorece la acumulación del carbono en forma de polioles, trehalosa y ácido cítrico para osmorregular el citoplasma con el medio externo; dichos metabolitos se consumen una vez que se agota la glucosa del medio al emplearse como fuentes de carbono además de que su presencia ya no es estrictamente necesaria pues disminuye la presión externa debido al consumo de la glucosa.

Mientras que en el medio sin metales, se favorece principalmente la acumulación de trehalosa, en presencia de altas concentraciones de iones metálicos se favorece la acumulación de polioles de cadena corta como eritrol y glicerol.

El glicerol se sintetizó sólo cuando las condiciones fueron extremas (180 ppm de iones metálicos) y su presencia estimuló la acumulación de ácido cítrico.

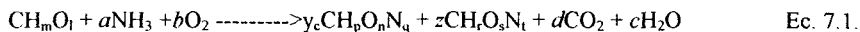
7.3 Balances de materia y energía.

Debido a la complejidad de los cultivos, los balances de materia y energía son útiles para comprender el sistema de trabajo. El presente capítulo se divide en cinco subcapítulos, en el primero de ellos se presenta la base teórica sobre la cual se fundamenta el modelo de balance empleado; en el segundo se enumeran las consideraciones teóricas que se hicieron para poder realizar los balances, y finalmente, los últimos tres subcapítulos muestran los resultados de estos balances para los tres casos de estudio.

7.3.1. Balances para el crecimiento microbiano.

Los balances de materia y energía son ampliamente utilizados en ingeniería; sin embargo, en biotecnología y bioingeniería dichos balances son poco usados debido a la complejidad de los procesos llevados a cabo por las células y a que es necesario medir la mayoría de las variables implicadas en el proceso, como son los consumos de fuente de carbono, nitrógeno y oxígeno; así como la producción de biomasa, CO₂ y producto(s) formado(s).

Una buena aproximación está dada por los balances de Erickson y col. (1978), que se basan en el hecho de que el calor de reacción por electrón transferido al oxígeno es relativamente constante para la oxidación de una gran variedad de moléculas orgánicas, además de que el número de electrones disponibles por átomo de carbono y la fracción en peso del carbono en la biomasa también pueden considerarse constantes. De este modo la ecuación de balance es la siguiente:



Donde CH_mO_l, CH_pO_nN_q y CH_rO_sN_t denotan la composición elemental por átomo de carbono del sustrato orgánico, de la biomasa y del producto respectivamente. Por otro lado y_c , z y d es el rendimiento en moles de compuesto en base a un mol de glucosa en biomasa, sustrato, y CO₂ respectivamente; a , b y c son los moles de NH₃, O₂ y H₂O respectivamente.

El grado de reductancia del sustrato (γ_s) es el número de equivalentes de electrones disponibles en la cantidad de sustrato orgánico que contiene un átomo de carbono y se expresa como:

$$\gamma_s = 4 + m - 2l \quad \text{Ec. 7.2.}$$

para el producto:

$$\gamma_p = 4 + r - 2s + 3t \quad \text{Ec. 7.3.}$$

El oxígeno requerido se relaciona directamente con los electrones disponibles que pueden ser transferidos, de tal forma que un balance de los electrones disponibles de la ecuación 7.1. sería el siguiente:

$$\gamma_s + b(-4) = y_c \gamma_b + z \gamma_p \quad \text{Ec. 7.4.}$$

Rearreglando la ecuación:

$$4b/\gamma_s + y_c \gamma_b/\gamma_s + z \gamma_p/\gamma_s = 1 \quad \text{Ec. 7.5.}$$

Donde el término $4b/\gamma_s$ representa la fracción de electrones transferidos al oxígeno; $y_c \gamma_b/\gamma_s = \eta$ son los electrones transferidos a la biomasa y $z \gamma_p/\gamma_s = \xi_p$ son los electrones transferidos al producto.

Para un balance de nitrógeno se tiene que:

$$a = y_c q + zt \quad \text{Ec. 7.6.}$$

Además la producción de CO_2 se expresa como:

$$d = 1 - y_c - z \quad \text{Ec. 7.7.}$$

Y las moles de O_2 requeridas se pueden expresar como:

$$b = (\gamma_s - y_c - z \gamma_p) / 4 \quad \text{Ec. 7.8.}$$

Por otro lado, las moles de H₂O producidas se define como:

$$c = 1 + 2b - y_c (\eta) - 2d \quad \text{Ec. 7.9.}$$

7.3.2. Consideraciones teóricas.

Dada la información con la que se cuenta de los experimento descritos en el capítulo 7.1., en donde se estimó la producción de biomasa y se cuenta con información suficiente para calcular todos los rendimientos de los productos medidos en base al sustrato consumido, es posible llevar a cabo los balances de materia y energía en cada caso y calcular algunos parámetros que no fueron estimados y que proporcionan información del proceso como son la producción de CO₂ y H₂O. Para ello se hicieron las siguientes consideraciones:

i) La composición elemental de la biomasa en forma de micelio ha sido previamente propuesta para un medio similar a los presentados en este trabajo (Córdova, 1994) y es CH_{1.88}O_{0.63}N_{0.07}, dicha composición se basa en que el valor mínimo de nitrógeno presente en la biomasa es de 4% según Scragg (1992) y que la fracción de carbono en la biomasa es de 0.48 (Erickson y col., 1978). Experimentalmente, Larroche y Gros (1992) determinaron la composición elemental de *Penicillium roquefortii* y establecieron la fórmula CH_{1.882}O_{0.603}N_{0.087}, como puede observarse es muy similar a la calculada por Córdova por lo cual se trabajará con esta composición elemental para todos los cálculos posteriores.

ii) Larroche y Gros (1992) también estimaron experimentalmente la composición elemental de las esporas obtenidas a partir de micelio para el mismo medio de cultivo: CH_{1.832}O_{0.724}N_{0.087}. Como puede observarse, las fracciones de todos los elementos son muy similares a las fracciones de los elementos en el micelio por lo cual se asumirá que la composición de la biomasa prácticamente no cambia.

iii) Para simplificar las reacciones intracelulares, y tomando en consideración que interesa evaluar a todos los metabolitos que fueron identificados, se considerarán dos tipos de biomasa: una micelial cuyo rendimiento se expresa como y_c y otra de esporas cuyo rendimiento es y_e.

Experimentalmente se estimó y_c , en el transcurso de la fermentación y se observó una caída de las curvas de biomasa, por lo que se considerará esa caída como y_c tal y como se muestra en la figura 7.16.

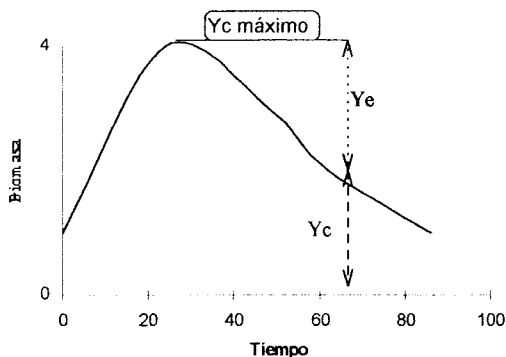
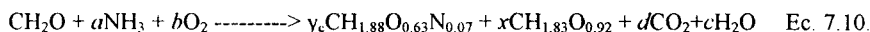


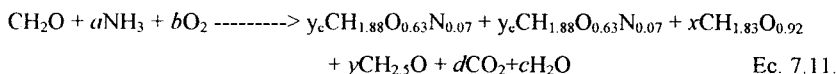
Figura 7.16. Biomasa correspondiente a esporas y a micelio.

Esta misma simplificación se sustenta también en el hecho de que en el momento en el cual inicia la esporulación (después de 24 h) aún existe aproximadamente 45% de la glucosa total en el medio de cultivo y su consumo continúa aún después de la esporulación del hongo, por lo cual sólo se considerará una reacción general de oxidación para cada caso, es decir, la formación de todos los productos a partir de glucosa como se ilustra en las ecuaciones generales de balance:

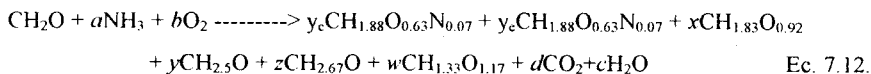
1. *Medio sin metales*: Donde el único metabolito producido fue la trehalosa.



2. *Medio con 45 ppm de iones metálicos*: En este caso se produjeron trehalosa, eritrol y esporas.



3. *Medio con 180 ppm*: Se produjo glicerol, ácido cítrico, trehalosa, eritrol y esporas.



Donde CH_2O es la glucosa; $\text{CH}_{1.88}\text{O}_{0.63}\text{N}_{0.07}$ es la biomasa, el primer término corresponde a la biomasa micelial y el segundo a la biomasa en forma de esporas; $\text{CH}_{1.83}\text{O}_{0.92}$ es la trehalosa; $\text{CH}_{2.5}\text{O}$ es el eritrol; $\text{CH}_{2.67}\text{O}$ es el glicerol; $\text{CH}_{1.33}\text{O}_{1.17}$ es el ácido cítrico. Por otro lado, y_e , y_c , x , y , z , w representan los rendimientos de cada producto respectivamente expresados en moles de carbono compuesto/moles carbono de sustrato consumido. Los componentes de las ecuaciones contienen: 0.4 gC/g glucosa, 0.48 gC/g biomasa micelial, 0.48 gC/g biomasa en esporas, 0.421 gC/g trehalosa, 0.39 gC/g eritrol, 0.39 gC/g glicerol, 0.375 gC/g de ác. cítrico.

Además, se calcularon los siguientes grados de reductancia:

$$\gamma_s = 4$$

$$\gamma_{\text{biomasa}} = 4.41$$

$$\gamma_{\text{trehalosa}} = 3.99$$

$$\gamma_{\text{eritrol}} = 4.67$$

$$\gamma_{\text{glicerol}} = 4.7$$

$$\gamma_{\text{ác. cítrico}} = 2.99$$

Siendo γ_s el grado de reductancia del sustrato (glucosa) el mismo para todos los casos.

En todos los casos la producción de CO_2 (d) se calculó en base a la ecuación 7.7. y el consumo de oxígeno (b) se calculó en base a la ecuación 7.8., mientras que la producción de H_2O se estimó con la ecuación 7.9; modificando cada una de estas ecuaciones dependiendo de los productos formados. De este modo, las fórmulas usadas para cada caso fueron:

1. Medio sin metales:

Balance de materia:

$$a = (\gamma_s q \eta) / \gamma_{\text{biomasa}}$$

$$b = (\gamma_s - y_c \gamma_{\text{biomasa}} - x \gamma_{\text{trehalosa}}) / 4$$

$$c = 1 + 2b - y_c(\eta) - 2d$$

$$d = 1 - y_c - x$$

Balance de energía:

$$e^- \text{ al oxígeno} = 4b/\gamma_s$$

$$e^- \text{ a la biomasa} = \eta = y_c \gamma_{\text{biomasa}}/\gamma_s$$

$$e^- \text{ a la trehalosa} = \xi_{\text{trehalosa}} = x \gamma_{\text{trehalosa}}/\gamma_s$$

2. Medio con 45 ppm de iones metálicos:

Balance de materia:

$$a = (\gamma_s q \eta)/\gamma_{\text{biomasa}}$$

$$b = (\gamma_s - y_c \gamma_{\text{biomasa}} - x \gamma_{\text{trehalosa}} - y \gamma_{\text{eritrol}})/4$$

$$c = 1 + 2b - y_c(\eta) - 2d$$

$$d = 1 - y_c - x - y$$

Balance de energía:

$$e^- \text{ al oxígeno} = 4b/\gamma_s$$

$$e^- \text{ a la biomasa} = \eta = y_c \gamma_{\text{biomasa}}/\gamma_s$$

$$e^- \text{ a la trehalosa} = \xi_{\text{trehalosa}} = x \gamma_{\text{trehalosa}}/\gamma_s$$

$$e^- \text{ a la eritrol} = \xi_{\text{eritrol}} = y \gamma_{\text{eritrol}}/\gamma_s$$

3. Medio con 180 ppm:

Balance de materia:

$$a = (\gamma_s q \eta)/\gamma_{\text{biomasa}}$$

$$b = (\gamma_s - y_c \gamma_{\text{biomasa}} - x \gamma_{\text{trehalosa}} - y \gamma_{\text{eritrol}} - z \gamma_{\text{glicerol}} - w \gamma_{\text{ác. cítrico}})/4$$

$$c = 1 + 2b - y_c(\eta) - 2d$$

$$d = 1 - y_c - x - y - z - w$$

Balance de energía:

$$e^- \text{ al oxígeno} = 4b/\gamma_s$$

$$e^- \text{ a la biomasa} = \eta = y_c \gamma_{\text{biomasa}}/\gamma_s$$

$$e^- \text{ a la trehalosa} = \xi_{\text{trehalosa}} = x \gamma_{\text{trehalosa}}/\gamma_s$$

$$e^- \text{ a la eritrol} = \xi_{\text{eritrol}} = y \gamma_{\text{eritrol}}/\gamma_s$$

$$e \text{ a la glicerol} = \xi_{\text{glicerol}} = z \gamma_{\text{glicerol}}/\gamma_s$$

$$e \text{ a la } \acute{\text{a}}\text{c. cítrico} = \xi_{\text{ác. cítrico}} = x \gamma_{\text{ác. cítrico}}/\gamma_s$$

Los balances se realizaron a cada tiempo debido a que los rendimientos no fueron constantes como ya se había discutido para la biomasa (sección 7.1.).

7.3.3. Balances para el medio sin metales.

En la tabla 7.6. se muestran los coeficientes estequiométricos calculados para el medio sin metales; en términos generales, el mayor rendimiento corresponde al H₂O seguido del CO₂, esto corresponde con lo observado experimentalmente ya que la humedad en este caso se incrementó de 46 a 66%, además se observó un consumo de azúcar del 37.1% y un bajo rendimiento de biomasa (un máximo de alrededor de 0.04 g biomasa/g glucosa) que también se ve reflejado en los coeficientes calculados, además en este caso no se presentó esporulación ni tampoco producción de ácido cítrico. La ecuación de balance a cada tiempo indica que la mayor parte de la glucosa se oxidó hasta CO₂ y H₂O que coincide con los resultados experimentales dado que al final se registró un bajo rendimiento de productos en comparación con el consumo de glucosa (37.5%).

Tabla 7.6. Coeficientes estequiométricos para el medio sin metales

Tiempo (h)	yc Biomasa	x Trehalosa	a NH ₃	b O ₂	d CO ₂	c H ₂ O
26	0	0	0	0,8572	0,8667	0
48	0,0935	0,0398	0,0059	0,8937	0,8995	0,9714
88	0,0578	0,0428	0,0037	0,9068	0,9117	0,9847
119	0,0496	0,0386	0,0032	0,7611	0,7795	0,9873

La distribución de la energía se resume en la Tabla 7.7., se observa que la mayor parte de los electrones son transferidos al oxígeno, lo que sugiere que bajo estas condiciones de cultivo ocurrió una oxidación total de la glucosa. Una mínima parte de los electrones (de 5 a 10 %) se transfiere a la biomasa y a la trehalosa (4%); es decir la formación de la trehalosa como único metabolito acumulado proporciona al hongo una reserva de carbono.

Tabla 7.7. Distribución de la energía en el medio sin metales

Tiempo (h)	$4b/\gamma_s$ e- al O ₂ -	η_b e-biomasa	ξ_t e-trehalosa
26	0	0	0
48	0,8572	0,1031	0,0397
88	0,8937	0,0637	0,0427
119	0,9068	0,0547	0,0385

7.3.4. Balances para el medio con 45 ppm de metales.

En la Tabla 7.8. se muestran los coeficientes estequiométricos calculados para el medio con 45 ppm. Análogamente al medio sin metales, la mayor producción correspondió al CO₂ y al H₂O, aunque fue ligeramente menor debido a que no sólo se sintetizó trehalosa, sino también eritrol. Puede observarse que desde el momento de la esporulación (48 h) la cantidad de trehalosa y eritrol en el medio disminuyó paulatinamente, probablemente debido a que se consumió como fuente de carbono.

Tabla 7.8. Coeficientes estequiométricos para el medio con 45 ppm

Tiempo (h)	y_o Micelio	y_o Esporas	x Trehalos a	y Eritrol	b NH ₃	d CO ₂	c H ₂ O	a Micelial	a Esporas
26	0,1374	0,0000	0,0230	0,0235	0,7980	0,8160	0,9432	0,0096	0,0000
48	0,0329	0,1045	0,0256	0,0437	0,7720	0,7933	0,9441	0,0023	0,0073
64	0,0199	0,1176	0,0183	0,0329	0,7918	0,8114	0,9452	0,0014	0,0082
88	0,0096	0,1278	0,0087	0,0166	0,8204	0,8373	0,9482	0,0007	0,0089
119	0,0073	0,1301	0,0014	0,0140	0,8308	0,8472	0,9484	0,0005	0,0091

En este caso se presentó una distinción entre biomasa micelial y de esporas, puede observarse que el hongo esporuló después de las 26 h de fermentación y la esporulación aumentó con respecto al tiempo como era de esperarse.

La distribución de energía se resume en la tabla 7.9., donde nuevamente se observa que la mayor cantidad de electrones son transferidos al oxígeno seguido de la biomasa micelial. Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Córdova (1994), donde para un medio con 300 g/l de glucosa y limitado en nitrógeno la mayor parte de los electrones (56%) se dirigen hacia el oxígeno mientras que η_b es del orden de 0.19, valor muy similar al máximo encontrado en este caso de 0.15.

Tabla 7.9. Distribución de la energía para el medio con 45 ppm.

Tiempo (h)	$4b/y_s$ e- al O ₂	η_b e-biomasa	η_b e- esporas	ξ_t e-trehalosa	ξ_e e- eritrol
26	0,7980	0,1515	0,0000	0,0230	0,0275
48	0,7720	0,0363	0,1152	0,0255	0,0510
64	0,7918	0,0219	0,1296	0,0182	0,0384
88	0,8204	0,0106	0,1409	0,0087	0,0194
119	0,8308	0,0080	0,1435	0,0014	0,0163

Se observa que después de 26 h de fermentación, el eritrol acumula la mayor parte de la energía en comparación a la trehalosa, lo que sugiere un gasto energético superior al requerido para la formación de trehalosa. En este caso es probable que la síntesis de eritrol se haya presentado cuando las condiciones fueron más adversas debido a que este metabolito es más efectivo como osmoregulador.

7.3.5 Balances para el medio con 180 ppm de metales.

En la tabla 7.10. se muestran los coeficientes estequiométricos para el medio con 180 ppm, nuevamente se observa que la mayor producción corresponde al CO₂ y al H₂O. En este caso se formaron más esporas.

Tabla 7.10. Coeficientes estequiométricos para el medio con 180 ppm

Tiempo (h)	yc Micelio	ye Esporas	x Trehalosa	y Eritrol	z Glicerol	w Citrico	b NH ₃	d CO ₂	c H ₂ O	a Micelial	a Esporas
26	0,1232	0,0000	0,0203	0,0321	0,0370	0,0000	0,7629	0,7874	0,9344	0,0086	0,0000
48	0,0390	0,0842	0,0181	0,0447	0,0243	0,1765	0,6335	0,6132	1,0310	0,0027	0,0059
64	0,0012	0,1220	0,0182	0,0134	0,0000	0,1568	0,7132	0,6885	1,0332	0,0001	0,0085
88	0,0000	0,1232	0,0137	0,0124	0,0000	0,1514	0,7230	0,6994	1,0304	0,0000	0,0086
119	0,0000	0,1232	0,0086	0,0136	0,0000	0,1374	0,7371	0,7173	1,0229	0,0000	0,0086

En la Tabla 7.10. se observa que al tiempo final de la fermentación cerca del 72% del carbono se encuentra en forma de CO₂, experimentalmente se cuantificó el CO₂ en un medio con la misma concentración de iones metálicos pero empleando una tasa de aereación más baja (30 ml/min) y se encontró que cerca del 72% de la glucosa inicial se oxidó hasta CO₂. En la Figura 7.17. se muestran estos resultados que validan los calculados con este método.

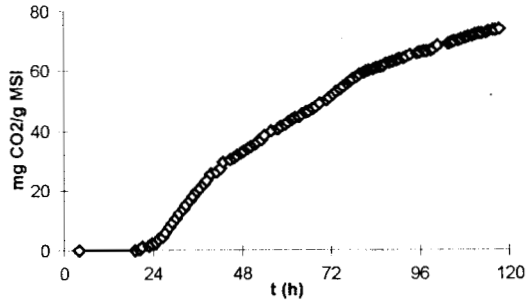


Figura 7.17. Producción acumulada de CO₂ en un medio con 180 ppm de iones metálicos y una tasa de aereación de 30 ml/min.

En la tabla 7.11. se muestra la distribución de la energía para el medio con 180 ppm, en este caso también la mayor parte de la energía es transferida al O₂ seguido de la biomasa y del ácido cítrico; en este caso, donde destaca que la mayor parte de la biomasa se encuentra en forma de esporas, se presentó la producción de ácido cítrico y glicerol, y los valores tanto para $4b/\gamma_s$ como para η y para ξ_p (suma de todos los productos) se asemejan más a lo encontrado por Córdova en 1994 ($4b/\gamma_s = 0.56$, $\eta = 0.19$; $\xi_p = 0.25$).

En este caso es evidente durante las primeras horas de fermentación la mayor cantidad de la energía transferida a los productos fue requerida para la síntesis de glicerol posteriormente, cuando se inició el consumo de glicerol, se favoreció la síntesis de cítrico necesitándose una cantidad de energía muy similar a la destinada a la formación de esporas; se ha reportado que el glicerol es el metabolito más efectivo (tal vez por ser el más pequeño) para la osmorregulación del citoplasma sin embargo el costo energético para su biosíntesis es superior al requerido para la síntesis de eritrol y trehalosa por lo que esto explica que se le haya encontrado en el medio con condiciones más severas (180 ppm de iones metálicos).

Tabla 7.11. Distribución de la energía para el medio con 180 ppm.

Tiempo (h)	$4b/\gamma_s$ e- al O ₂	η_b e-biomasa	η_b e- esporas	ξ_t e- trehalosa	ξ_e e- eritrol	ξ_g e-glicerol	ξ_c e-citríco
26	0,7629	0,1358	0,0000	0,0202	0,0375	0,0435	0,0000
48	0,6335	0,0430	0,0928	0,0180	0,0521	0,0286	0,1320
64	0,7132	0,0013	0,1345	0,0181	0,0156	0,0000	0,1172
88	0,7230	0,0000	0,1358	0,0136	0,0145	0,0000	0,1131
119	0,7371	0,0000	0,1358	0,0086	0,0158	0,0000	0,1027

En todos los caso analizados, la cantidad de H₂O generada fue muy similar (de 0.95 a 1.00 moles) lo cual coincide con lo observado experimentalmente con el contenido de humedad que se muestra en la figura 7.18., en todos los casos la humedad presentó perfiles similares atribuibles a: *i*) se consumió la glucosa y es posible retener más agua en la amberlita; *ii*) la elevada capacidad de retención de agua de la amberlita y *iii*) la generación de agua como producto del metabolismo, que en todos los casos toma valores cercanos a un mol.

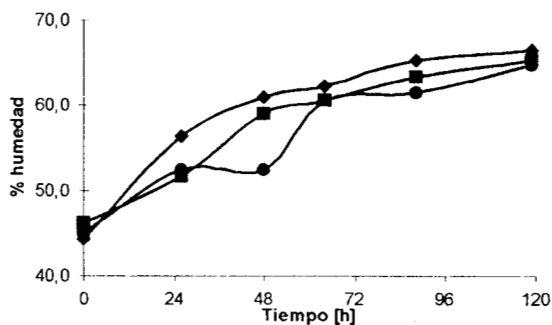


Figura 7.18. % humedad. ■ Sin metales; ● 45 ppm; ● 180 ppm.

En términos generales, el costo energético para la producción de osmorreguladores (eritrol y glicerol) justifica que se biosinteticen los más efectivos (y costosos energéticamente) sólo cuando las condiciones del medio son extremas. De esta manera, la trehalosa (el metabolito de menor costo energético) se acumula cuando el estrés osmótico no es tan severo y aparentemente sólo constituye una reserva de energía mientras que el glicerol (de mayor costo energético) se produce

cuando las condiciones de estrés osmótico son muy severas a causa de elevadas concentraciones de iones metálicos.

La gran producción de CO₂ calculada en todos los casos justifica que a pesar de observarse un consumo casi total de la glucosa en el medio de cultivo se encontraron bajos rendimientos de metabolitos.

Aparentemente, mientras la proporción de esporas fue mayor en comparación a la producción de micelio se produjo más ácido cítrico sugiriendo que esta forma morfológica es eficiente en la producción del ácido cuando se cultiva al hongo en medio sólido; una revisión de Cochrane (1975), reporta que para *Aspergillus niger* la vía de las pentosas es predominante antes de la esporulación mientras que la vía de la hexosa monofosfato (en donde se localiza el paso de la síntesis de ácido cítrico) es más activa cuando el hongo se encuentra en forma de esporas; además de que el metabolismo oxidativo parece ser esencial en la esporulación de muchos hongos y están activadas las enzimas clave del ciclo de los ácidos tricarbóxicos durante el desarrollo de los conidióforos (Smith, 1975).

Conclusiones.

A medida que se incrementó la concentración inicial de iones metálicos, una mayor cantidad de energía se destinó a la formación de metabolitos lo que sugiere un desacoplamiento metabólico. El glicerol representó un costo energético mayor al requerido para la síntesis de eritrol esto sugiere que la síntesis de glicerol tiene lugar cuando la presencia de eritrol no es suficiente para osmorregular el citoplasma con el medio externo.

Se presentó una gran producción de CO₂ que justifica el bajo rendimiento de los metabolitos; también se presentó una importante producción de H₂O por lo que se incrementó la humedad.

7.4. Distribución de iones metálicos.

La concentración de metales traza tiene un impacto significativo en el tipo y cantidad de metabolitos acumulados por las especies de *Aspergillus*, principalmente el Cu^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} y Zn^{2+} ; existen numerosos reportes en cultivo sumergido, en los cuales se menciona que es necesaria una estricta deficiencia de iones metálicos, principalmente Mn^{2+} , para obtener altas concentraciones de ácido cítrico.

De este modo, se hicieron cinéticas de distribución de los iones metálicos, distinguiendo la fracción soluble de la insoluble.

Para realizar este estudio, la muestra recibió dos tratamientos a fin de tener las dos fracciones que fueron analizadas por separado: la fracción “insoluble” que corresponde a los metales que precipitan en la fracción reticulada de la amberlita más los metales que fueron incorporados a la biomasa y la fracción “soluble” que corresponde a los metales que pueden ser extraídos por disolución en agua (ver materiales y métodos).

Debido a que se conoce la existencia del fenómeno de “ensuciamiento” en la amberlita el cual consiste en la precipitación de sales en la superficie de la resina y en algunos casos también dentro de la estructura de la amberlita, principalmente por óxidos; la solubilidad de cada sal juega un papel determinante en su disponibilidad para el hongo y deberá ser tomada en cuenta para el análisis; así que se procedió a evaluar la disponibilidad de las sales para el hongo en el tiempo cero.

En la tabla 7.12. se muestra la disponibilidad de cada sal tanto en agua fría como en agua caliente, las temperaturas del análisis se muestran en el superíndice derecho. Se puede observar que en agua fría (como fueron extraídos a fin de no permeabilizar la membrana celular) el $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ es notablemente menos soluble seguido del $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (casi dos veces más soluble que la sal de hierro) y finalmente $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ respectivamente.

Tabla 7.12. Solubilidad de las sales usadas como fuente de metales.

Sal usada	g/100 ml H_2O fría	g/100 ml H_2O caliente
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	31.6 ⁸	203.3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	15.65 ⁰	48.6
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	151 ⁸	656
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	71 ²⁰	91
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	96.5 ²⁰	663.6

Fuente: Handbook of Chemistry and Physics. 1953

En la figura 7.18. se muestra la concentración inicial de metales adicionada a la amberlita (en ppm) contra la concentración de iones metálicos encontrada en la fracción soluble. Para los cinco metales los datos ajustan a una línea recta con un coeficiente de correlación superior a 0.93 y la pendiente nos da una idea de la solubilidad de los metales, entre más se acerca la pendiente al valor de 1, la solubilidad es mayor; en base a esto, los valores experimentales de solubilidad coincide con los reportados de la tabla 7.12.

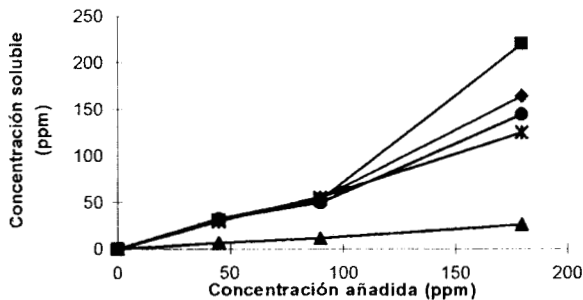


Figura 7.18. Concentración en la fracción soluble para los tiempos iniciales.
 ▲ Hierro ($m = 0.1414$); * Cobre ($m = 0.0.6911$); ● Magnesio ($m = 0.0.7940$);
 ● Zinc ($m = 0.9387$); ■ Manganeso ($m = 1.2275$)

Las pendientes calculadas son las siguientes:

$$\text{Hierro } (m=0.1414) < \text{Cobre } (m=0.6911) < \text{Magnesio } (m=0.7940) < \text{Zinc } (m=0.9387) < \text{Manganeso } (m=1.2275).$$

De este modo se procedió a analizar las dos fracciones de las fermentaciones sólidas con 45 y 180 ppm de los cinco metales. Las fracciones soluble e insoluble fueron medidas en el transcurso del tiempo a fin de determinar si se presentaba o no retención de los metales como posible consecuencia del desarrollo microbiano. Los resultados para cada metal se presentan en los siguientes subcapítulos. En todos los casos las determinaciones de las fracciones soluble e insoluble se normalizaron dividiendo cada una de las fracciones entre la suma de las dos a fin de visualizar el problema con números en una escala de cero a uno.

7.4.1. Distribución de hierro.

El hierro actúa como un catalizador en diversas reacciones enzimáticas, la concentración requerida para un crecimiento máximo no está necesariamente relacionada con la concentración óptima para el control de la síntesis de ciertos productos microbianos como la producción del ácido cítrico o para realizar algún proceso fisiológico específico (Rowe y Arceneaux, 1977).

En la figura 7.19A. se muestran las cinéticas de distribución de iones en forma normalizada en el caso del hierro en su forma soluble y en su forma fracción insoluble, y en la figura 7.19B se muestran la producción de biomasa y el consumo de glucosa. Se observa claramente que la fracción insoluble es predominante desde el tiempo inicial y posteriormente ésta tiende a incrementar.

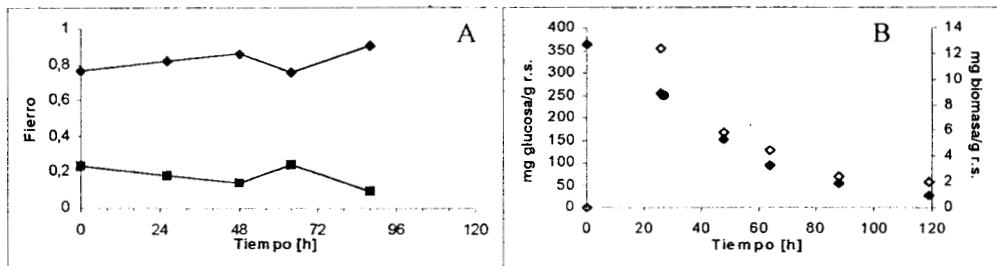


Figura 7.19. Cinética de distribución de hierro con 45 ppm.

A. ◆ Fracción insoluble; ■ Fracción soluble. B. ◇ Biomasa producida; ◆ Consumo de glucosa

La fracción insoluble siempre es predominante debido a la baja solubilidad del hierro. Existe un pequeño incremento de esta fracción que coincide con el inicio del consumo de la glucosa y se observa la misma tendencia en el medio con 180 ppm que se muestra en la figura 7.20.

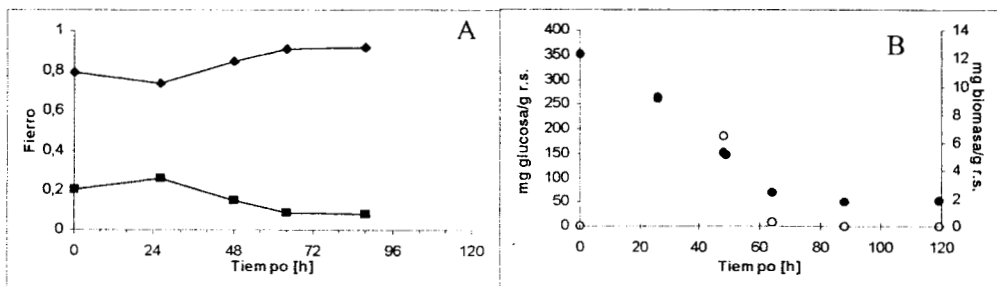


Figura 7.20. Cinética de distribución de hierro con 180 ppm.

A. ◆ Fracción insoluble; ■ Fracción soluble. B. ◇ Biomasa producida; ◆ Consumo de glucosa

En ambos casos la parte insoluble aumentó ligeramente a partir de las 24 horas de cultivo, momento en el cual las esporas ya germinaron y se encuentra la biomasa máxima, y es entre las 48 y las 64 horas de fermentación cuando se da el aumento más significativo de la fracción insoluble (alrededor de 10% en el medio con 45 ppm y de 20% para el medio con 180 ppm).

La gran retención de iones podría deberse a que el microorganismo produjo otros metabolitos y acidificó el medio provocando probablemente un desplazamiento de los iones que saturaban la resina.

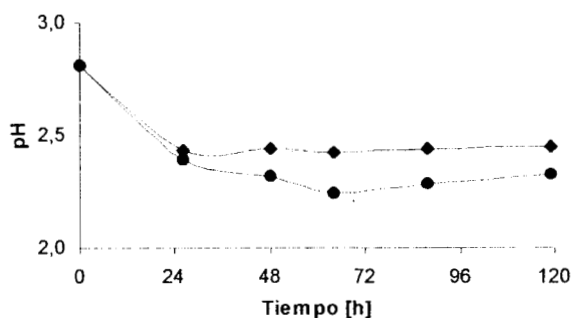


Figura 7.21. pH con respecto al tiempo. ◆ 45 ppm; ● 180 ppm.

En la figura 7.21 se presenta la cinética de pH para los casos de 45 y 180 ppm, el pH medido disminuyó, esto debería de favorecer la disolución de las sales, sin embargo, esto no ocurrió. Posiblemente en la matriz interna de la amberlita, dado que se secuestran los iones negativos y se rechazan los positivos pudo existir un pH diferente al medido que favoreció entonces la precipitación de los metales.

Se observa que independientemente de la concentración de hierro usada, la distribución porcentual entre soluble e insoluble es prácticamente la misma y las curvas siguen el mismo perfil; esto podría atribuirse a que, como lo indicó el análisis del tiempo inicial al aumentar la concentración inicial de iones metálicos nunca se presentó una meseta que indicara que se estaba saturando la fracción soluble con el metal.

Posiblemente, aunque la precipitación es mayor al aumentar la concentración de iones metálicos, también deberá de aumentar la cantidad de metal soluble alcanzándose una concentración crítica tal

que incremente la presión osmótica y favorezca la producción de glicerol y consecuentemente la de ácido cítrico.

7.4.2. Distribución de cobre.

Se ha reportado que la cantidad de cobre es mayor en las esporas de los hongos que en el micelio, y este mecanismo es inverso para los otros metales (Vézina y Singh, 1975). Aunque no se ha establecido con exactitud a qué se debe este fenómeno, podría ser atribuido al cambio en la composición de las proteínas entre el micelio y las esporas por lo que podría modificarse el contenido de metaloproteínas en estas dos fracciones, así como también a la diferencia entre las rutas metabólicas de las dos expresiones morfológicas por lo cual la necesidad de cofactores enzimáticos puede variar.

En la figura 7.22. podemos observar las fracciones normalizadas soluble e insoluble. La fracción soluble es predominante en el tiempo inicial, pero disminuyó rápidamente desde las 24 horas de fermentación.

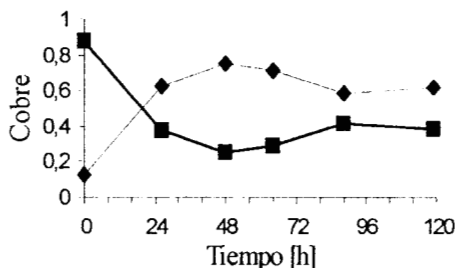


Figura 7.22. Cinética de distribución de cobre con 45 ppm.

● Fracción insoluble; ■ Fracción soluble.

Se puede observar que a partir del momento en que inicia el consumo de glucosa y se obtiene el máximo del crecimiento los perfiles se invierten, incrementándose en forma importante la fracción insoluble.

En la figura 7.23. se muestran las fracciones soluble e insoluble para el medio con 180 ppm. Se observa en general una tendencia muy similar al caso anterior: en el tiempo inicial predomina la fracción insoluble y a partir de las 24 horas ésta disminuyó.

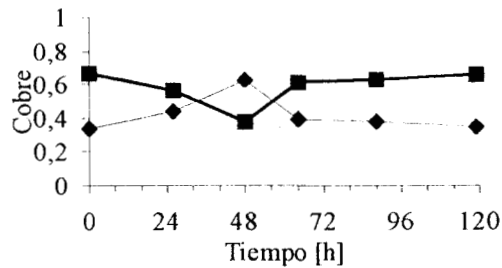


Figura 7.23. Cinética de distribución de cobre con 180 ppm.
 ◆ Fracción insoluble; ■ Fracción soluble.

Cuando inicia la esporulación (48 h) la fracción soluble es predominante, después disminuye posiblemente debido a que se favorece la producción de ácido cítrico y se liberan iones sulfato y fosfato que precipitaron al cobre.

Esto sugiere que en estudios posteriores se analice con precisión la forma salina del metal. Existen algunos reportes en los que por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) se pueden estimar cantidades de sales muy pequeñas (Schuster y Hampel, 1992).

Nuevamente se presentó el fenómeno del aumento en fracción insoluble que representa aproximadamente más de 100 veces la concentración tolerada por un microorganismo, por lo que el aumento no es atribuible a que el hongo lo incorpore a su biomasa; sino a cambios fisicoquímicos en el microsistema.

7.4.3. Distribución de magnesio.

El magnesio es el catión más abundante en las células y es considerado como un micronutriente y no como elemento traza, como en el caso de los otros cuatro metales. En la figura 7.24. se muestran la cinética de distribución de iones magnesio para el medio que contenía 45 ppm del metal. Se puede observar que sólo se presentó un ligero aumento a partir de las 24 horas de la fracción insoluble y posteriormente permaneció casi constante hasta el final de la fermentación.

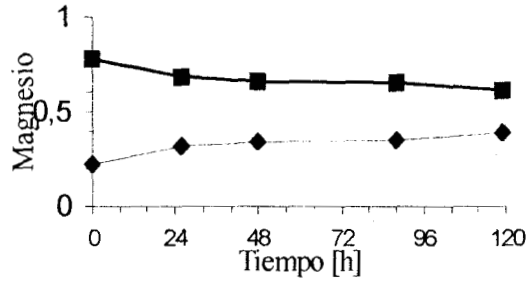


Figura 7.24. Cinética de distribución de magnesio con 45 ppm.
 ◆ Fracción insoluble; ■ Fracción soluble.

Por otro lado, en la figura 7.25 se muestran las cinéticas de distribución de iones de las fracciones soluble e insoluble para el medio que contenía 180 ppm del metal. Se puede observar que sólo se presentó un ligero aumento entre las 24 y las 48 horas de fermentación en la fracción insoluble y posteriormente permaneció casi constante hasta el final de la fermentación igual que en el caso anterior.

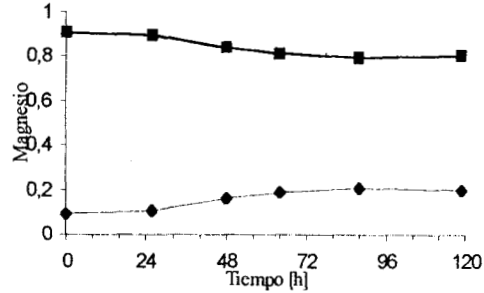


Figura 7.25. Cinética de distribución de magnesio con 180 ppm.
 ◆ Fracción insoluble; ■ Fracción soluble.

El incremento de la fracción insoluble es alrededor de 4 veces más alta a la reportada en otros microorganismos; otra posibilidad es que los iones permanezcan sólo adheridos a la superficie del micelio y no penetren en la célula.

7.4.4. Distribución de zinc.

El zinc se requiere para la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, también se a sugerido que el zinc influye en la morfología y pigmentación de los “pellets” de micelio de *Aspergillus niger* en cultivo líquido: al aumentar la concentración de zinc los pellets son grandes y blancos, al disminuir la concentración los pellets son pequeños y de color amarillo brillante (Wold y Suzuki, 1976).

En la figura 7.26. se muestra la cinética de distribución de zinc para el medio con 45 ppm, y en la figura 7.27. los resultados para el medio con 180 ppm. En ambas figuras la tendencia es muy similar, la fracción insoluble tiende a incrementarse paulatinamente en forma muy parecida al magnesio y al manganeso; la disminución de la fracción soluble coincide con el valor máximo de biomasa en ambos casos.

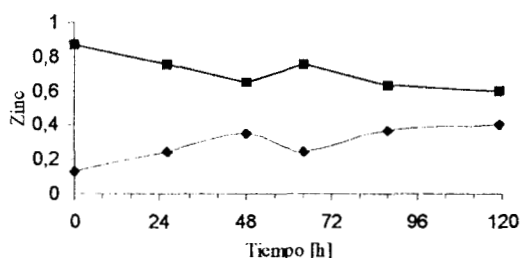


Figura 7.26. Cinética de distribución de zinc con 45 ppm.

◆ Fracción insoluble; ■ Fracción soluble.

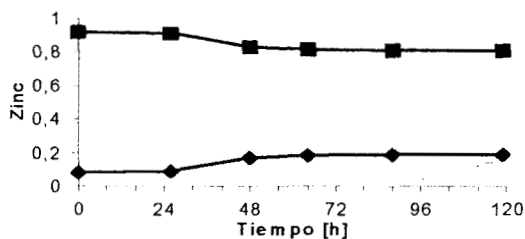


Figura 7.27. Cinética de distribución de zinc con 180 ppm.

◆ Fracción insoluble; ■ Fracción soluble.

7.4.5. Distribución de manganeso.

El manganeso es necesario para la síntesis de muchos metabolitos secundarios, es indispensable para la esporulación de las bacterias y para el funcionamiento de muchas enzimas. El manganeso también influye en la morfología del hongo.

En la Figura 7.28. se muestran las cinéticas de distribución de iones para el medio con 45 ppm de iones metálicos.

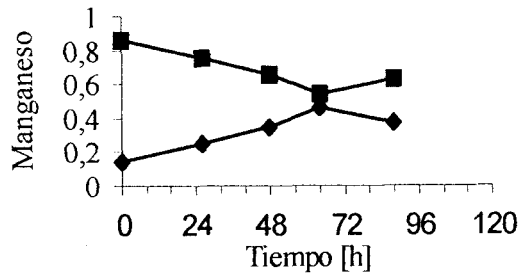


Figura 7.28. Cinética de distribución de manganeso con 45 ppm.
◆ Fracción insoluble; ■ Fracción soluble.

Se observó un ligero incremento de la fracción insoluble como en todos los casos anteriores mismo que coincide con el valor máximo de biomasa.

En la Figura 7.29. se presentan los valores normalizados para el medio con 180 ppm de manganeso, en este caso también se observa un ligero incremento de la fracción insoluble sólo que en este caso ocurre en el momento en el cual inicia la esporulación del hongo.

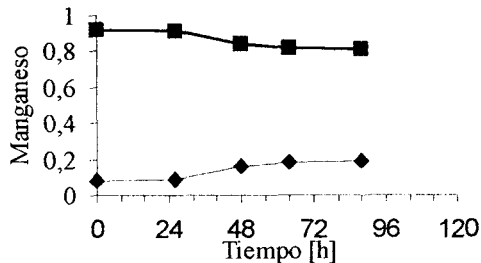


Figura 7.29. Cinética de distribución de manganeso con 180 ppm.
◆ Fracción insoluble; ■ Fracción soluble.

La similitud entre las curvas para magnesio, manganeso y zinc es atribuible a la similitud entre la solubilidad de las sales, como se mostró en la tabla 7.12. las sales usadas de estos compuestos presentan la más alta solubilidad y además es muy parecida entre sí en comparación con las sales de fierro y de cobre cuya solubilidad es menor.

Conclusiones.

El incremento de la fracción insoluble puede atribuirse a cambios fisicoquímicos del microsistema ocurridos por el metabolismo del hongo: la producción de metabolitos, acidificación del medio, posible liberación de sulfatos y fosfatos en el medio que tuvieron la oportunidad de ligarse con los metales y provocar la precipitación (las sales de fosfato son poco solubles).

8. Conclusiones generales.

Cuando *Aspergillus niger* es cultivado en medio sólido con altas concentraciones de iones metálicos (45 y 180 ppm) el $Y_{x/s}$ máximo no se ve afectado en forma importante, aunque se aprecian diferencias en la velocidad de consumo de glucosa y en la máxima producción de biomasa. Por otra parte, cuando el microorganismo se desarrolla en un medio que carece de metales, disminuye la máxima producción de biomasa hasta en un 50% en comparación a los casos anteriores, así como también disminuye la velocidad máxima de consumo de glucosa en un 90%; esto puede atribuirse al estado de estrés en el cual se desarrolla el hongo pues no tiene suficientes cofactores enzimáticos para llevar a cabo en forma eficiente sus reacciones.

La trehalosa se produce en los tres medios de cultivo y constituye un metabolito de reserva para el hongo.

Las elevadas concentraciones de iones metálicos inducen la formación de solutos compatibles como son glicerol y eritrol; los cuales permiten osmorregular el citoplasma con el medio externo. Parte de estos metabolitos son excretados al medio.

El eritrol se produce cuando las condiciones no son tan severas (45 ppm de metales) mientras que la producción de glicerol tiene lugar cuando el estrés es tan fuerte que el eritrol no es suficiente para osmoregular el citoplasma; la producción de glicerol representa un costo energético mayor, como lo demostraron los balances de Erickson. Una vez que se consumen dos terceras partes de la glucosa del medio, cesa la síntesis de glicerol en el citoplasma y aparentemente existe suficiente glicerol para inhibir a la isocitrato deshidrogenasa favoreciendo la síntesis de ácido cítrico. El glicerol se consume, pero existe una cantidad tal de cítrico que probablemente permite un descenso de pH y la enzima isocitrato deshidrogenasa continúa inhibida por lo que el cítrico sigue acumulándose.

Esto sugiere que es más importante la inhibición de la isocitrato deshidrogenasa por la presencia de glicerol que la estimulación de la aconitasa y la α -cetoglutarato deshidrogenasa por la presencia de metales para la acumulación de ácido cítrico.

La esporulación del hongo se incrementa conforme aumenta la concentración de iones metálicos, como respuesta al estrés osmótico al que fue sometido el microorganismo.

A excepción del hierro (que es el metal más insoluble), en el tiempo inicial la mayor cantidad de iones se acumula en la fracción soluble, aumentando conforme se incrementó la concentración de iones en el medio de cultivo, lo que sugiere que no se llegó a saturar la solución que contiene los nutrientes

disponibles para el hongo. La distribución de iones metálicos, independientemente de la sal usada, se incrementó en la fracción insoluble, esto no puede ser atribuido totalmente al hongo debido a que la adsorción fue mucho mayor a lo que reporta la literatura como concentración constituyente del microorganismo, así que puede deberse a los cambios que ocurren en el ambiente como consecuencia de la actividad metabólica y de la producción de metabolitos. Por esta razón se sugiere en trabajos posteriores realizar un análisis más detallado al respecto y tratar de analizar en forma independiente al micelio y a la amberlita.

9. Bibliografía.

- Adler, L., Pederson, A. and Tunbland-Johanasson, Y., 1982. Polioliol accumulation by two filamentous fungi grown at different concentration of NaCl. **Physiol. Plant.** 56 : 139-142.
- Amar, A.H.S. 1994. Determinación de parámetros físicos en sistemas de fermentación sólida sobre soportes inertes. **Informe final de Servicio Social.** UAM-I.
- Aravantinos-Zafiris, G, Tzia,C., Oreopoulou, V. and Thomopoulos, C.D. 1994. Fermentation of orange processing wastes for citric acid production. **J. Sci. Food Agric.** 65 : 117-120.
- Arora, D.K. and Bigelis, R. 1992. Organic acids of fungi. En: **Handbook of Applied Mycology. Fungal Biotechnology.** Vol. 4. Arora, D.K., Elander, R.D. and Mukerji, K.G. (Ed.). Dekker. U.S.A.
- Atkinson, B and Mavituna, F., 1991. Biochemical engineering and biotechnology handbook. Macmillan Publisher LTD 2ª edición. Gran Bretaña. : 1173-1176.
- Auria, R., Hernández, S., Raimbault, M. and Revah, S., 1990. Ion exchange resin: a model support for solid state growth fermentation of *Aspergillus niger*. **Biotechn. Techn.** 4(6) : 391-396.
- Blumenthal, H.J. 1976. Reserve carbohydrates in fungi. En: **The filamentous fungi. Biosynthesis and metabolism.** Vol. 2. Smith, J.E. and Berry, D.R. (Ed.) . Edward Arnold. Gran Bretaña. 292-307.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72 : 248-254.
- Brown, A.D. 1974. Microbial water regulations: features of the intracellular composition of sugar tolerant yeast. **J. Bacteriol.** : 118-769.
- Byers, B.R. and Arceneaux, J.E.L. 1975. Microbial transport and utilization of iron. En: **Microorganism and minerals.** Microbiology series Vol. 3. Weinber, E.D. (Ed.). Dekker. U.S.A.
- Chester, C.G.C. and Rolinson, G.N. 1951. Zinc in the metabolism of a strain of *Aspergillus niger*. **J. Gen. Microbiol.** 5 : 553-558.
- Cochrane, V.W. 1975. Glycolisis. En: **The filamentous fungi.** Vol. 2. Smith, J.E. and Berry, D.R. (Ed.). Edward Arnold. Gran Bretaña.

- Córdova, L.J.A., 1994. Efecto de la concentración inicial de glucosa en el crecimiento y la producción de ácido cítrico en *Aspergillus niger* por fermentación en estado sólido. **Tesis para obtener el grado de Maestro en Biotecnología**. UAM-I.
- da Silva J.J.R.F. and Williams. 1991. The biological chemistry of the elements. The inorganic chemistry of life. Clarendon Press-Oxford. Gran Bretaña.
- Erickson, L.E., Minkevich, I.G. and Eroshin, V.K., 1978. Application of mass and energy balance regularities in fermentation. **Biotechnol. Bioeng.** 20 : 1595-1621.
- Failla, M.L. 1975. Zinc: Functions and transport in microorganism. En: **Microorganism and minerals**. Microbiology series Vol. 3. Weinber, E.D. (Ed.). Dekker. U.S.A.
- Gervais, P., Molin, P. and Bensoussan, M. 1988. Influence of the water activity of a solid substrate on the growth rate and sporogenesis of filamentous fungi. **Biotechnol. Bioeng.** 31 : 457-463..
- Guerinot, M.L. 1994. Microbial iron transport. **Annu. Rev. Microbiol.** 48 : 743-772.
- Gutiérrez, M.R., Amar, A.H.S., Auria, R., Revah, S. and Favela, E.T. 1996. Heat transfer in citric acid production by solid state fermentation. **Process Biochemistry** 31(4) : 363-369.
- Gutiérrez, M.R., Córdova, J., Auria, R., Revah, S. and Favela, E.T. 1995. Citric acid and polyols production by *Aspergillus niger* at high glucose concentration in solid state fermentation on inert support. **Biotechnology Letters.** 17(2) : 219-224.
- Gutiérrez, M.R. y Favcla, E.T. 1992. Curso de fermentación en medio sólido. Biotecnología para el aprovechamiento de residuos agroindustriales y municipales. UAM-I.
- Hang, Y.D. 1988. Microbial production of citric acid in fixed bed column bioreactors. **Biotechnol. Lett.** 6(10) : 183-186.
- Hang, Y.D. and Woods, E.E. 1987. Effect of substrate moisture content on fungal production of citric acid in a solid state fermentation system. **Biotechnology Lett.** 9(3) : 183-186.
- Hocking, A.D. 1993. Responses of xerophilic fungi to changes in water activity. En: **Stress tolerance of fungi**. Jennings, D.H. (Ed.). Library of Congress Cataloging-in-Publication Data. U.S.A. 233-256.
- Jasper, P and Silver, S. 1977. Magnesium transport in microorganism.. En: **Microorganism and minerals**. Microbiology series Vol. 3. Weinber, E.D. (Ed.). Dekker. U.S.A. : 8-47.

- Kisser, M., Kubicek, C.P. and Röhr, M. 1980. Influence of manganese on morphology and cell wall composition of *Aspergillus niger* during citric acid fermentation. **Arch. Microbiol.** 128 : 26-33.
- Kubicek-Pranz, E.M., Mozelt, M., Röhr, M. and Kubicek, C.P. 1990. Changes in the concentration of fructose 2,6-biphosphate in *Aspergillus niger* during stimulation of acidogenesis by elevated sucrose concentration. **Biochimica et Biophysica Acta.** 1033 : 250-255.
- Kubicek, C.P. and Röhr, M. 1982. Novel trends in physiology and technology of citric acid production. En: **Overproduction of microbial products.** Krumphanz, V., Sikita, B. and Vanek Z. (Ed.). Academic Press. Londres.
- Lakshminarayana K., Chaudhery, K., Athira, S. and Tauro, P. 1975. A solid state fermentation method for citric acid production using sugar cane bagase. **Biotechnol. Bieng.** XVII : 291-293.
- Larroche, C. and Gros, J.B., 1992. Characterization of the growth and sporulation behavior of *Penicillium roquefortii* in solid state fermentation by material and bioenergetic balances. **Biotechnol. Bioeng.** 39 : 815-827.
- Laukevics, J.J., Apsite, A.F., Viesturs, U.S. and Tengerdy, R.P., 1985. Steric hindrance of growth of filamentous fungi in solid substrate fermentation of wheat straw. **Biotechnol. Bioeng.** 27 : 1687-1691.
- Legisa, M. and Matthey, M. 1986a. Glycerol as an initiator of citric acid accumulation in *Aspergillus niger*. **Enzyme Microbiol. Technol.** 8 : 258-259.
- Legisa, M. and Matthey, M. 1986b. Glycerol synthesis by *Aspergillus niger* under citric acid accumulating conditions. **Enzyme Microbiol. Technol.** 8 : 607-609.
- Legisa, M. and Matthey, M. 1988. Citrate regulation of the change in carbohydrate degradation during the initial phase of the citric acid production by *Aspergillus niger*. **Enzyme Microbiol. Technol.** 10 : 33-36.
- Legisa, M. and Kidric, J., 1989. Initiation of citric acid accumulation in the early stages of *Aspergillus niger*. **Appl. Microbiol. Technol.** 453-457.
- Ma, H., Kubicek, C.P. and Röhr, M. 1985. Metabolic effects of manganese deficiency in *Aspergillus niger*: evidence for increased protein degradation. **Arch. Microbiol.** 141 : 266-268.

- Mudgett, E.R., 1986. Solid state fermentations. En: **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**. De. A.L. Demian and N.A. Solomon. American Society for Microbiology. Washington, D.C., : 66-83.
- Nauzer, J.M. 1966. Aconitase and isocitric dehydrogenases of *Aspergillus niger* in relation to citric acid production. **J. gen. Microbiol.** 44 : 73-81.
- Oriol, E., Schettino, B., Viniegra, G. and Raimbault, M. 1988. Solid state culture of *Aspergillus* on support. **J.Ferment. Technol.** 66(1) : 154.156.
- Pintado, J., Murado, M.A., González, M^oP, Miron, J. and Pastrana, L. 1993. Joint effect of nitrogen and phosphorus concentrations on citric acid production by different strain of *Aspergillus niger* grown on an effluent. **Biotechnology Lett.** 15(11) : 1157-1162.
- Pirt, S.J. 1975. General nutrition. En: **Principles of microbe and cell cultivation**. Blackwell Sci. Pub., London.
- Quintero, R.R. 1990. Modelos cinéticos de crecimiento celular. En: **Ingeniería bioquímica. Teoría y aplicaciones**. De. Alhambra Mexicana. : 43-50.
- Raimbault, M. and Alazard, D. 1980. Culture method to study fungal growth in solid fermentation. **European J. Appl. Microbiol.** 9 : 199-209.
- Ramesh, M.V. y Lonsane, B.K. 1991. Regulation of alphamylase production in *Bacillus licheniformis* M27 by enzyme end products in submerged fermentation system. **Biotechnol. Lett.** 13(5) : 355-360.
- Röehr, M., Kubicek, C.P. and Kominek, J. 1992. Industrial acids and other small molecules. En: **Aspergillus. Biology and industrial applications**. Benett, J.W. and Klich, M.A. (Ed.). Butterworth-Heinemann. U.S.A.
- Roukas, T. and Kotezekidou, P. 1987. Influence of some trace metals and stimulants on citric acid production from brewery by *Aspergillus niger*. **Enzyme Microb. Technol.** 9 : 291-294.
- Schuster, G. and Hampel, W.A. 1992. Determination of trace levels of transition metal ions in fermentation by iron-pair chromatography. **Analytica Chimica Acta.** 158 : 275-280.
- Scragg, A.H., 1988. Media preparation and sterilization. En: **Biotechnology for engineers**. A. Scragg. (Ed.). Ellis Horwood Limited. Chichester.
- Shan, N.K., Ramamurthy, V. y Kothar, R.M. 1991. Comparative production by submerged and surface fermentation. **Biotechnol. Lett.** 13 (5) : 361-364.

- Shankaranand, V.S., and Lonsane, B.K., 1994. Ability of *Aspergillus niger* to tolerate metal ions and minerals in a solid-state fermentation for the productions of citric acid. **Process. Biochem.** 29 : 29-37.
- Shankaranand, V.S., Ramesh, M.V. and Lonsane B.K., 1992. Idiosyncrasies of solid-state fermentation systems in the biosynthesis of metabolites by some rial and fungal cultures. **Process. Biochem.** 27 : 33-36.
- Silver, S. And Jasper, P. 1977. Manganese transport in microorganisms. En: **Microorganism and minerals.** Microbiology series Vol. 3. Weinber, E.D. (Ed.). Dekker. U.S.A. : 105-146.
- Smith, J.E. 1975. The structure and development of filamentous fungi. En: **The filamentous fungi. Biosynthesis and metabolism** Vol. 1. Smith, J.E. and Berry, D.R. (Ed.). Edward Arnold. Gran Bretaña.
- Socol, C.R. 1996. Aplicaciones agroindustriales de los procesos de fermentación en medio sólido. En: **Fronteras en Biotecnología y Bioingeniería.** Galindo, E. (Ed.) Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería. : 346-358.
- Tomilson, N. and Campbell, J.J.R. 1951. The influence of zinc, iron, copper and manganese on the production of citric acid by *Aspergillus niger*. II Evidence for the essential nature of copper and manganese. **J. Bacteriol.** 61 : 17-25
- Tsay, S.S. and To, K.Y. 1987. Citric acid production using immobilized conidia of *Aspergillus niger* TMB 2022. **Biotechnol. Bioeng.** XXIX : 297-304.
- Tran, C.T. and Mitchell, D.A. 1995. Pineapple waste. A novel substrate for citric acid production by solid state fermentation. **Biotechnology Letters.** 17(10) : 1107-1110.
- Trumpy, B.H. and Millis, N.F. 1963. Nutritional requirements of an *Aspergillus niger* mutant for citric acid production. **J. gen. Microbiol.** 30 : 381-393.
- Vézina, C. and Singh, K. 1976. Transformation of organic compounds by fungal spores. En: **The filamentous fungi.** Vol. 1. Smith, J.E. and Berry, D.R. (Ed.). Edward Arnold. Gran Bretaña. 292-307.
- Voet, D. and Voet, J.G. 1990. Citric acid. En: **Biochemistry.** J. Stiefel. J. Wiley and Sons. (Ed.) Inc. New York. 507-527.
- Wold, W.S.M. and Suzuki, Y. 1976a. The citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: regulation by zinc of growth and acidogenesis. **Can. J. Microbiol.** 22 : 1083-1092.

- Wold, W.S.M. and Suzuki, Y. 1976b. Regulation by zinc and adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate of growth and citric acid accumulation in *Aspergillus niger*. **Can. J. Microbiol.** 22 : 1093-1101.
- Yamada, K. 1977. Bioengineering report: Recent advances in industrial fermentation in Japan. **Biotechnol. Bioeng.** XIX : 1563-1621.