

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**



**Efecto de la relación de nutrientes sobre la producción de
metabolitos por *Aspergillus brasiliensis* en fermentación en
estado sólido**

Tesis

Que para obtener el grado de:

Maestro en biotecnología

Presenta

Christian Jesús Mora Pérez

Director

Dr. Ernesto Favela Torres

Asesores

Dr. Jesús Antonio Córdova López

Dr. Gerardo Gutiérrez Sánchez

México, D.F., 2016

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT en nivel internacional, con la referencia 001465”

México D.F. a 22 de Julio del 2016

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa
aprobó la tesis

**Efecto de la relación de nutrientes sobre la producción de
metabolitos por *Aspergillus brasiliensis* en fermentación en estado sólido**

Presentó

Christian Jesús Mora Pérez

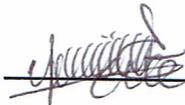
Director: Dr. Ernesto Favela Torres

Asesor: Dr. Jesús Antonio Córdova López

Asesor: Dr. Gerardo Gutiérrez Sánchez

Jurado:

Presidente: Dr. Octavio Loera Corral



Secretario: Dr. Héctor Bernardo Escalona Buendía



Vocal: Dr. Eric Ortega Sánchez



Vocal: Dr. Jesús Antonio Córdova López



AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa por haberme permitido llevar a cabo mi proyecto de maestría.

A CONACYT por haberme otorgado una beca para elaborar mi maestría.

A Ernesto Favela por haberme guiado, compartido sus vivencia conmigo y mostrarme que todo puede lograrse con dedicación y amor por lo que haces.

A mis asesores y sinodales por aceptar participar en el jurado de tesis y por sus importantes comentarios.

A mis compañeros Daniela Nava y Gregorio Juárez por haberme ayudado con ideas y sugerencias para poder elaborar mi proyecto.

A los nómadas (Peusa, Maf, Luisa, Angy, Kenia, Gerardo, Eduardo, Rubén y Víctor) por su confianza y amistad en mi paso por la UAM-I.

DEDICATORIAS

A mis padres Felipe Mora y Flor Pérez.

A mi hermana, a mi hija y a Rosa Corona.

Muchas gracias por apoyarme en esta parte esencial de mi vida los amo.

RESUMEN

Este trabajo tuvo como finalidad determinar el efecto de la relación de nutrientes sobre la producción de metabolitos por *Aspergillus brasiliensis* ATCC9642, utilizando un medio de glucosa con diferentes relaciones de macronutrientes-micronutrientes y agrolita, como soporte inerte.

En la primera etapa de este trabajo se determinó el efecto de la composición del medio de cultivo y la tasa de aireación sobre la producción de metabolitos; para ello, se evaluaron dos medios de cultivo; un medio balanceado y un medio desbalanceado. Se analizaron los parámetros asociados a la tasa de producción de CO₂ por respirometría. Los extractos extracelulares obtenidos de las fermentaciones en estado sólido fueron utilizados para cuantificar la producción de metabolitos y consumo de sustrato por HPLC. Se concluyó que a menor tasa de aireación el consumo de sustrato es menor y la producción de manitol y glicerol aumenta. El análisis del coeficiente respiratorio mostró que el metabolismo de *A. brasiliensis* en cultivos balanceados va dirigido a la producción de polioles y en cultivos desbalanceados a la producción de ácidos orgánicos. De acuerdo a las conclusiones de esta etapa se optó por utilizar un medio de cultivo desbalanceado para estudiar el efecto de la relación de nutrientes en el medio de cultivo sobre la producción de metabolitos.

En la segunda etapa de este trabajo, se estudió el efecto de la relación de nutrientes sobre la producción de metabolitos mediante un diseño experimental factorial. En esta etapa se utilizó un medio de cultivo reportado para estudios de producción de ácidos orgánicos y polioles. Se observó que, la relación de nutrientes que favorece la producción de metabolitos con excepción de glicerol, es una alta concentración de macronutrientes combinada con una baja concentración de micronutrientes (1,-1).

En la última etapa, se evaluó el efecto de la adición de ácido sulfúrico en el medio de cultivo sobre la producción de metabolitos de *A. brasiliensis*. Se encontró que, la adición de 0.4% de

H₂SO₄ favoreció la producción de ácidos orgánicos y polioles; mientras que, a concentraciones de H₂SO₄ superiores (0.6% y 0.8%) disminuyó.

Las distintas condiciones evaluadas en este estudio demostraron tener un efecto sobre el metabolismo de *A. brasiliensis*, favoreciendo la producción de ácidos orgánicos, CO₂ y polioles.

Contenido

1.	Introducción	1
2.	Antecedentes.....	2
2.1	Fermentación en estado sólido	2
2.2	Soportes utilizados en FES.....	2
2.3	Factores ambientales que afectan el crecimiento microbiano y la síntesis de metabolitos en FES.....	3
2.3.1	Actividad de agua	3
2.3.2	Temperatura.....	4
2.3.3	pH	5
2.3.4	Aireación.....	5
2.4	Hongos filamentosos utilizados en FES.....	6
2.5	Crecimiento microbiano balanceado	6
2.6	Metabolismo de carbohidratos por <i>Aspergillus</i>	7
2.7	Mecanismos de regulación del metabolismo	8
2.8	Regulación del metabolismo de carbohidratos	8
2.9	Regulación del metabolismo en el ciclo de Krebs o ciclo de los ácidos tricarboxílicos	10
2.10	Producción de polioles	13
3.	Justificación	15
4.	Hipótesis.....	15
5.	Objetivos	15
5.1	Objetivo general	15
5.2	Objetivos específicos.....	15
6.	Materiales y métodos	16
6.1	Microorganismo.....	16
6.2	Activación y conservación de <i>Aspergillus brasiliensis</i>	16
6.3	Medio de cultivo para la propagación	16
6.4	Medio de cultivo para la FES	16
6.4.1	Efecto de la composición del medio de cultivo y la tasa de aireación sobre la producción de metabolitos.....	17
6.4.2	Efecto de la concentración de nutrientes y ácido sulfúrico sobre la producción de metabolitos.....	17
6.5	Tratamiento del medio de cultivo con H ₂ SO ₄ para la FES.....	18
6.6	Acondicionamiento del soporte para la FES.....	18
6.7	Unidades experimentales.....	19
6.7.1	Efecto de la composición del medio de cultivo y la tasa de aireación sobre la producción de metabolitos.....	19
6.7.2	Efecto de la concentración de nutrientes y ácido sulfúrico sobre la producción de metabolitos.....	19
6.8	Método de análisis para la producción de CO ₂ y consumo de O ₂	19
6.9	Humedad	20
6.10	pH.....	20
6.11	Método de análisis para ácidos orgánicos, polioles y azúcares por HPLC.....	20
6.11	Diseño experimental	21

7. Resultados	22
7.1 Efecto de la composición del medio de cultivo y de la tasa de aireación sobre la producción de metabolitos.....	22
7.1.1 Conclusiones parciales.....	32
7.2 Efecto de la concentración de nutrientes sobre la producción de metabolitos.....	33
7.2.1 Validación de diseño experimental del efecto de la concentración de nutrientes sobre la producción de metabolitos.....	38
7.2.2 Conclusiones parciales.....	43
7.3 Efecto de la concentración de ácido sulfúrico sobre la producción de metabolitos ..	44
7.3.1 Validación de diseño experimental sobre el efecto de la concentración de ácido sulfúrico sobre la producción de metabolitos	53
7.3.2 Conclusiones parciales.....	56
8. Conclusiones.....	56
9. Bibliografía	57
Referencia de patente	62
10. Anexos.....	63

Lista de Ilustraciones

Ilustración 1. Regulaciones metabólicas durante la síntesis de metabolitos.	12
Ilustración 2. Ruta metabólica para producción de polioles en <i>A. niger</i>	14

Lista de Tablas

Tabla 1. Enzimas que participan en la regulación del metabolismo de carbohidratos.....	10
Tabla 2. Composición inicial de los medios cultivo en medios balanceados y desbalanceados (g/L).	17
Tabla 3. Composición inicial de macronutrientes (g/L) en concentraciones altas y bajas...	18
Tabla 4. Composición inicial de micronutrientes (g/L) en concentraciones altas y bajas....	18
Tabla 5. Matriz experimental para el análisis del efecto de nutrientes y ácido sulfúrico sobre la producción de metabolitos.....	21
Tabla 6. Parámetros iniciales de la fermentación para evaluar el efecto del medio de cultivo y la tasa de aireación.	22
Tabla 7. pH y humedad (%) del cultivo de <i>A.brasiliensis</i>	23
Tabla 8. Parámetros asociados a la producción de metabolitos por <i>A.brasiliensis</i>	25

Tabla 9. Modelos de regresión lineal sobre los factores que afectan la producción de ácidos orgánicos y polioles.	42
---	----

Lista de Gráficas

Gráfica 1. Efecto de la composición del medio de cultivo y de la tasa de aireación sobre la producción de CO ₂ y tasa de producción de CO ₂ por <i>A. brasiliensis</i> en medios Diano (D) y Bizukojc (B)..	23
Gráfica 2. Efecto de la composición del medio de cultivo y de la tasa de aireación sobre el coeficiente respiratorio acumulado durante el cultivo de <i>A. brasiliensis</i> en medios Diano (D) y Bizukojc (B)..	26
Gráfica 3. Efecto de la composición del medio de cultivo y de la tasa de aireación sobre el coeficiente respiratorio instantáneo durante el cultivo de <i>A. brasiliensis</i> en medios Diano (D) y Bizukojc (B)..	27
Gráfica 4. Producción de metabolitos a las 145 horas de cultivo de <i>A. brasiliensis</i>	29
Gráfica 5. Cinética de consumo de sustrato de <i>A. brasiliensis</i> hasta las 96 horas.	33
Gráfica 6. Cinética de pH y humedad del cultivo de <i>A. brasiliensis</i> hasta las 96 horas.	34
Gráfica 7. Efecto de la concentración de nutrientes sobre la producción de metabolitos.. 36	
Gráfica 8. Diagramas de Pareto sobre los factores que afectan la producción de ácidos orgánicos y polioles.	39
Gráfica 9. Interacción de los factores principales que afectan la producción de ácidos orgánicos y polioles.	41
Gráfica 10. Cinéticas de consumo de sustrato a 0.4, 0.6 y 0.8% de H ₂ SO ₄ de <i>A. brasiliensis</i> hasta las 96 horas.	44
Gráfica 11. Cinéticas de pH a 0.4, 0.6 y 0.8% de H ₂ SO ₄ de <i>A. brasiliensis</i>	45
Gráfica 12. Cinéticas de humedad a 0.4, 0.6 y 0.8% de <i>A. brasiliensis</i>	46
Gráfica 13. Efecto de la concentración de ácido sulfúrico (columnas) con distintas relaciones de nutrientes sobre la producción de metabolitos (filas)	47
Gráfica 14. Efecto de la concentración de ácido sulfúrico al 0.8% sobre la producción de metabolitos con distintas relaciones de nutrientes	51

Gráfica 15. Gráficas de la prueba de Tukey sobre el efecto de la concentración de H_2SO_4 (%) sobre la producción de metabolitos..... 54

1. Introducción

La fermentación en estado sólido (FES) ha sido utilizada desde la antigüedad para el composteo y la fabricación de alimentos fermentados (Aido, 1982). Comparada con las fermentaciones sumergidas, la FES ha sido poco estudiada, debido a su heterogeneidad y a la complejidad estructural y nutricional de los sustratos sólidos. Debido a lo anterior, en estudios básicos de las fermentaciones sólidas, frecuentemente se recurre al empleo de soportes modelo, los cuales se impregnan con un medio de cultivo químicamente definido, permitiendo evaluar el efecto de las condiciones de cultivo sobre el crecimiento y metabolismo microbiano (Córdova-López, 1994). Desde hace algunos años, la FES ha recobrado un gran interés, debido a su aplicación para la producción de diferentes metabolitos como enzimas, ácidos orgánicos, etanol, biogas, antibióticos, surfactantes, biopesticidas, entre otros (Pandey, 1996; Mitchell y col., 2000) Las características que destacan en la FES, comparadas con las fermentaciones sumergidas son una menor represión catabólica, mayor producción y productividad de enzimas (Romero-Gómez y col., 2000).

El género *Aspergillus* ha sido muy estudiado, debido a su importancia en la producción industrial de enzimas y ácidos orgánicos. Se han realizado numerosos estudios enfocados a las características fisiológicas y bioquímicas de crecimiento de hongos de este género (Meijer, 2011); sin embargo, pocos estudios se han enfocado en el efecto de las condiciones sobre el metabolismo primario del género *Aspergillus* (Diano y col., 2009) y en menor cantidad en FES. Para la realización de este trabajo se seleccionó a *Aspergillus brasiliensis* ATCC 9642 por ser una cepa que ha sido muy estudiada en el laboratorio (PP4-UAMI) y que, como la mayoría de las cepas de *A. niger*, se caracteriza por su capacidad de producción de ácidos orgánicos (Swain y col., 2011) enzimas y proteínas (Pandey, 1992). El soporte modelo que se empleó en este trabajo es la agrolita. El interés de estudiar la relación de nutrientes en el medio de cultivo de *A. brasiliensis* radica en aprovechar las características de la FES en la producción de metabolitos de interés industrial.

2. Antecedentes

El estudio de los procesos de fermentación en medios sólido ha tomado importancia desde finales del siglo pasado, debido al interés de producir productos de importancia industrial. En esta sección se revisarán los principales conceptos relacionados con el desarrollo de esta tesis para dar mayor claridad a la estrategia experimental seleccionada.

2.1 Fermentación en estado sólido

La fermentación en estado sólido (FES) puede definirse como aquella en la que los microorganismos crecen sobre la superficie de un sustrato sólido (Pandey, 1992). El sustrato sólido contiene agua que se encuentra retenida en su matriz porosa; lo que permite que el microorganismo pueda realizar sus funciones vitales. La humedad del sólido dependerá de su capacidad de retención de líquido y no podrá exceder de un límite máximo en el que el agua drene (Córdova-López, 1994). Además de la cantidad de agua en el sistema, existen varios aspectos importantes que deben ser considerados para el desarrollo de cualquier FES. Estos incluyen, la selección del microorganismo apropiado, la selección del sustrato, el soporte, entre otros. Antiguamente, la FES era empleada principalmente para la elaboración de alimentos fermentados, en la maduración de quesos y en el composteo (Moo-Young, 1983). Actualmente, la fermentación en estado sólido es utilizada para la producción de ácidos orgánicos (Max, 2010), enzimas (Diano y col., 2009) y probióticos (Zhao, 2008); ya que ofrece numerosas ventajas para la producción de metabolitos de importancia biotecnológica, como por ejemplo, menores requerimientos de energía, pocos efluentes contaminantes (Vandenberghe y col., 2000), productos más concentrados y la aireación es facilitada por los espacios interpartícula del soporte (Rodrigues y col., 2013).

2.2 Soportes utilizados en FES

Los soportes utilizados en FES han sido clasificados en dos categorías dependiendo de su naturaleza química. El primero y más usado, involucra sustratos naturales. El segundo (sistema que es menos usado), incluye a los soportes inertes (Ooijkaas y col., 2000).

Los sustratos naturales usados en FES sirven simultáneamente como soporte y como fuente de nutrientes. Esta propiedad puede representar una desventaja, ya que durante el crecimiento del microorganismo, el sustrato sólido es degradado, dando como resultado que, la geometría y características del medio se modifiquen y afecten aspectos relacionados con la transferencia de masa y calor en el medio de cultivo (Barrios-González & Mejía., 1996). Los soportes inertes pueden ser de origen sintético o de origen natural; los cuales, pueden ser impregnados con medios líquidos, sirviendo como reservorio de nutrientes y como punto de anclaje para los microorganismo. Estos materiales incluyen cañamo, espuma de poliuretano, bagazo de caña, vermiculita (Ooijkaas y col., 2000) y agrolita (Martínez-Ruiz, 2005). Los soportes inertes presentan varias ventajas sobre los sustratos naturales, son: 1) Se puede diseñar un medio de producción adecuado, 2) menor dificultad para recuperar los productos y 3) Los balances de masa se realizan con mayor facilidad debido a que las concentraciones de todos los nutrientes del medio de producción son conocidas y pueden ser cuantificadas (Ooijkaas y col., 2000). Para la utilización de soportes inertes impregnados con medios definidos en FES, deben considerarse varios aspectos como la disponibilidad del soporte, impacto ambiental de los residuos sólidos generados, costos de proceso y los valores de producción a obtener (Ooijkaas y col., 2000).

2.3 Factores ambientales que afectan el crecimiento microbiano y la síntesis de metabolitos en FES

Los factores ambientales que pueden afectar influenciar el crecimiento microbiano y la producción de metabolitos son: la actividad de agua, la temperatura, el pH, la aireación, la concentración de nutrientes, entre otros (Max y col., 2010).

2.3.1 Actividad de agua

Un concepto que brinda información sobre el agua disponible para las funciones metabólicas de los microorganismos es la actividad de agua (A_w), que se refiere al cambio de estado de las moléculas de agua en presencia del tipo y cantidad de solutos; y del grado de interacción del agua con materiales sólidos (Córdova-López, 1994). La A_w puede definirse

como la humedad relativa de la atmósfera gaseosa que se encuentra en equilibrio con la de una solución (Pandey, 1992); o bien, como la relación de presión de vapor de agua en una solución entre la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura (Pirt, 1975). La actividad de agua es un importante parámetro que controla el crecimiento microbiano. Valores de A_w entre 0.95-0.98 pueden ser considerados típicos para los sustratos sólidos de la FES. Estos valores son ideales para el crecimiento de muchos hongos, especialmente de hongos filamentosos, los cuales tienen un crecimiento óptimo a A_w de 0.96-0.98 y aún pueden crecer a A_w de 0.90.

2.3.2 Temperatura

La temperatura es otro factor muy importante para la FES. Influye en la actividad metabólica de los microorganismos y por lo tanto, esto se relaciona con la cantidad de metabolitos producidos. Se ha reportado que, la producción de ácido cítrico se afecta por la temperatura, teniendo una mayor producción a 25°C (Kitos y col., 1953), aunque hay estudios más recientes que también han mostrado un incremento en la producción de ácidos orgánicos, en especial del ácido oxálico, a temperaturas de 20°C (Wang y col., 1995). Durante la FES, la temperatura del sistema aumenta debido a la generación y acumulación de calor metabólico. El incremento en la temperatura es directamente proporcional a la profundidad del lecho y a la actividad metabólica del microorganismo involucrado (Gutiérrez-Rojas y col., 1996).

Los problemas de transferencia de calor en la FES inducen gradientes de temperatura que pueden causar (Gutiérrez-Rojas y col., 1996):

- Desarrollo microbiano tardío.
- Desviaciones metabólicas indeseables.
- Deshidratación del medio.

Se han investigado diferentes métodos para eliminar el exceso de calor producido. Entre los métodos convencionales, los mecanismos por convección son más eficientes que los conductivos, pero requieren grandes velocidades de aireación y esto puede provocar una

deshidratación indeseable del medio. Otros métodos menos convencionales, es el uso de enfriamiento por evaporación (Juárez-Cárdenas, 2015).

2.3.3 pH

El pH en un cultivo puede influir en el crecimiento y metabolismo microbiano, y puede cambiar en respuesta a las actividades metabólicas. Esto puede ser causado por la secreción de ácidos orgánicos, tales como cítrico, acético o láctico, lo que hace que el pH disminuya. Por otro lado, la hidrólisis de proteínas generalmente conduce a un incremento del pH del medio de cultivo (Juárez-Cárdenas, 2015).

Medir y controlar esta variable en la FES es muy difícil; sobre todo cuando los cultivos son estáticos. Cuando es necesario mantener el pH, se hace uso de soluciones buffer, sin embargo, esto es insuficiente cuando el proceso se lleva a cabo a una mayor escala. Otra estrategia para controlar los cambios de pH consiste en la adición de una mezcla de fuentes de nitrógeno en el medio de cultivo (Raimbault, 1998). La variación del pH durante un cultivo, depende en gran medida del microorganismo. Con *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* y *Rhizopus sp.*, el pH puede alcanzar rápidamente valores por debajo de 3. Para otros tipos de hongos como *Trichoderma*, *Sporotrichum*, *Pleurotus sp.* el pH usualmente es más estable entre 4 y 5 (Juárez-Cárdenas, 2015). La naturaleza del sustrato tiene también una fuerte influencia sobre el pH de un cultivo (Raimbault, 1998).

2.3.4 Aireación

La aireación del medio sólido húmedo es uno de los factores críticos que gobierna el crecimiento microbiano, su metabolismo y la productividad del proceso (Rodrigues y col., 2013), ya que no sólo suministra oxígeno, sino que también remueve el calor metabólico, gases y productos volátiles formados durante la fermentación. La aireación puede usarse para controlar la humedad en el sistema, e influenciar la producción de metabolitos microbianos, en particular de ácidos orgánicos y polioles. Diano y col. (2006) reportaron que la producción de polioles incrementó, cuando el oxígeno disuelto de los cultivos disminuyó en medio líquido.

2.4 Hongos filamentosos utilizados en FES

Los hongos filamentosos son el grupo de microorganismos más importante usado en FES debido a sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y enzimáticas (Raimbault, 1998). Esto se debe a la forma filamentosa en la cual crecen (hifas), su tolerancia a bajas actividades de agua (A_w) y sus resistencia a elevadas presiones osmóticas. Estas condiciones favorecen el crecimiento de los hongos y la bioconversión de sustratos sólidos en metabolitos de interés biotecnológico (Raimbault, 1998). Más aun, los hongos pueden secretar enzimas como amilasas, celulasas, proteasas y lipasas para degradar las macromoléculas de los sustratos sólidos (Mitchell, 2000) y que pueden ser usadas a nivel industrial para la elaboración de distintos bioproductos (Pandey, 1996).

Para este estudio se utilizó el hongo filamentoso *Aspergillus brasiliensis*, perteneciente a la división *Ascomycota*, clase *Eutotiomyce*, orden *Eurotiales*, familia *Trichocomaceae* y pertenece al igual que *Aspergillus niger* a la sección *Nigri* (Canada, 2014). A pesar de que no hay estudios sobre el efecto del pH y la A_w , sobre el crecimiento de este hongo, se sabe que crece a partir de 15°C y su temperatura óptima de crecimiento es alrededor de 35° C (Meijer, 2011).

2.5 Crecimiento microbiano balanceado

Los requisitos para lograr un crecimiento microbiano balanceado (incremento en la biomasa con velocidades constantes de consumo de nutrientes) en un cultivo son (Pirt, 1975): inóculo viable, fuente de energía, nutrientes necesarios, no contener inhibidores y condiciones fisicoquímicas adecuadas. Además, para prolongar la fase de crecimiento exponencial, se deben mantener las condiciones ambientales y la composición de la biomasa constantes (Córdova-López, 1994).

Se sabe que el crecimiento balanceado continúa, hasta que algún nutriente se agota o un inhibidor aparece. Por otra parte, si se garantiza que el oxígeno no limite al crecimiento fúngico, el crecimiento seguirá las siguientes fases en medios balanceados:

- 1) Fase de transición: Agotamiento de fosfato y magnesio, el metafosfato endógeno se utiliza y el crecimiento continúa con la velocidad lineal hasta el agotamiento de la fuente de C o la fuente de N.
- 2) Fase de almacenamiento: Al agotarse la fuente de nitrógeno, el crecimiento se detiene pero la síntesis de lípidos y carbohidratos continúa.
- 3) Fase terminal: Al consumirse toda la fuente de carbono y de energía en un medio agotado en fuente de nitrógeno, se entra a una fase de mantenimiento durante la cual, los lípidos son metabolizados y en su eventual agotamiento, empieza la autólisis.

Durante el crecimiento microbiano, normalmente el metabolismo se regula para producir metabolitos esenciales como aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos, que estrictamente son necesarios para la supervivencia y reproducción del microorganismo (Córdova-López, 1994).

Sin embargo, en un crecimiento desbalanceado o en condiciones ambientales lejanas a las óptimas, pueden ocurrir desviaciones en las rutas metabólicas e iniciarse la biosíntesis de metabolitos no esenciales; por ejemplo, la acumulación de ácidos orgánicos y polioles se debe al desbalanceo del medio (concentraciones elevadas de azúcares, distintas concentraciones de micronutrientes, bajos pH, tasa de aireación, etc) en donde se encuentra el microorganismo (Gutiérrez-Rojas, 1995; Vandenberghe y col., 2000; Diano y col., 2006; Diano y col., 2009; Rodrigues, y col., 2013).

2.6 Metabolismo de carbohidratos por *Aspergillus*

El metabolismo de hongos filamentosos como *Aspergillus brasiliensis* en FES presenta características similares al de cultivo sumergido. El metabolismo de carbohidratos ha sido orientado hacia tres áreas en el género *Aspergillus* (Córdova-López, 1994):

1. El papel que desempeñan los polioles en el metabolismo del hongo.
2. Regulación de la biosíntesis de glucosa oxidasa.

3. Estructura y función de genes glicolíticos que codifican para el control de enzimas en glicólisis y su uso potencial para influenciar el metabolismo primario.

En el presente trabajo, se abordará el primer punto, orientándolo hacia el efecto que juega la relación de nutrientes del medio de cultivo sobre la acumulación de polioles de *Aspergillus brasiliensis*.

2.7 Mecanismos de regulación del metabolismo

Las rutas del metabolismo de la glucosa proporcionan, en la dirección catabólica, la energía esencial para oponerse a las fuerzas de la entropía y, en la dirección anabólica, precursores biosintéticos y una forma de almacenamiento de energía metabólica. Estas reacciones son tan importantes para la supervivencia celular que han surgido mecanismos reguladores muy complejos para asegurar que los metabolitos de cada ruta van en dirección correcta y a la velocidad adecuada para satisfacer las condiciones que envuelven a la célula. Mediante diversos mecanismos que actúan a escalas de tiempo diferentes, se producen los ajustes adecuados en la velocidad del flujo metabólico a través de toda la ruta cuando se producen cambios en las condiciones exteriores de la célula como una alta concentración de glucosa (Cox, 2009).

El término regulación metabólica se refiere al proceso que sirve para mantener algún parámetro celular (concentración de un metabolito por ejemplo) constante a lo largo del tiempo, aún cuando cambie el flujo de metabolitos a través de cambios en la ruta. Por otro lado, el control metabólico se refiere a un proceso que conduce a una variación en el rendimiento de una vía metabólica durante el tiempo en respuesta a alguna señal exterior o cambio en las condiciones (Cox, 2009).

2.8 Regulación del metabolismo de carbohidratos

El primer evento para que el metabolismo tenga lugar, es el transporte de nutrientes a través de una membrana que separa la célula de su entorno. Debido a su naturaleza lipídica, las membranas son altamente selectivas al paso de compuestos polares. Los compuestos

polares sólo pueden atravesar la membrana con ayuda de proteínas transportadoras específicas.

Existen dos tipos de transporte de membrana (Voet, 2007); transporte no mediado, el cual tiene lugar por difusión simple; y el transporte mediado, que requiere la participación de proteínas acarreadoras específicas que son susceptibles a saturarse, ser inhibidas competitivamente y a inactivarse por compuestos químicos.

El transporte mediado puede tener dos clasificaciones acorde a la termodinámica del sistema: a) transporte pasivo, también llamado difusión facilitada, en donde las moléculas fluyen desde una alta a una baja concentración hasta equilibrar su gradiente de concentraciones; b) transporte activo, en donde las moléculas son transportadas desde una baja a una alta concentración; es decir, en contra de gradiente de concentración. Este último proceso requiere energía para ser llevado a cabo (Cox, 2009). El transporte de la glucosa a través de la membrana está restringido a dos sistemas de transporte controlados por represión e inactivación por glucosa (Brandao, 1990).

La glucólisis es una ruta metabólica regulada por energía, la regulación del metabolismo de carbohidratos es vital para mantener constantes los niveles de ATP, aunque no es obligado que sus concentraciones sean altas, sino que esté balanceada su velocidad de reciclamiento; es decir, el ATP debe formarse tan pronto como se utiliza. La manera más efectiva de lograrlo es controlando los niveles relativos de glucosa libre y de la que está almacenada. Si en determinado momento la célula necesita energía, entonces la glucólisis debe entrar en operación y degradar glucógeno, liberando glucosa 1-fosfato. Si por otro lado, no necesita energía, la vía glucolítica debe cerrarse y almacenar glucosa para utilizarse después; esto debe aumentar la síntesis de glucógeno. Todo el metabolismo logra realizar estas funciones debido a las enzimas que participan para llevarlas a cabo. Las velocidades metabólicas también están reguladas a nivel genético mediante el control de la velocidad de síntesis de alguna enzima (Boyer, 2000). Las moléculas efectoras más importantes en la célula son ATP, ADP y AMP. Sus concentraciones relativas en cualquier momento son un excelente indicador del nivel de energía en la célula. Una abundancia de AMP y ADP es un indicador de un bajo nivel de energía y la señal para que se movilicen las moléculas y se

produzca energía (ATP). Los sustratos y productos de las reacciones y también funcionan como efectores de las enzimas (Boyer, 2000). A continuación se muestran las enzimas reguladoras en el metabolismo de carbohidratos.

Tabla 1. Enzimas que participan en la regulación del metabolismo de carbohidratos.

Enzimas reguladoras en el metabolismo de carbohidratos (glucólisis)			
Nombre de la enzima	Efecto positivo	Efecto negativo	Comentarios
Glucógeno fosforilasa	AMP	G6P	Su concentración está regulada por hormonas
Glucógeno sintasa	G6P	-	Su concentración está regulada por hormonas
Hexoquinasa	-	G6P	Tiene retroinhibición
fosfofructoquinasa	AMP, FBP	ATP, citrato	Principal punto de control de la glucólisis
fructosa-1,6 bifosfatasa	-	AMP, FBP	Paso regulador en la síntesis de glucosa
Piruvato quinasa	-	ATP, acetil CoA	También está regulada por las formas isoenzímicas
Piruvato descarboxilasa	acetil CoA	-	Ayuda a mantener los niveles de glucosa y de oxalacetato

2.9 Regulación del metabolismo en el ciclo de Krebs o ciclo de los ácidos tricarbóxicos

Los hongos filamentosos son ampliamente usados en la producción de metabolitos industriales como el ácido cítrico. Los mecanismos bioquímicos que determinan la acumulación de metabolitos en el género *Aspergillus* han sido motivo de estudios durante más de 50 años, debido a que las materias primas usadas como sustrato son baratas, tienen altos rendimientos y su fácil control de proceso. Se sabe que la acumulación de ácidos orgánicos como el ácido cítrico, involucra la participación del ciclo de Krebs o ciclo de los ácidos tricarbóxicos (CAT) en distintos puntos de regulación durante la acumulación de ácidos orgánicos. Las enzimas como la aconitasa, la α -cetoglutarato deshidrogenasa (CGDH) y la isocitrato deshidrogenasa (ICDH) son las encargadas de regular el ciclo de Krebs. La CGDH y la ICDH tienen en común que catalizan las reacciones con energías libres negativas;

es decir, que las reacciones son favorables termodinámicamente (Voet, 2007). La aconitasa es la enzima que cataliza la reacción entre citrato, cis-aconitato y el isocitrato; los argumentos que fundamentan su papel regulador en la acumulación de citrato estriban en estudios *in vitro*, donde la acumulación de citrato disminuye en presencia de fierro, el cual es un componente estructural y activador de la aconitasa. Además, el cobre y el peróxido de hidrógeno que inhiben la aconitasa *in vitro*, actúan como estimuladores de la producción de ácido cítrico (Kubicek, 1985). La CGDH es un complejo multienzimático que cataliza la reducción de α -cetoglutarato a succinil-CoA. Es responsable de la acumulación de ácido cítrico por ser altamente regulado y por ser considerado como el sitio de control en el flujo de intermediarios del ciclo de Krebs (Voet, 2007). Por otra parte la ICDH, es la enzima que media la reacción entre el isocitrato y el α -cetoglutarato y algunos estudios *in vitro* han mostrado que es inhibida por concentraciones fisiológicas de citrato, en ausencia de iones Mn^{2+} . El manganeso es un elemento cuya presencia tiene un efecto negativo en la acumulación de citrato en *Aspergillus niger*, no sólo por ser cofactor de la ICDH (Legisa y col., 1989) sino además, por actuar sobre los transportadores de membrana e influenciar la composición de la membrana, causando la secreción de ácido cítrico en micelios que crecen deficientes en este catión (Meixener, 1985). Algunos estudios han mostrado que la ICDH es extremadamente sensible a pequeñas disminuciones de pH (en pH ácido), durante la acumulación de ácido cítrico ocurren decrementos de pH miceliar en *A. niger*. Además, el glicerol inhibe la ICDH y es considerado como el iniciador de la acumulación de citrato (Legisa y col., 1989). Por otra parte, se han realizado estudios donde se han mostrado evidencias de un cambio en el catabolismo de carbohidratos; de una ruta HMP predominante en las primeras etapas de crecimiento de *Aspergillus niger*, a una ruta glucolítica durante la producción de citrato (Legisa y col., 1988). El citrato al inhibir a la 6 fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH), reduce el flujo de carbono a través de la vía HMP y cesa la síntesis de glicerol. Cuando el glicerol desaparece, existe suficiente citrato dentro de las células para mantener bloqueada a la ICDH dependiente de $NADP^+$. Para la acumulación rápida de citrato se requiere de un flujo glucolítico desinhibido, esta ruta depende de la actividad de la 6 fosfofructoquinasa (6PFK) que es considerada como la

enzima clave, por ser altamente regulada (Cox, 2009). La siguiente figura muestra los principales puntos reguladores en la producción de metabolitos de *Aspergillus niger* (Córdova-López, 1994).

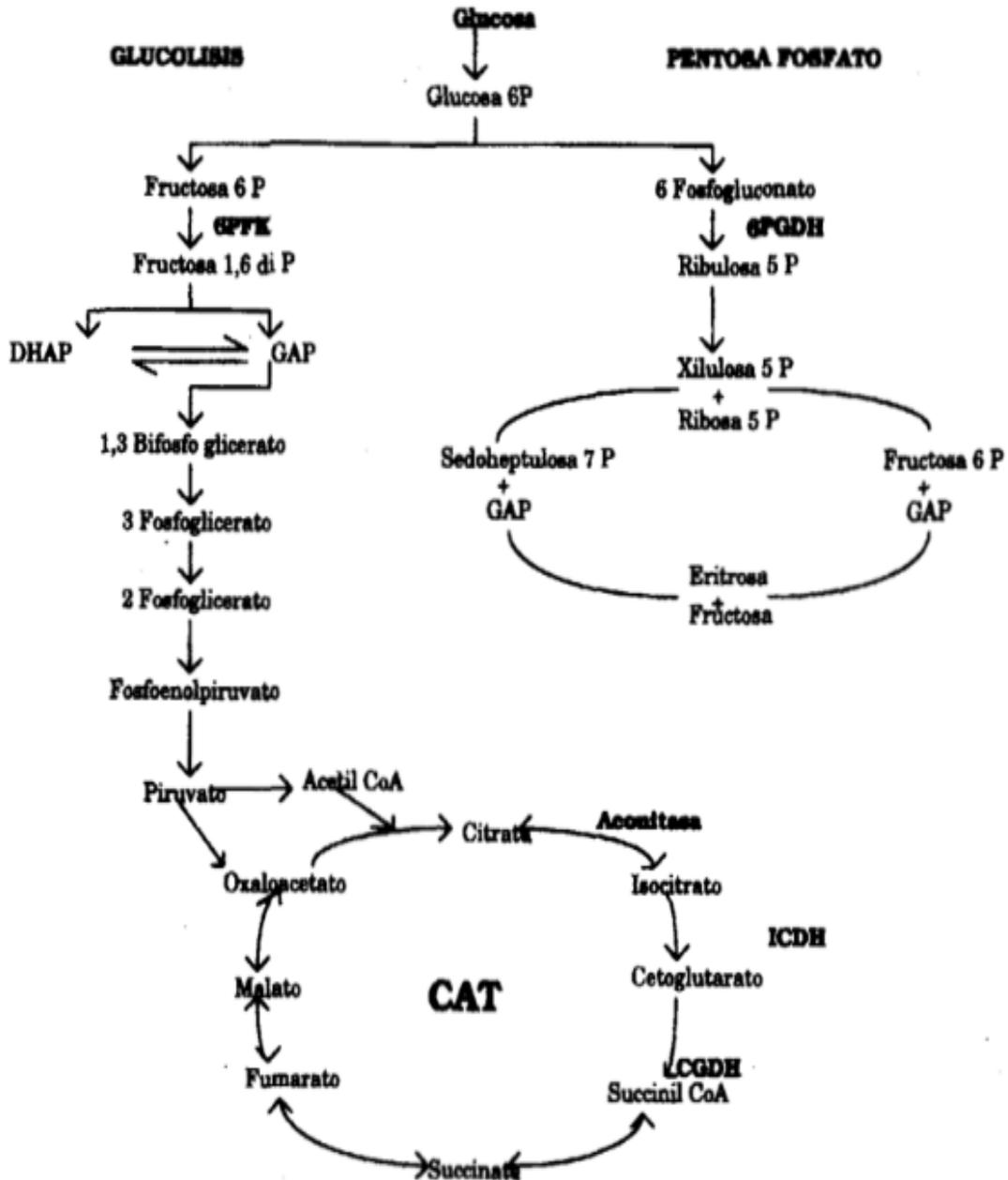


Ilustración 1. Regulaciones metabólicas durante la síntesis de metabolitos. Abreviaturas: 6PFK, (fosfofructoquinasa); 6PGDH, (fosfogluconato deshidrogenasa); GAP, (gliceraldehido 3 fosfato); DHAP, (dihidroxiacetona fosfato); ICDH, (isocitrato deshidrogenasa); CGDH, (α - cetoglutarato deshidrogenasa). La fructosa 6 fosfato de la vía de las pentosas fosfato (HMP) puede ser isomerizada a glucosa 6 fosfato y utilizarse otra vez en el inicio de la misma ruta o irse a la glucólisis (Córdova-López, 1994).

2.10 Producción de polioles

En la industria, el cultivo de hongos filamentosos en cultivos sumergidos representa un problema por el control del aumento de las hifas en el medio, lo que provoca un incremento en la viscosidad y problemas de transferencia de masa, especialmente de la transferencia de oxígeno. Una baja transferencia de oxígeno en el cultivo, causa una alta producción de polioles. Algunos ejemplos de polioles son manitol, glicerol, arabitol, xilitol y dulcitol (Diano y col., 2006).

Los mecanismos de regulación para la biosíntesis y catabolismo de polioles pueden ser diferentes de una cepa de *Aspergillus* sp. a otra. Los polioles tienen varias funciones en el crecimiento de los hongos filamentosos. Sirven como fuente de carbohidratos de reserva, moléculas osmorreguladoras y de translocación de componentes (Diano y col., 2006). Los polioles son metabolizados en las primeras fases del cultivo. Se ha reportado que, son sintetizados primero los polioles con cadenas de 6 carbonos, posteriormente con 5 y por último con 4 (Dijkema y col, 1985). Algunos estudios muestran que, cuando el potencial osmótico disminuye como consecuencia del consumo de sustrato, los polioles almacenados son utilizados como fuente de carbono (Diano y col, 2006). Algunos otros estudios han mostrado que el manitol tiene un efecto en la formación de los conidios, protegiéndolos de altas temperaturas, estrés oxidativo y congelamiento (Ruijter y col., 2003). En *A. nidulans* y *A. niger*, el glicerol y eritrol han sido observados como moléculas que juegan el principal papel osmorregulador (Gutiérrez-Rojas, 1995). En *A. nidulans*, la glicerol quinasa y glicerol-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de FAD (mitocondrial) participan en el catabolismo del glicerol. Los niveles de ambas enzimas son controlados por represión catabólica e inducción, convirtiendo la dihidroxiacetona y el gliceraldehído en glicerol. El gliceraldehído puede ser reducido por la enzima glicerol deshidrogenasa dependiente del NADP⁺ o por alcohol deshidrogenasa (Hondmann y col., 1991).

Cuando el crecimiento se detiene y aún el potencial osmótico externo es elevado, el glicerol desaparece y se sintetizan compuestos polihidroxilados superiores, ya que, estos son menos permeables que el glicerol y son más fáciles de retener, aún cuando no son capaces de sustituir completamente al glicerol en términos de osmorregulación (Bloomberg, 1992).

A continuación se muestra la ruta metabólica de los principales mecanismos de producción de polioles.

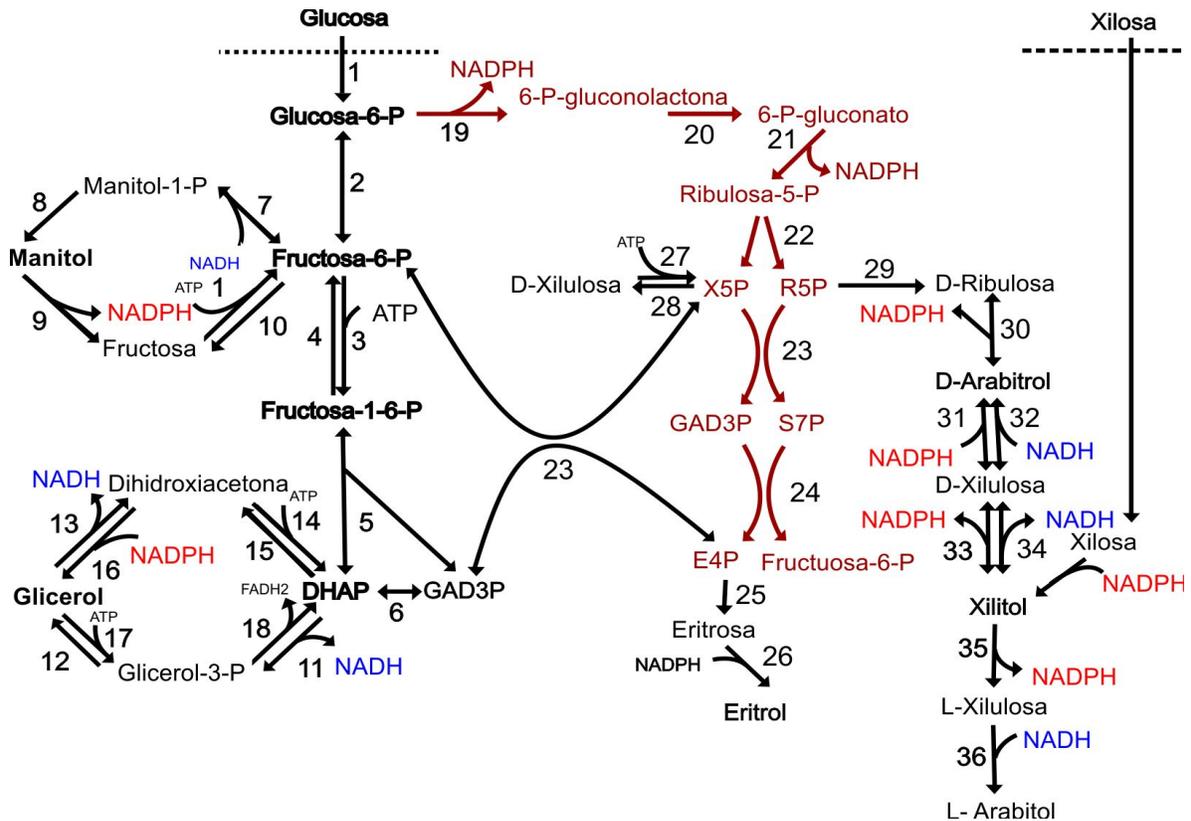


Ilustración 2. Ruta metabólica para producción de polioles en *A. niger*. 1, hexoquinasa; 2, glucosa fosfato isomerasa; 3, 6-fosfofructoquinasa; 4, hexosa bifosfatasa; 5, fructosa bifosfato aldolasa; 6, triosa fosfato isomerasa; 7, manitol-1-fosfato deshidrogenasa; 8, manitol-1-fosfato fosfatasa; 9, NADP-dependiente manitol deshidrogenasa; 10, fructosa-6-fosfato fosfatasa; 11, NAD-dependiente glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (o DHAP reductasa); 12, glicerol-3-fosfato fosfatasa; 13, NAD-dependiente glicerol deshidrogenasa; 14, DHA quinasa; 15, DHAP fosfatasa; 16, NADP dependiente glicerol deshidrogenasa (o NADPH-dependiente DHA); 17, glicerol quinasa; 18, FAD-dependiente glicerol-3-fosfato deshidrogenasa; 19, glucosa- 6-fosfato deshidrogenasa; 20, lactasa; 21, 6-fosfogluconato deshidrogenasa; 22, fosfoisomerasa; 23, transcetolasa; 24, transaldolasa; 25, eritrosa-4-fosfato fosfatasa; 26, eritrosa reductasa; 27, D-xilulosa quinasa; 28, D-xilulosa 5-fosfato fosfatasa; 29, D-ribulosa 5-fosfato fosfatasa; 30, NADP-dependiente D-ribulosa reductasa; 31, NADP-dependiente D-xilulosa reductasa; 32, NAD-dependiente D-xilulosa reductasa; 33, NADP dependiente xilitol deshidrogenasa; 34, NAD-dependiente xilitol deshidrogenasa; 35, NADP-dependiente L-xilulosa reductasa; 36, NAD-dependiente L-arabitrol deshidrogenasa; 37, D-xilosa reductasa (Diano y col., 2006).

El posible papel que tienen los polioles en la translocación de compuestos, aún es incierto, por lo cual es interesante considerar su participación en los procesos fúngicos, ya que juegan un papel importante en la regulación metabólica (Diano y col., 2006).

3. Justificación

La producción de metabolitos por *Aspergillus* a nivel industrial se realiza por cultivo líquido. Entre las variables más relevantes relacionadas con la producción de metabolitos se pueden citar: la actividad de agua, la temperatura, el pH, la aireación, la concentración de nutrientes, entre otros. Sin embargo, se ha demostrado que los procesos de FES presentan ciertas ventajas en comparación con el cultivo líquido. En particular, estos procesos se pueden llevar a cabo en medios con baja actividad de agua, con elevada concentración de nutrientes sin presentar efectos negativos importantes de inhibición por sustrato y represión catabólica; por ello, es necesario un estudio que brinde información descriptiva sobre el efecto de la relación de nutrientes y algunas condiciones de cultivo sobre la producción de ácidos orgánicos y polioles.

4. Hipótesis

El cambio en la relación de nutrientes en el medio de cultivo tendrá un efecto sobre la producción de metabolitos de *Aspergillus brasiliensis* en FES.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Determinar el efecto de la relación de nutrientes sobre la producción de metabolitos durante el crecimiento de *Aspergillus brasiliensis* en cultivo en estado sólido.

5.2 Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de la composición del medio de cultivo y la tasa de aireación sobre la producción de ácidos orgánicos y polioles.
2. Determinar el efecto de la concentración de nutrientes sobre la producción de ácidos orgánicos y polioles.
3. Determinar el efecto de la adición de ácido sulfúrico en el medio de cultivo sobre la producción de ácidos orgánicos y polioles.

6. Materiales y métodos

6.1 Microorganismo

En este estudio se usó la cepa *Aspergillus brasiliensis* ATCC 9642, previamente conocida como *Aspergillus niger* ATCC 9642 (Canada, 2014). La cepa forma parte del cepario de la planta piloto de fermentación en medio sólido de la Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Iztapalapa, donde es conservada en glicerol al 20% (v/v) a -20°C y liofilizada.

6.2 Activación y conservación de *Aspergillus brasiliensis*

A partir de un criotubo, se inocularon tres matraces Erlenmeyer de 250 mL con 30 mL de medio de “YPDA” con la siguiente composición (en g/L): Glucosa, 20, peptona de caseína, 5, extracto de levadura 5 y agar 10.

El cultivo se incubó durante siete días a 30°C. Las esporas producidas se resuspendieron con 30 mL de Tween 80 al 0.05%. (v/v). Una parte de la suspensión obtenida se vertió en tres nuevos criotubos, para la conservación de la cepa; y otra parte de la suspensión se utilizó para la propagación del inóculo.

6.3 Medio de cultivo para la propagación

Para la propagación de la cepa y producción de esporas se usó el medio YPDA. La cepa se propagó primero en tubos inclinados con 20 mL de medio YPDA, incubando a 30°C durante siete días; posteriormente, se adicionaron 5 mL de Tween 80 al 0.05% (v/v) para resuspender las esporas. Se usaron 0.5 mL de suspensión de esporas por matraz, para inocular 3 matraces Erlenmeyer de 125 mL con 30 mL de medio YPDA. Los matraces se incubaron a 30°C por siete días. Las esporas producidas, se resuspendieron en 30 mL de Tween 80 al 0.05% y se usaron como inóculo para los estudios de FES.

6.4 Medio de cultivo para la FES

Es importante contar con un medio de cultivo que contenga los nutrientes necesarios para el crecimiento y estudios del metabolismo de *Aspergillus brasiliensis*. En esta sección se describirán los medios de cultivo utilizados por subcapítulo. A continuación se muestran los medios utilizados en los subcapítulos 7.1, 7.2 y 7.3 de la sección de resultados.

6.4.1 Efecto de la composición del medio de cultivo y la tasa de aireación sobre la producción de metabolitos

Los medios de cultivo utilizados para la fermentación en el subcapítulo 7.1, fueron los reportados por Bizukojc y col. (2004) y por Diano y col. (2006). La composición de los medios de cultivo se detalla en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición inicial de los medios de cultivo (g/L).

Componentes	Medio Diano*	Medio Bizukojc*
Glucosa	91	100
NH ₄ Cl	12	
(NH ₄) ₂ SO ₄		2
KH ₂ PO ₄	3	0.15
CaCl ₂ ·H ₂ O	0.25	
NaCl		1
MnCl ₂ ·2H ₂ O	0.007	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1	0.15
ZnSO ₄	0.0143	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.0138	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0025	
pH inicial	3	2.5

*La composición de estos medios corresponde a lo reportado por Diano y col.(2006) y Bizukojc y col. (2004)

6.4.2 Efecto de la concentración de nutrientes y ácido sulfúrico sobre la producción de metabolitos

El medio de cultivo utilizado para la fermentación en los subcapítulos 7.2 y 7.3 es el reportado por Sánchez-Soto (2001) a distintas concentraciones de nutrientes. Las concentraciones codificadas como "1" y "-1" se refieren a la concentración alta y baja, de nitrógeno y magnesio para la solución de macronutrientes y en la solución de micronutrientes para todos sus componentes, la composición del medio de cultivo modificado se detalla en la Tabla 3 y en la Tabla 4.

Tabla 3. Composición inicial de macronutrientes (g/L) en concentraciones altas y bajas.

Nutriente	1	-1
Glucosa	200	200
NaNO ₃	25	8
K ₂ HPO ₄	5	5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.384	0.184
Sol. Micronutrientes	600 µL	600 µL

Tabla 4. Composición inicial de la solución de micronutrientes (g/L) en concentraciones altas y bajas.

Nutriente	1	-1
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.23	0.075
ZnSO ₄	0.246	0.08
MnSO ₄ .H ₂ O	0.12	0.04
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.15	0.05

6.5 Tratamiento del medio de cultivo con H₂SO₄ para la FES

El tratamiento consistió en disolver los macronutrientes y micronutrientes en soluciones de H₂SO₄ con concentraciones de 0.4, 0.6 y 0.8 (% p/v) para cada relación de nutrientes. Estos medios no fueron esterilizados para evitar la generación de compuestos inhibidores del crecimiento como los reportados por Modig y col (2002) quienes describen el efecto inhibitorio de los furanos sobre algunas enzimas esenciales del metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae*. Este tratamiento sólo fue aplicado en el subcapítulo 7.3 de la sección de resultados.

6.6 Acondicionamiento del soporte para la FES

El soporte empleado fue agrolita con un tamaño de partícula entre 0.85 y 1.0 mm (tamices 16 y 20). La agrolita fue lavada dos veces con agua destilada y una vez con agua caliente; posteriormente, se escurrió y se deshidrató a 60°C por 48 h, hasta tener una humedad menor al 1% (p/p), posteriormente se guardó en bolsas hasta el uso del soporte.

6.7 Unidades experimentales

Al igual que los medios de cultivo, se utilizaron distintas unidades experimentales las cuales se mencionan a continuación.

6.7.1 Efecto de la composición del medio de cultivo y la tasa de aireación sobre la producción de metabolitos

Como unidades experimentales para los estudios de FES en el subcapítulo 7.1, se usaron matraces Erlenmeyer de 250 mL. En cada matraz se adicionaron 6 g de agrolita seca y 14 mL de medio de cultivo inoculado, usando un tamaño de inóculo de 1×10^7 esporas por gramo de agrolita seca. Los matraces fueron conectados individualmente a un sistema de análisis de gases y se incubaron a 30°C hasta por un periodo de 145 horas.

6.7.2 Efecto de la concentración de nutrientes y ácido sulfúrico sobre la producción de metabolitos

Como unidades experimentales para los estudios de FES en el subcapítulo 7.2 y 7.3, se usaron frascos ámbar de 30 mL. En cada frasco se adicionó 1 g de agrolita seca y 2.33 mL de medio de cultivo inoculado, usando un tamaño de inóculo de 1×10^7 esporas por gramo de agrolita seca. Los frascos se incubaron a 30°C hasta por un periodo de 96 horas.

6.8 Método de análisis para la producción de CO₂ y consumo de O₂

Para estimar indirectamente los parámetros asociados al crecimiento, se cuantificó el flujo de aire y las concentraciones volumétricas de oxígeno y dióxido de carbono en la corriente gaseosa a la entrada y salida de las unidades experimentales. A la salida de cada unidad experimental, la corriente gaseosa húmeda se conectó a un sistema de separación de condensados y deshidratación de aire con sílica. La corriente de gas deshidratada se analizó en un sistema respirométrico que permite el monitoreo en línea de las concentraciones de O₂, CO₂ y flujo de aire. El sistema respirométrico consta de 10 válvulas, un medidor de flujo, un detector de O₂ y un detector de CO₂. El medidor y los detectores están conectados a un Datalogger el cual captura, transmite, traduce los datos de las variables medidas y transfiere los datos al programa LabView para que sean procesados y almacenados en una hoja Excel (Patente 336733, IMPI).

6.9 Humedad

La humedad se midió por gravimetría en una termobalanza (OHAUS MB 45) a 105°C. Los resultados se expresaron en porcentaje en base húmeda.

6.10 pH

Se determinó el pH durante cada toma de muestra de la fermentación; para esto, se homogeneizó la materia húmeda, se suspendió 1 g de materia húmeda en 10 mL de agua destilada, se agitó en un vórtex por 30 segundos, y al sobrenadante se le determinó el pH con un potenciómetro Conductronic pH120.

6.11 Método de análisis para ácidos orgánicos, polioles y azúcares por HPLC

Para la cuantificación de azúcares y metabolitos extracelulares, se utilizó un HPLC marca SHIMADZU, por un método isocrático usando una columna Aminex HPX-87H a una temperatura de 60°C, con una fase móvil de H₂SO₄ al 5 mM y un flujo de 0.6 mL/min (Diano y col., 2006). Se utilizó un detector de índice de refracción (RID-20A) marca SHIMADZU.

6.11 Diseño experimental

En la planeación del diseño experimental en el subcapítulo 7.2, para el análisis de ácidos orgánicos, polioles y azúcares se llevó a cabo mediante un diseño factorial 2^2 , en el cual, los factores a evaluar fueron: la concentración de macronutrientes (definida en la Tabla 3), micronutrientes (Definida en la Tabla 4) a dos distintos niveles, como se muestra en la matriz experimental, en el apartado denominado como 0 de H_2SO_4 (% p/v) en la Tabla 5. Para el subcapítulo 7.3, se evaluó el factor H_2SO_4 (% p/v) a 3 niveles: 0.4, 0.6 y 0.8, teniendo como variables de respuesta a las máximas producciones por metabolito, como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Matriz experimental para el estudio del efecto de macronutrientes, micronutrientes y del ácido sulfúrico sobre la producción de metabolitos

H_2SO_4 (% p/v)	Macronutrientes	Micronutrientes
0	1	1
	1	-1
	-1	1
	-1	-1
0.4	1	1
	1	-1
	-1	1
	-1	-1
0.6	1	1
	1	-1
	-1	1
	-1	-1
0.8	1	1
	1	-1
	-1	1
	-1	-1

Los resultados fueron analizados con el software STATGRAPHICS Centurion XVI, para su posterior conclusión.

7. Resultados

La sección de resultados se dividirá en 3 subcapítulos. En el primero, se presenta el efecto de la composición del medio de cultivo y la tasa de aireación; en el segundo, se presenta el efecto de la concentración de nutrientes en el medio de cultivo, en el último subcapítulo, se presenta el efecto de la concentración de ácido sulfúrico en el medio de cultivo sobre la producción de ácidos orgánicos y polioles.

7.1 Efecto de la composición del medio de cultivo y de la tasa de aireación sobre la producción de metabolitos

Dado que la composición del medio de cultivo y la tasa de aireación tienen un efecto importante en la síntesis de metabolitos de la fermentación, se diseñaron dos medios de cultivo; uno balanceado para producción de biomasa y/o alcoholes (Diano y col., 2006) y otro desbalanceado para producción de ácido cítrico (Bizukojc y col., 2004). Para ambos medios se evaluó el efecto de la aireación (cuatro tasas de aireación: 5, 10, 20 y 40 mL/min). En la tabla 6 se presenta los parámetros iniciales de este estudio. En este estudio no se hicieron réplicas experimentales de las variables estudiadas.

Tabla 6. Parámetros iniciales de la fermentación para evaluar el efecto del medio de cultivo y la tasa de aireación.

Fermentación	Flujo(ml/min)	Glucosa inicial (g/L)
D4	4	91
D4	4	91
D10	10	91
D20	20	91
D40	40	91
B5	5	100
B10	10	100
B20	20	100
B40	40	100

D: medio balanceado (Diano y col.,2006), B: medio desbalanceado (Bizukojc y col.,2004).

En este estudio, se analizó la producción de CO₂ y metabolitos, el consumo de O₂ y glucosa, pH y humedad. En el caso de los cultivos B20 y B40 no se analizó, la composición de la fase gaseosa, debido a la baja concentración de CO₂ a la salida de las unidades experimentales.

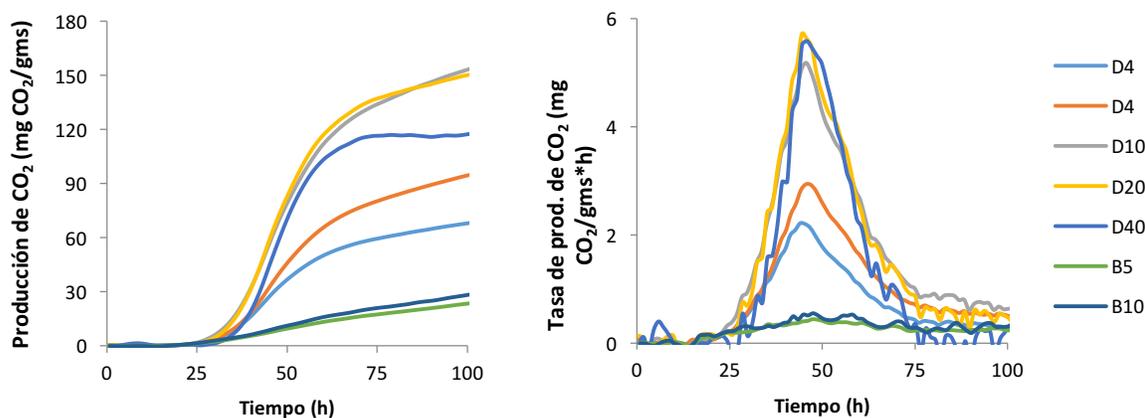
Tampoco se analizó el pH y ni la humedad para estos cultivos. En la Tabla 7 se muestran los valores de pH y humedad obtenidos a las 100 horas de cultivo con el medio balanceado y a las 145 horas con el medio desbalanceado.

Tabla 7. pH y humedad al final del cultivo de *A. brasiliensis*.

Fermentación	pH _f	Humedad _f (%)
D4	2.20	61.4
D4	2.23	62.7
D10	2.21	60.0
D20	2.22	58.5
D40	2.22	54.9
B5	2.92	59.0
B10	2.90	57.0

D: medio Diano y B: medio Bizukojc. Tasas de aireación: D4 (4 ml/min), B5 (5 ml/min), D10 (10 ml/min), B10 (10 ml/min) D20 (20 ml/min), D40 (40 ml/min).

La Tabla 7 muestra que para los dos medios de cultivo ensayados el pH al final de las fermentaciones (pH_f) fue similar para las diferentes tasas de aireación empleadas. Los pH_f para los cultivos con el medio desbalanceado fueron ligeramente superiores (0.7 unidades) que los del medio balanceado. Por otro lado, al aumentar el flujo de aireación la humedad final disminuyó ligeramente. Con base en el análisis de CO₂, se calcularon la tasa de producción de CO₂ y la producción de CO₂ (Gráfica 1).



Gráfica 1. Efecto de la composición del medio de cultivo y de la tasa de aireación sobre la producción de CO₂ (izq.) y la tasa de producción de CO₂ (der.) por *A. brasiliensis* en medio balanceado: Diano (D) y desbalanceado: Bizukojc (B). Tasas de aireación: D4 (4 ml/min), B5 (5 ml/min), D10 (10 ml/min), B10 (10 ml/min) D20 (20 ml/min), D40 (40 ml/min).

La gráfica 1 muestra que existe una mayor producción de CO₂ a tasas de aireación intermedias (10-20 ml/min), con el medio balanceado, en donde se obtuvo un máximo en la producción de CO₂ de 150 mg/gms. En el medio balanceado con menor aireación (4 ml/min) se encontró un máximo de 95 mg/gms. Para el medio desbalanceado, hay una mayor producción de CO₂ cuando mayor fue la aireación del sistema (10 ml/min) al encontrar un máximo de producción de 36 mg/gms. En el sistema con una aireación de 5 ml/min se encontró una producción máxima de 29 mg/gms, esto puede indicar que al aumentar la tasa de aireación el carbono será utilizado para la producción de metabolitos lo cual coincide con Kubicek y col. (1980) y Soccol y col. (2006), quienes mostraron que para aumentar la producción de ácido cítrico, se necesita grandes cantidades de O₂ en el cultivo. Al determinar la tasa de producción de CO₂, se encontró un máximo a las 45 horas de cultivo, sin importar la composición del medio de cultivo. Para el medio balanceado, la tasa de producción de CO₂ aumentó, cuando mayor fue la aireación del sistema, alcanzando un valor máximo de 5.5 mg/gms*h a una aireación de 40 ml/min y un máximo de 2 mg/gms*h con una aireación de 4 ml/min. Para el medio desbalanceado, se encontró un valor máximo de 0.55 mg/gms*h en el sistema con una aireación de 10 ml/min, para el sistema con una aireación de 5 ml/min se encontró un máximo de 0.43 mg/gms*h.

Estos datos revelan un efecto de la aireación y la composición del medio sobre la producción de CO₂. Los datos de producción de CO₂ y consumo de O₂ se utilizaron para calcular algunos parámetros asociados al metabolismo de *Aspergillus brasiliensis* (Tabla 8). La duración de la fase Lag aumentó en el medio balanceado al incrementar la tasa de aireación en el sistema, esto puede deberse a la disminución de humedad en el cultivo, como se describió con anterioridad, el aumento de la tasa de aireación disminuye la humedad lo que provocaría un periodo más largo de adaptación del microorganismo al cultivo, como se observa en la Tabla 8.

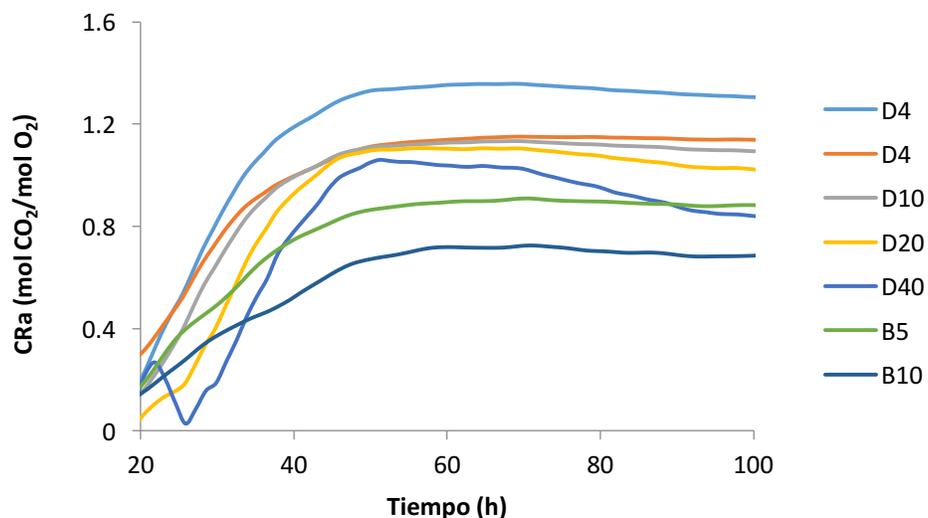
Tabla 8. Parámetros cinéticos del cultivo en medio sólido de *A. brasiliensis*

Parámetros	D4	D4	D10	D20	D40	B5	B10
Fase Lag (h)	23.36	21.6	21.66	25.53	30.06	24.23	22.33
Tasa máxima de producción de CO ₂ (mg/gms*h)	2.21	2.94	5.18	5.72	5.59	0.44	0.56
Producción final de CO ₂ (mg/gms)	68.37	95.61	154.98	151.04	118.05	30.55	38.17
CRa final (mol CO ₂ /mol O ₂)	1.3	1.14	1.09	1.02	0.83	0.83	0.64
glucosa consumida (%)	85.55	84.32	78.69	75.53	65.92	5.2	10.68

D: medio balanceado Diano y B: medio desbalanceado Bizukojc. Tasas de aireación: D4 (4 ml/min), B4 (4 ml/min), D10 (10 ml/min), B10 (10 ml/min) D20 (20 ml/min), D40 (40 ml/min).

Para el medio desbalanceado, se observó el efecto contrario; la duración de la fase Lag disminuyó al incrementar la tasa de aireación en el sistema; sin embargo este efecto no es concluyente, debido a que sólo se evaluaron dos tasas de aireación. La tasa máxima de producción de CO₂ aumentó, al incrementar la tasa de aireación en el cultivo balanceado encontrando un máximo de 5.72 mg/gms*h a una tasa de 20 ml/min, para el medio desbalanceado se observa el mismo efecto. La producción de CO₂ alcanzó un valor máximo de 154.98 mg/gms en el medio balanceado a un flujo 10 ml/min, a partir de esa tasa, la producción de CO₂ volvió a disminuir, alcanzando un valor de 118.05 mg/gms a una tasa de 40 ml/min. En el medio de cultivo desbalanceado, se produjo menor cantidad de CO₂, esto se debió al bajo consumo de glucosa de *A. brasiliensis*. El consumo de glucosa fue mayor en el medio de cultivo balanceado, esto se debió a la mayor disponibilidad de nutrientes en este medio de cultivo (Diano y col., 2006); además, se puede observar que la tasa de aireación influyó en el consumo de sustrato, entre menor aireación en el cultivo, mayor consumo de glucosa, esto pudo deberse a la disminución de humedad en el medio, lo que coincide con lo observado para las fases Lag de los cultivos. Para el medio de cultivo desbalanceado, el consumo de glucosa fue mayor al aumentar la tasa de aireación; sin embargo, el consumo máximo de glucosa fue apenas del 10%, esto se debió a que este medio está limitado en nutrientes, lo cual provocó el bajo consumo de la glucosa del medio. Una vez conociendo el efecto de la tasa de aireación y de la composición del medio de cultivo, sobre la producción de CO₂ y el consumo de glucosa, se estudió el efecto coeficiente

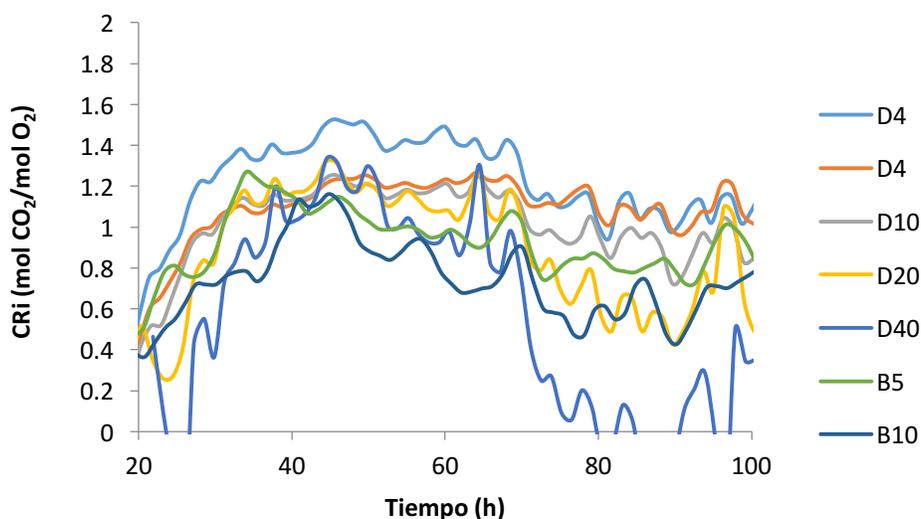
respiratorio (CR) sobre la producción de ácidos orgánicos y polioles, debido a que provee información sobre el metabolismo microbiano; este dependerá del nivel de oxidación del sustrato y de las condiciones de cultivo (Beaudin y col., 1996). Autores como Volke-Sepúlveda y col. (2003) atribuyeron el aumento del CR debido a la autólisis de la biomasa, provocada por el agotamiento de nutrientes como fuentes de nitrógeno o de fósforo. A continuación se muestra el coeficiente respiratorio acumulado (CRa) en función del tiempo.



Gráfica 2. Efecto de la composición del medio de cultivo y de la tasa de aireación sobre el coeficiente respiratorio acumulado durante el cultivo de *A. brasiliensis* en un medio balanceado: Diano (D) y desbalanceado: Bizukojc (B). Tasas de aireación estudiadas: D4 (4 ml/min), B4 (4 ml/min), D10 (10 ml/min), B10 (10 ml/min) D20 (20 ml/min), D40 (40 ml/min).

Los valores finales de CRa van de 0.65 a 1.31; es decir, hay un efecto importante en el CRa debido a la tasa de aireación y a la composición del medio de cultivo. En todos los casos, el CRa es mayor en el medio balanceado y disminuye al aumentar la tasa de aireación. Esto puede deberse a que a bajas tasas de aireación (mayores CRa) se favorece la producción de productos reducidos como los polioles lo cual coincide con lo reportado por Diano y col.(2006), quienes encontraron que en cultivos limitados en oxígeno, se favorece la producción de polioles. El aumento en la tasa de aireación (menores CRa) favorece la producción de ácidos orgánicos, lo cual concuerda con lo encontrado por Kubicek y col.(1980), quienes encontraron que para la producción de ácido cítrico, se necesita una

alta cantidad de O₂ en el medio. Por lo tanto, el CRa dependerá del grado de óxido-reducción de los sustratos y productos. Para el medio desbalanceado sucedió el mismo efecto, al aumentar la tasa de aireación disminuyó el CRa, lo cual pudo significar una mayor producción de ácidos orgánicos. Por los resultados obtenidos, se puede suponer que para tener una mayor producción de ácidos orgánicos, se requiere una tasa de aireación alta con medios desbalanceados. Para la producción de polioles se requiere una menor tasa de aireación y un medio balanceado en este caso; sin embargo, es necesario saber el tiempo en el cual el metabolismo se desvía a la producción de algún metabolito, por lo tanto se procedió a calcular el coeficiente respiratorio instantáneo (CRi).

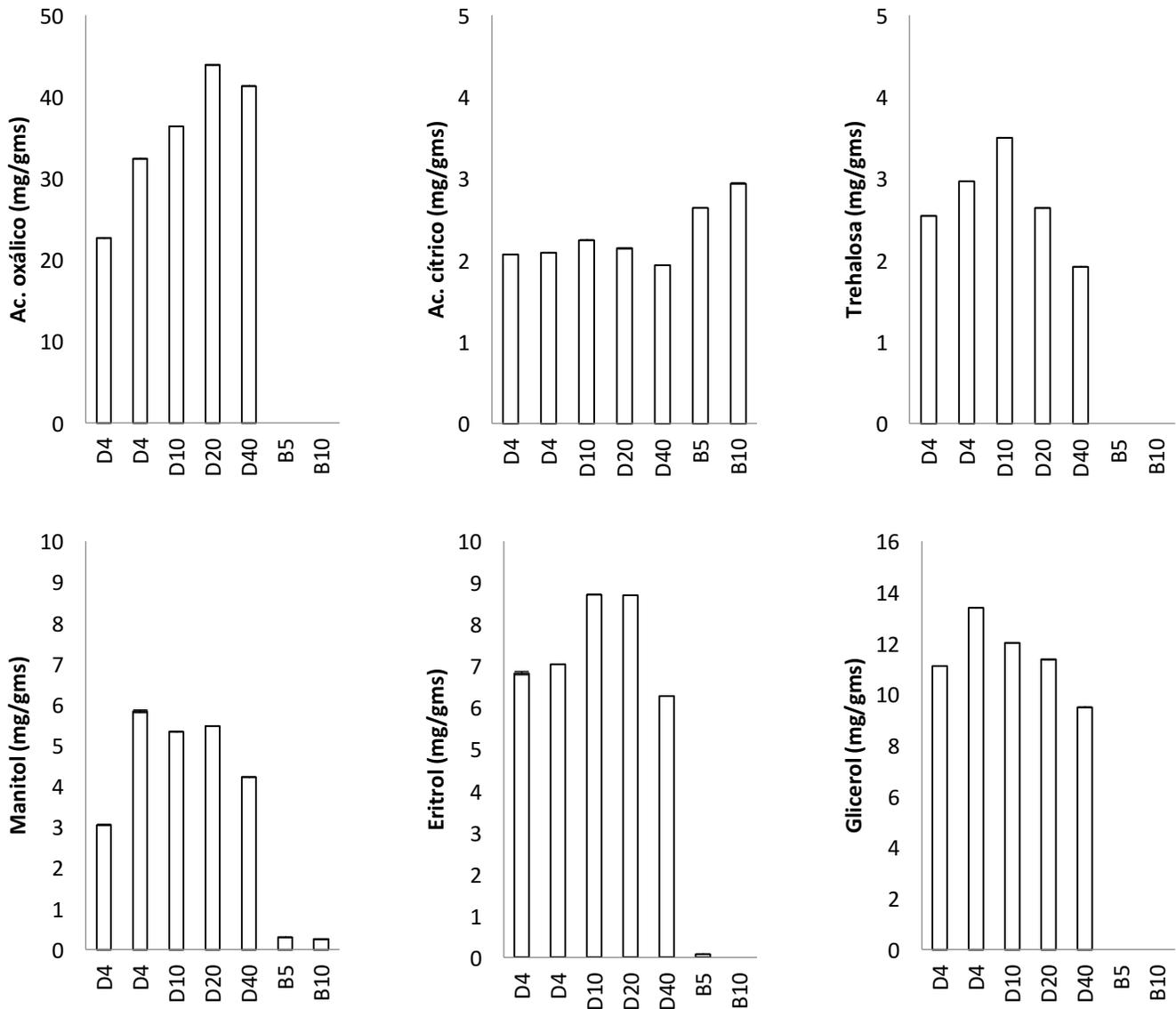


Gráfica 3. Efecto de la composición del medio de cultivo y de la tasa de aireación sobre el coeficiente respiratorio instantáneo durante el cultivo de *A. brasiliensis* en un medio balanceado: Diano (D) y desbalanceado: Bizukojc (B). Tasas de aireación: D4 (4 ml/min), B4 (4 ml/min), D10 (10 ml/min), B10 (10 ml/min) D20 (20 ml/min), D40 (40 ml/min).

En la Gráfica 3, se observan valores de alrededor de 1 para el CRi entre las 30 y 70 horas de cultivo para todas las condiciones, esto significa que en ese periodo de tiempo el carbono de la glucosa es destinado, en su mayor parte, a la producción de CO₂ esto se puede afirmar porque en la reacción estequiométrica en la que se consume glucosa y se produce CO₂ el CR es 1. Después de las 70 horas de cultivo, el CRi disminuye para el medio balanceado; esto pudo deberse a que el microorganismo entró en la fase de mantenimiento. Para el medio

desbalanceado se observa que después de las 50 horas de cultivo, el CRi se mantuvo en valores menores a 1, a una tasa de aireación de 10 ml/min, esto pudo deberse a que se sintetizaron ácidos orgánicos, lo cual coincidiría con lo reportado por Bizukojc y col.(2004), quienes encontraron que con su medio de cultivo, se favoreció la producción de ácido cítrico (45 g/L). Con base en los CR se calculó la producción de los metabolitos a tiempos finales del cultivo, para determinar el efecto de la tasa de aireación y de la composición del medio.

En la Gráfica 4 se presenta la producción de metabolitos, a las 100 horas de la fermentación, para las unidades experimentales con el medio balanceado y a las 145 horas con el medio desbalanceado. Para el medio balanceado, la producción de ácido oxálico aumentó al aumentar la tasa de aireación; hasta llegar a una tasa de aireación de 20 ml/min. Lo anterior coincide con lo reportado por Diano y col.(2009) quienes observaron una disminución en la producción de ácido oxálico, al disminuir la tasa de aireación, debido a la inhibición parcial de la oxalacetato acetil-hidrolasa, encargada de la síntesis de ácido oxálico. Por otra parte, no hubo producción de ácido oxálico en el medio desbalanceado, probablemente por el bajo pH inicial del medio, provocando una inhibición sobre la producción de ácido oxálico (Ruijter y col., 1999).



Gráfica 4. Producción de metabolitos al finalizar el cultivo de *A. brasiliensis*, empleando dos medios de cultivo y diferentes tasas de aireación en FES. En un medio balanceado: Diano (D) y desbalanceado: medio Bizukojc (B). Tasas de aireación: D4 (4 ml/min), B4 (4 ml/min), D10 (10 ml/min), B10 (10 ml/min) D20 (20 ml/min), D40 (40 ml/min).

Para la producción de ácido cítrico en el medio balanceado no se observaron diferencias en la producción (2.24 mg/gms), a medida que se incrementó la tasa de aireación. Este efecto se atribuyó al consumo de ácido cítrico por *A. brasiliensis*, provocado por el agotamiento del sustrato en el medio; sin embargo en todas las condiciones estudiadas para el medio balanceado, no se encontró un consumo total del sustrato, lo cual puede indicar que la

deshidratación de los medios pueda provocar este efecto. Para el medio desbalanceado, se observa mayor producción de cítrico (2.94 mg/gms) y de CO₂. Este comportamiento ha sido descrito por Soccol y col. (2006), quienes reportaron que para aumentar la producción de ácido cítrico, se necesitan altas cantidades de O₂ en el medio de cultivo. Otros autores como Vandenbergue y col. (2000) mostraron que la concentración de CO₂ en el cultivo, favorece la producción de cítrico, debido a que se retarda la etapa de esporulación del hongo. Estos autores afirman que entre mayor es la esporulación del hongo, se obtendrá una menor producción de cítrico en el medio; otro factor que influye es la composición del medio el cual está diseñado para la producción de cítrico (Bizukojc y col., 2004).

La producción de trehalosa en el medio balanceado incrementa cuando el flujo de aireación fue de 10 ml/min, encontrando un máximo (3.5 mg/gms), coincidiendo con lo reportado por Diano y col. (2006), quienes indicaron que a tasas de aireación bajas, habría mayores rendimientos de metabolitos, tales como la trehalosa. Empleando el medio desbalanceado no se produjo este metabolito.

Con relación al manitol, su producción aumentó al disminuir la tasa de aireación para medios balanceados. Autores como Diano y col. (2009) reportaron que, a menores flujos de aireación, el cultivo se encuentra limitado en oxígeno, provocando la inhibición de la enzima manitol-1-fosfato dehidrogenasa, lo que provoca que se acumule el manitol. Para el medio desbalanceado, se observó una baja producción de manitol (0.25 mg/gms) con una tasa de aireación de 10 ml/min. Esto puede deberse a que las bajas tasas de aireación de igual manera que en el medio balanceado favorecen la producción de este poliol (Diano y col., 2009).

La Gráfica 4 muestra una mayor producción de eritrol a tasas de aireación intermedias (10-20 ml/min) en el medio balanceado. Diano y col. (2006) reportaron que la producción de eritrol se ve favorecida en medios de cultivos balanceados. Otros autores encontraron una mayor producción de eritrol a altas concentraciones de glucosa, debido al incremento de

las presiones osmóticas del medio, *A. brasiliensis* sintetiza solutos compatibles le ayuden a mantener el equilibrio osmótico intracelular y extracelular (Gutiérrez-Rojas, 1995). En el cultivo desbalanceado no se produjo eritrol en el medio, lo cual no coincide con el antecedente antes mencionado; sin embargo esto puede deberse al bajo consumo de sustrato en el medio.

Hubo una mayor producción de glicerol entre menor fue la tasa de aireación en cultivos balanceados. Se ha reportado que, en cultivos con limitaciones de oxígeno, hay acumulación de NADH en las células, favoreciendo la acumulación de gliceraldehido-3-fosfato, intermediario del glicerol (Diano y col., 2006). Una vez más no se produjo glicerol en el medio desbalanceado, esto puede deberse al bajo consumo de sustrato en el medio y a que el medio está diseñado para la producción de ácido cítrico, lo cual provoca que haya una nula acumulación de glicerol en el medio debido a que este poliol ha sido descrito como el iniciador de la acumulación de ácido cítrico en procesos de fermentación (Legisa y col., 1989).

Al comparar la producción de metabolitos en los distintos medios, se observó que en el medio balanceado se produjo una mayor variedad de metabolitos, incluyendo los polioles (Diano y col., 2006), esto coincide con lo planteado en la discusión del coeficiente respiratorio, en donde se planteó que este medio favorecería la producción de estos productos. Para el medio desbalanceado, se observó la acumulación de ácido cítrico, esto coincide de la misma manera con la discusión del coeficiente respiratorio en donde se planteó que los bajos CR se deben a la acumulación de productos oxidados. En el medio desbalanceado, de igual manera se produjo manitol en bajas concentraciones, esto pudo deberse a las bajas tasa de aireación utilizadas para este medio (Diano y col., 2009).

7.1.1 Conclusiones parciales

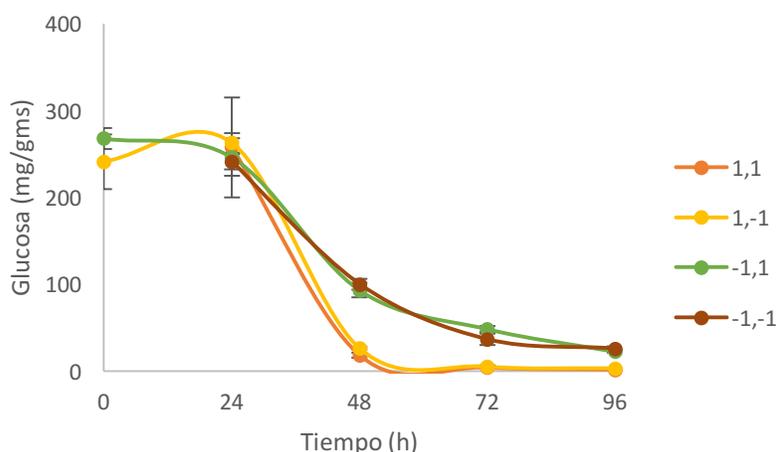
Con respecto al efecto de la composición del medio de cultivo se mostró que en el medio de cultivo balanceado, se consume mayor cantidad de sustrato, provocando una mayor producción de CO₂. En el medio de cultivo desbalanceado la glucosa se mineraliza parcialmente, produciendo menor cantidad de CO₂ debido a que este medio está limitado en micronutrientes. El metabolismo de *A. brasiliensis* en cultivos balanceados está dirigido a la producción de polioles y en desbalanceados a ácidos orgánicos en concentraciones muy bajas.

El estudio del efecto de la tasa de aireación de los cultivos sólidos, mostró que los cultivos con tasas de aireación altas producen más CO₂ y ácidos orgánicos, y que los cultivos con bajas tasas de aireación, favorecen la producción de polioles. Adicionalmente, el aumento de la tasa de aireación provocó un menor consumo de sustrato.

De acuerdo a las conclusiones de este subcapítulo se optó por utilizar un medio de cultivo desbalanceado en condiciones aerobias para continuar el estudio del efecto de la relación de nutrientes en el medio de cultivo, como se presenta en el siguiente subcapítulo.

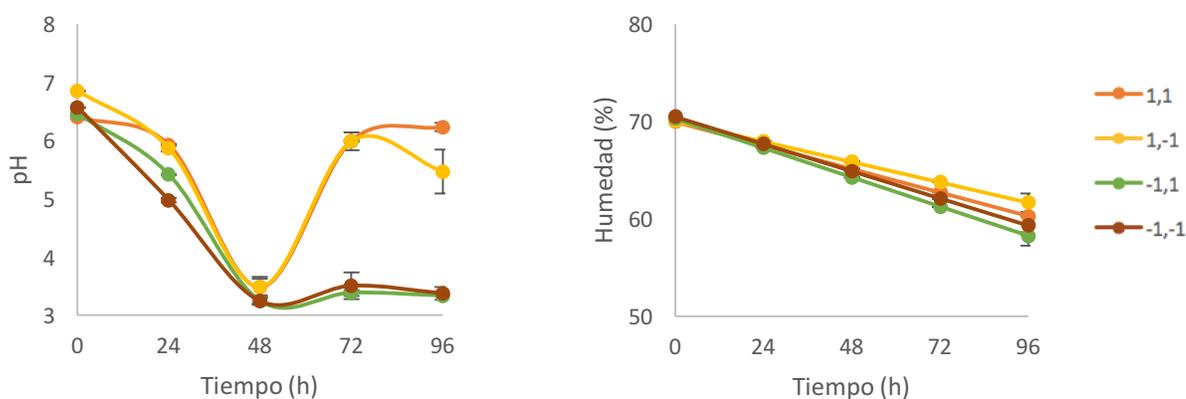
7.2 Efecto de la concentración de nutrientes sobre la producción de metabolitos

Dado que la concentración de macronutrientes y micronutrientes del medio de cultivo tienen un efecto importante en el producto final de la fermentación, se seleccionó el medio reportado por Sánchez-Soto (2001) para la producción de ácidos orgánicos y polioles por *A. niger* a altas concentraciones de glucosa. La principal diferencia entre este medio y los reportados por Diano y col. (2006) y Bizukojc y col. (2004) es el cambio de la fuente de nitrógeno y la concentración de micronutrientes en el medio, otra diferencia que presenta este medio, es que está diseñado para la producción de ácidos orgánicos y polioles, por lo tanto, se decidió utilizar este medio de cultivo, cambiando las relaciones de macronutrientes-micronutrientes como se detalla en la metodología, para observar el efecto que tiene la concentración de nutrientes sobre la producción de metabolitos. Los resultados obtenidos se reportarán con base en las relaciones de macronutrientes-micronutrientes. En esta sección, se analizó la producción de metabolitos, consumo de glucosa, el pH y la humedad. En la Gráfica 5 se observa que la concentración inicial de glucosa fue de 240 a 270 mg/gms, esta fluctuación pudo deberse a problemas de homogenización del sustrato en el soporte; sin embargo, se observó que a las 24 horas de cultivo la concentración de glucosa fue similar (250 mg/gms) en los cuatro medios de cultivo.



Gráfica 5. Cinética de consumo de glucosa en cultivos sólidos de *A. Brasiliensis* empleando diferentes concentraciones de nutrientes. En donde la relación de nutrientes es: 1,1 (Alta-Alta); 1,-1 (Alta-Baja); -1,1 (Baja-Alta); -1,-1 (Baja-Baja).

El consumo de glucosa fue mayor en los medios con alta concentración de macronutrientes (89.17%) e independiente de la concentración de micronutrientes. A bajas concentraciones de macronutrientes el consumo de glucosa fue de 62.97%. Esto pudo deberse a que los medios con altas concentraciones de macronutrientes tienen una mayor concentración de nitrógeno que puede ser utilizado para la síntesis de proteínas (Martinko, 2009), lo que puede significar mayor producción de biomasa en comparación con los medios con bajas concentraciones de macronutrientes. A las 72 horas de cultivo se observó que, para las relaciones con altas concentraciones de macronutrientes (1,1 y 1,-1), el consumo de glucosa fue del 97.92%, lo que indica un agotamiento de glucosa en estos medios. Para los medios con bajas concentraciones de macronutrientes (-1,1 y -1,-1), se consumió el 86.67% de glucosa lo cual puede indicar un agotamiento de la fuente de nitrógeno, provocando una mineralización parcial del sustrato. A partir de las 96 horas cultivo, ya no hubo consumo de glucosa para todos los medios evaluados. La Gráfica 6 muestra cambios importantes en el pH para las cuatro relaciones de nutrientes.



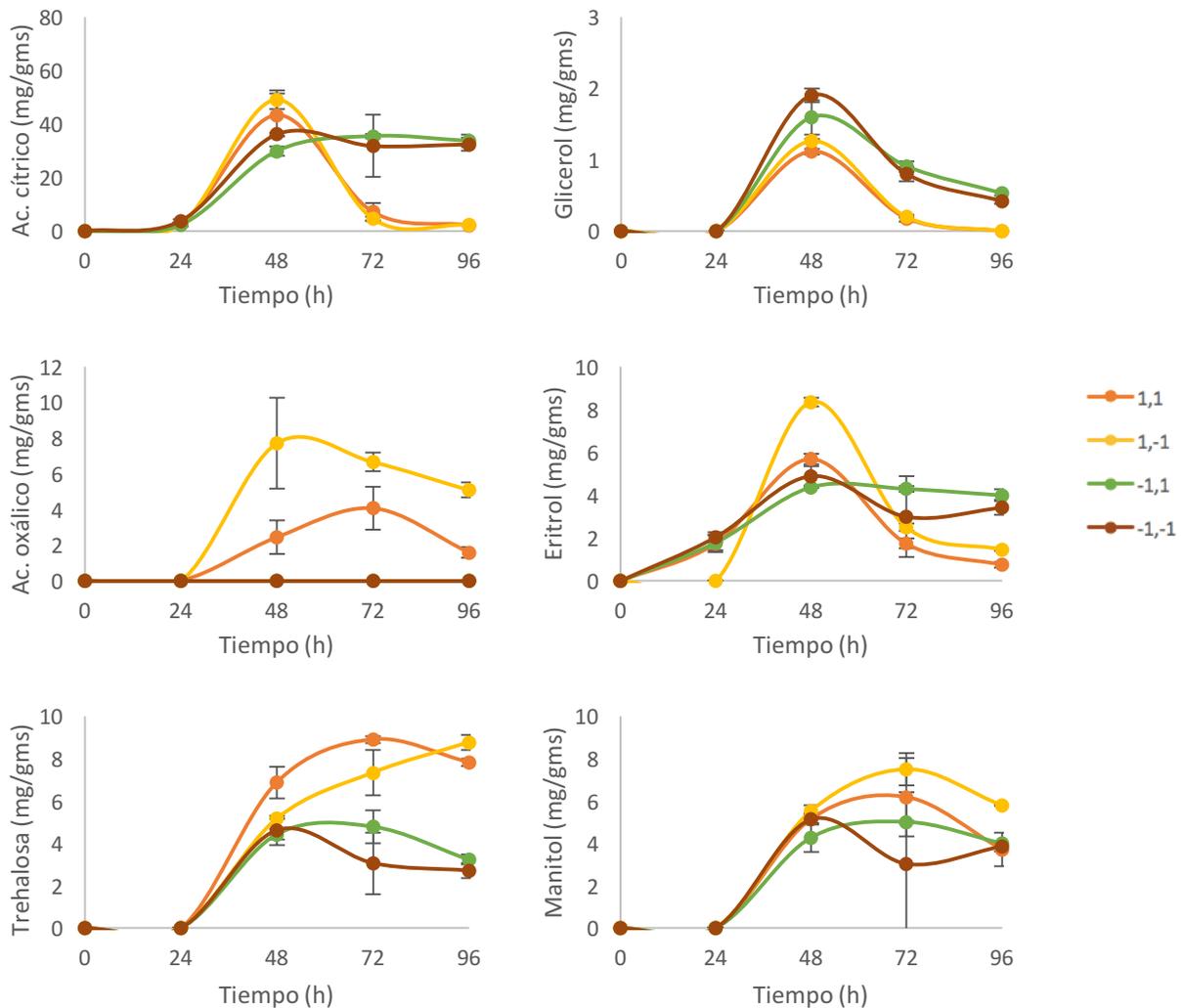
Gráfica 6. Cinéticas de pH y humedad en los cultivos sólidos de *A. Brasiliensis* empleando diferentes concentraciones de nutrientes en los medios. Concentración de nutrientes: 1,1 (Alta-Alta); 1,-1 (Alta-Baja); -1,1 (Baja-Alta); -1,-1 (Baja-Baja).

En los cuatro medios de cultivo evaluados, el pH disminuyó de un valor inicial entre 6.5 y 7 a un valor de 3 a las 48 horas de cultivo. Esto puede deberse a la síntesis de ácidos orgánicos y su secreción al medio. Esto coincide con lo reportado por Soccol y col. (2006), quienes reportaron que las especies de *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., frecuentemente

producen ácidos orgánicos, lo cual provoca una disminución rápida del pH en el medio. Posteriormente, a las 72 horas se observó un incremento en el valor del pH a alrededor de 6 en los cultivos con altas concentraciones de macronutrientes (1,1 y 1,-1). El aumento del pH en estos medios pudo deberse, al consumo total de la glucosa (97.92%), lo cual provocaría el consumo de ácidos orgánicos en el medio aumentando el pH del medio. Esto no sucedió con los cultivos con bajas concentraciones de macronutrientes, teniendo un pH constante hasta las 96 horas. Esto último puede deberse a que en los medios con bajas concentraciones de macronutrientes (-1,1 y -1,-1), solo se consumió el 86.67% de glucosa provocando que los ácidos orgánicos en el medio no se consuman y por lo tanto no disminuya el pH del medio (Soccol y col., 2006).

Las mediciones de humedad durante el cultivo muestran pérdidas del 10% para las cuatro relaciones de nutrientes al finalizar la FES. Con base en los datos obtenidos, se calculó la concentración de ácidos orgánicos, polioles y azúcares, para poder confirmar la anterior discusión.

En la Gráfica 7, se presenta la producción de metabolitos en los cultivos sólidos de *A. brasiliensis*, empleando diferentes concentraciones de nutrientes en los medios. El ácido cítrico fue el producto mayoritario en todos los medios evaluados. La mayor producción de ácido cítrico se obtuvo a las 48 horas en los medios con alta concentración de macronutrientes. Al comparar estos medios, se observa que en presencia de la menor concentración de micronutrientes, aumenta la producción de ácido cítrico (49.08 mg/gms). A partir de las 48 horas, únicamente los medios con menor concentración de macronutrientes, mantienen constante su concentración de ácido cítrico. La producción de ácido oxálico se favoreció en medios con altas concentraciones de macronutrientes. Una alta concentración de macronutrientes combinada con una baja concentración de micronutrientes en el medio de cultivo, favorece la actividad de la oxalacetato acetilhidrolasa (OAH), encargada de la síntesis de ácido oxálico (Diano y col., 2009).



Gráfica 7. Efecto de la concentración de nutrientes sobre la producción de ácido cítrico, ácido oxálico, eritrol, manitol, trehalosa y glicerol, durante los cultivos sólidos de *A. brasiliensis*. Concentración de nutrientes: 1,1 (Alta-Alta); 1,-1 (Alta-Baja); -1,1 (Baja-Alta); -1,-1 (Baja-Baja).

Se obtuvo la mayor producción de eritrol (8.33 mg/gms) con altas concentraciones de macronutrientes combinada, con una baja concentración de micronutrientes. Esto pudo deberse al incremento de la presión osmótica del medio; puesto que *A. brasiliensis* produce moléculas que le ayuden a mantener un correcto balance osmótico (Córdova-López, 1994; Gutiérrez- Rojas, 1995; Diano y col., 2006). Este metabolito osmorregulador se produjo en el medio con baja concentración de micronutrientes, esto puede deberse a que la eritrosa reductasa, encargada de la síntesis de eritrol se ve inhibida por las altas concentraciones de algún micronutriente presente en el medio (Diano y col., 2009).

Al igual que el eritrol, la producción de manitol se ve favorecida cuando la concentración de macronutrientes es alta y la de micronutrientes es baja. A las 72 horas de cultivo, el manitol alcanzó su máxima concentración (7.50 mg/gms). Cabe destacar que la síntesis de este metabolito ha sido poco descrita; sin embargo autores como Diano y col. (2009) reportaron que la limitación de oxígeno en los cultivos provoca la inhibición de la enzima manitol-1-fosfato dehidrogenasa, provocando mayores producciones de manitol. Estos resultados abren una discusión sobre la producción de este metabolito con distintas relaciones de nutrientes en el medio.

Con relación a la cinética de producción de glicerol, ésta fue prácticamente similar para todas las concentraciones de nutrientes evaluadas. En todos los casos, se obtuvo una máxima producción a las 48 horas. Estudios previos han demostrado que el glicerol es el iniciador de la acumulación de ácido cítrico. Legisa y Matthey (1989) reportaron que en el inicio del cultivo de *A. niger* (después de la germinación), el metabolismo del hongo se dirige a la ruta HMP y la síntesis de glicerol funciona para reoxidar el excedente de NADPH⁺ generado. La concentración intracelular de glicerol que se alcanza es capaz de inhibir a la isocitrato-deshidrogenasa (ICDH) y el citrato empieza a acumularse dentro de la célula. Al mismo tiempo la alta concentración de citrato inhibe a la 6 fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH), con lo que se detiene el metabolismo de la glucosa vía HMP y se activa el funcionamiento de la EMP, suspendiendo la biosíntesis del glicerol. La acumulación de citrato inicia lentamente, pero se incrementa a medida que el glicerol se consume. Las cinéticas de producción de ácido cítrico y glicerol muestran que para los medios evaluados, la producción del glicerol no está asociada a la producción de ácido cítrico, esto se deduce por que encontramos la máxima producción de los dos metabolitos a las 48 horas de cultivo, hasta el momento no se han encontrado reportes en donde se observe tal comportamiento; por lo tanto, sería interesante saber porque en estos cultivos, no están asociadas las producciones de estos metabolitos.

La producción de la trehalosa fue mayor en los cultivos con alta concentración de macronutrientes, encontrando una producción máxima de 8.77 mg/gms a las 96 horas cuando la concentración de micronutrientes era menor en el cultivo. En general la producción de ácidos orgánicos y polioles, con excepción del glicerol, incrementó entre mayor es la concentración de macronutrientes en el medio con producciones máximas a las 48 horas de cultivo.

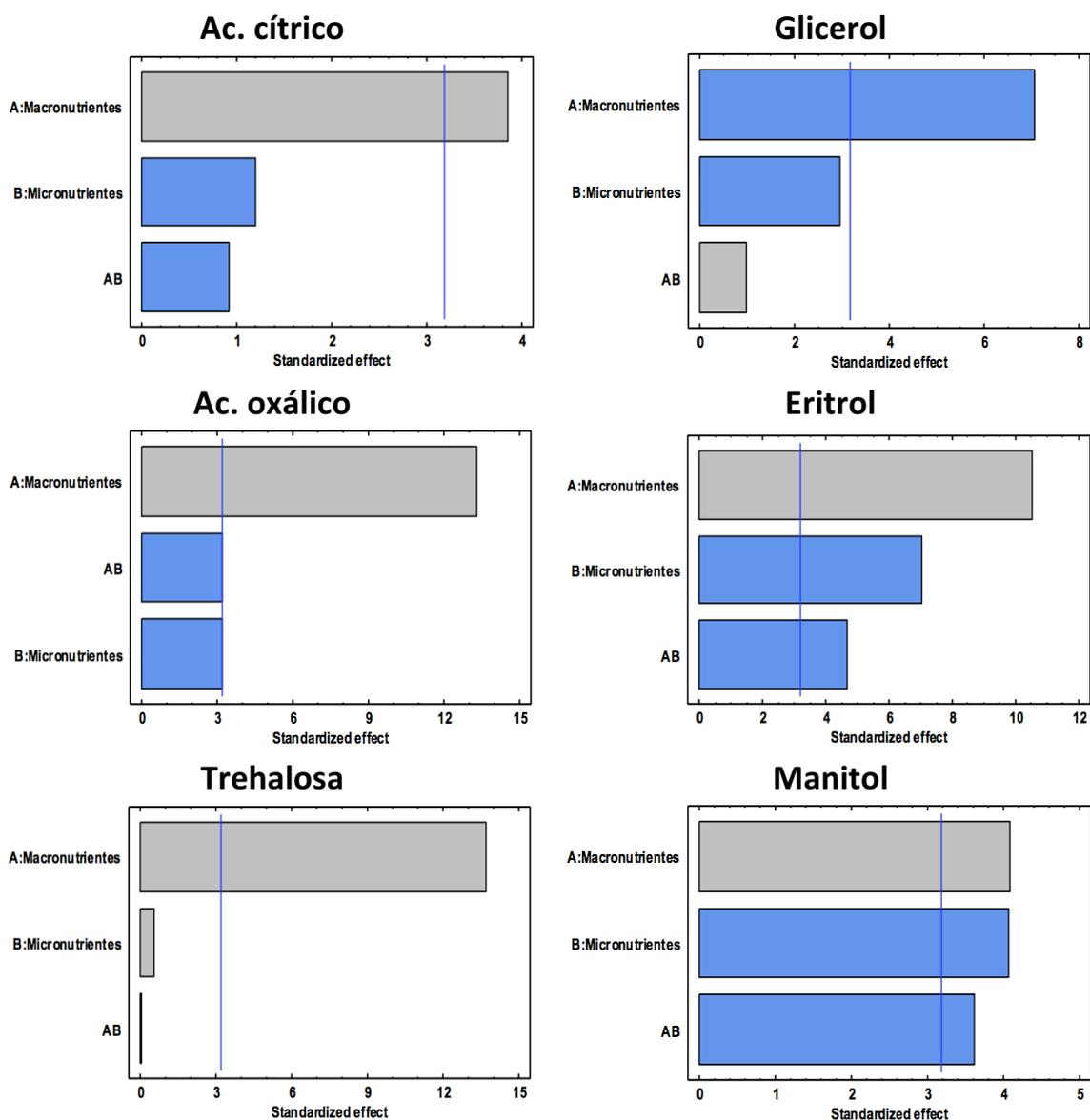
Con base en los datos obtenidos se realizó un análisis estadístico para tener certeza del efecto de la relación de nutrientes sobre la producción de metabolitos en FES.

7.2.1 Validación de diseño experimental del efecto de la concentración de nutrientes sobre la producción de metabolitos

El programa STATGRAPHICS Centurion XVI se utilizó para obtener la gráfica de Pareto, la gráfica de factores principales y el modelo de regresión lineal para cada metabolito. Los factores sometidos a este diseño fueron la concentración de los macronutrientes y micronutrientes en el medio de cultivo, a dos niveles cada factor, teniendo un diseño factorial 2². La Gráfica 8 muestra los diagramas de Pareto obtenidos a partir de las producciones de ácidos orgánicos y polioles en la FES.

El diagrama del ácido cítrico muestra que los macronutrientes son los únicos que tienen un efecto sobre su producción, mostrando que hay un efecto positivo, lo cual indica que al aumentar la concentración de macronutrientes tendremos una mayor producción de ácido cítrico. Para la producción de glicerol, los macronutrientes son el único factor que afecta la síntesis de una manera negativa, esto quiere decir que entre mayor concentración de macronutrientes en el medio, habrá una menor producción de glicerol. Esto sugiere que la producción de ácido cítrico está relacionada con la producción de glicerol; ya que, entre más macronutrientes, se produciría más ácido cítrico y menos glicerol, y viceversa (Córdova-López, 1994; Gutiérrez- Rojas, 1995; Diano y col., 2006); sin embargo, la producción de estos dos metabolitos como se mencionó anteriormente, no están acopladas. El diagrama del ácido oxálico muestra a los macronutrientes como el único factor que tiene un efecto

positivo sobre su producción. En particular las altas concentraciones de fuentes de nitrógeno y magnesio en los medios, favorecen la producción de ácido oxálico.

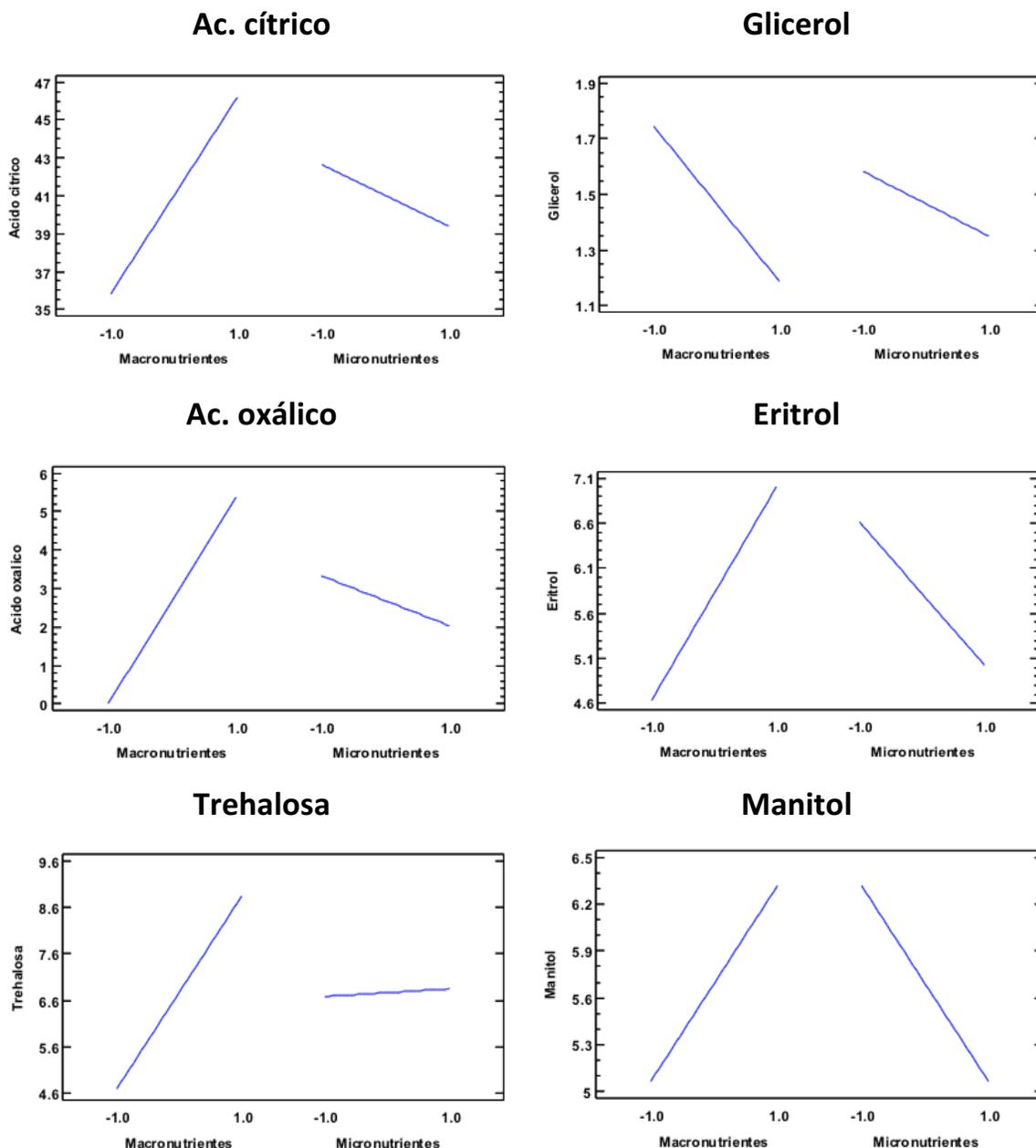


Gráfica 8. Diagramas de Pareto sobre los factores (Macronutrientes: A y Micronutrientes: B) que influyen la producción de ácidos orgánicos y polioles en los cultivos sólidos de *A. brasiliensis*. Las barra gris indica un efecto positivo sobre la variable de respuesta, la barra azul indica un efecto negativo sobre la variable de respuesta. A partir de la línea vertical azul los efectos son significativos a una p menor o igual a 0.05.

Todos los factores (macronutrientes, micronutrientes y la interacción macro-micro) tuvieron un efecto significativo sobre la producción de eritrol. Los macronutrientes tienen un efecto positivo, lo cual indica que en el intervalo estudiado, a mayor concentración de

macronutrientes, habrá una mayor producción de eritrol. Lo anterior coincide con lo reportado por algunos autores que mencionan al eritrol como el principal osmorregulador en medios con altas concentraciones de glucosa (Córdova-López, 1994; Gutiérrez-Rojas, 1995; Diano y col., 2006; Diano y col., 2009). Los micronutrientes tienen un efecto negativo sobre la producción de eritrol, indicando que entre mayor sea la concentración de micronutrientes en el medio, menor será la producción. Esto parece indicar que algunos de los micronutrientes puede estar inhibiendo alguna de las enzimas encargadas de sintetizar al eritrol. Todos los factores evaluados tuvieron un efecto significativo sobre la producción de manitol. Los macronutrientes tuvieron un efecto positivo sobre la producción, Diano y col. (2009) reportaron que la producción de manitol está asociada a la represión catabólica en cultivos líquidos. En FES, se considera que existe una menor represión catabólica, lo que explicaría el efecto positivo sobre este factor. Por otra parte, los micronutrientes tuvieron un efecto negativo sobre la producción de manitol. Esto pudo deberse a la inhibición de la manitol-1-fosfatodeshidrogenasa provocado por algún catión presente en el medio (Diano y col., 2009). Finalmente, sólo los macronutrientes tuvieron un efecto significativo sobre la producción de trehalosa. El efecto que ejercen los macronutrientes sobre la producción de trehalosa aún no es clara. A continuación se muestran las interacciones de los efectos principales (Gráfica 9).

La relación de nutrientes más favorable para la producción de ácido cítrico fue una alta concentración de macronutrientes y una baja concentración de micronutrientes en el medio. Para el glicerol su producción fue favorecida a una baja concentración de macronutrientes y una baja concentración de micronutrientes. Para el ácido oxálico, eritrol y manitol, sus producciones fueron mayores en medios con altas concentraciones de macronutrientes y bajas concentraciones de micronutrientes. Por último para la producción de trehalosa, la relación que favoreció la producción fueron altas concentraciones de macronutrientes combinadas con altas concentraciones de micronutrientes favorecen la producción.



Gráfica 9. Interacción de los factores principales que afectan la producción de ácidos orgánicos y polioles en los cultivos sólidos de *A. brasiliensis*. En donde 1 es la concentración Alta y -1 es la concentración Baja. En el eje de la ordenadas se muestra la concentración de los metabolitos en mg/gms.

Por último, en la Tabla 9 se presentan los modelos de regresión lineal, con los cuales se puede predecir la producción de estos metabolitos en los medio de cultivo sólidos de *A. brasiliensis*, esto nos dará una idea de cuál es la producción de estos metabolitos con distintas concentraciones de macronutrientes y micronutrientes.

Tabla 9. Modelos de regresión lineal sobre los factores que afectan la producción de ácidos orgánicos y polioles. Factor: Macronutrientes (A), Micronutrientes (B) y Macronutrientes*Micronutrientes (C).

Metabolito (mg/gms)	Modelo	R²
Ácido cítrico =	$41.0225 + 5.185*A - 1.625*B - 1.2425*C$	0.86
Ácido oxálico =	$2.68125 + 2.68125*A - 0.64625*B - 0.64625*C$	0.98
Eritrol =	$5.81875 + 1.18375*A - 0.79375*B - 0.52875*C$	0.98
Manitol =	$5.69125 + 0.62625*A - 0.62375*B - 0.55375*C$	0.94
Trehalosa =	$6.7675 + 2.0675*A + 0.08*B - 0.01*C$	0.98
Glicerol =	$1.46625 - 0.27875*A - 0.11625*B + 0.03875*C$	0.95

La Tabla 9 muestra, con un R² promedio de 0.94, la descripción de la producción de ácidos orgánicos y polioles en medios con distintas concentraciones de macronutrientes y micronutrientes (mg/gms). Estos modelos pueden predecir con un 94% de certeza la producción de los metabolitos antes mencionados.

A pesar de saber el efecto de la relación de nutrientes sobre la producción de metabolitos es necesario mencionar la importancia de estimar la producción de CO₂ y biomasa debido a que tienen un efecto importante sobre el metabolismo. Vandenberghe y col. (2004) demostraron que la acumulación de CO₂ en el cultivo tiene un efecto positivo sobre la producción de ácido cítrico debido, a que el crecimiento se encuentra limitado. Rodrigues y col. (2013) cuantificaron la biomasa para determinar la relación que tiene sobre la producción de ácido cítrico, ellos encuentran que la mayor producción de biomasa coincide con la mayor acumulación de ácido cítrico. Por lo tanto de ahí la importancia de determinar la producción de biomasa y CO₂, con esto además podemos completar balances de carbono para determinar el destino final del sustrato y entender mejor el metabolismo del microorganismo. A partir de los datos obtenidos por el software estadístico, se llegó a las conclusiones que se presentan a continuación.

7.2.2 Conclusiones parciales

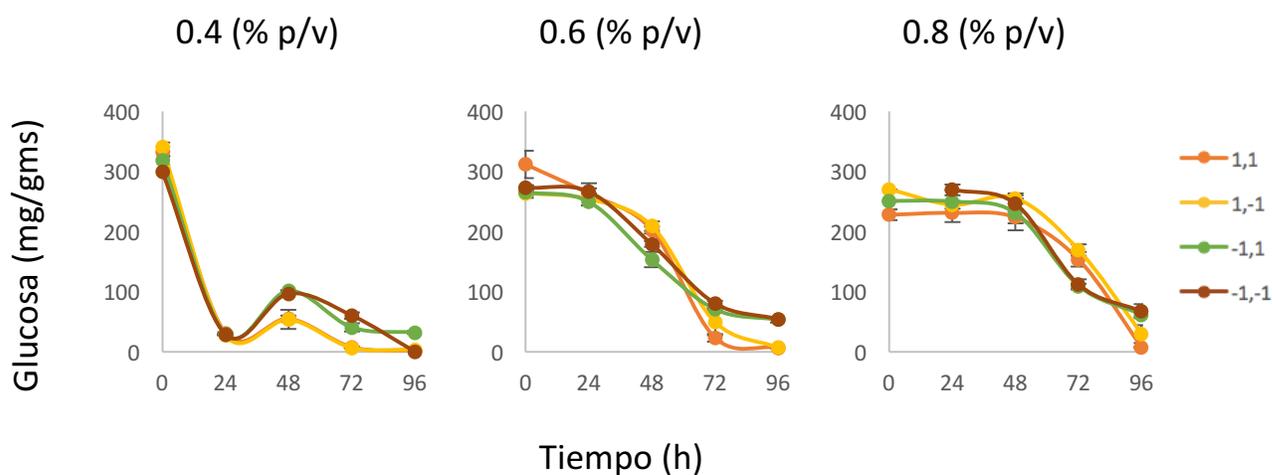
El estudio del efecto de la concentración de nutrientes demostró que las altas concentraciones de macronutrientes y bajas concentraciones de micronutrientes en el medio favorecen la producción de los metabolitos analizados exceptuando al glicerol, cuya producción se favorece con una baja concentración de macronutrientes y baja concentración de micronutrientes (-1,-1).

De acuerdo a las conclusiones de este subcapítulo, se decidió por evaluar el efecto del pH inicial del medio sobre la producción de los metabolitos. Para ello, se planteó un tratamiento con ácido sulfúrico para disminuir el pH del medio, debido a que la literatura indica que para producir ciertos ácidos orgánicos se necesita un pH bajo inicial (Papagianni, 2007; Max y col, 2010). Por consiguiente se estudio el efecto de la adición de ácido sulfúrico en el medio de cultivo para la producción de metabolitos.

7.3 Efecto de la concentración de ácido sulfúrico sobre la producción de metabolitos

El pH del medio es un parámetro muy importante que influencia el producto final de una fermentación y su concentración. Dado que ajustar y controlar el pH en una FES es difícil, se modificó el pH inicial del medio, mediante la adición de ácido sulfúrico a concentraciones de 0.4, 0.6, 0.8 (% p/v). El medio de cultivo utilizado en este estudio para la producción de ácidos orgánicos y polioles, fue el reportado por Sánchez-Soto (2001) con una alta concentración de glucosa (ver M y M sección 6.4.2). Los resultados obtenidos se reportan con base en la relación de macronutrientes-micronutrientes y en la concentración de H_2SO_4 utilizado. En esta sección se analizó la producción de metabolitos, consumo de glucosa, pH y humedad. En la gráfica 10 se muestra las cinéticas de consumo de sustrato (glucosa) para las cuatro relaciones de nutrientes y las distintas concentraciones de H_2SO_4 .

En la Gráfica 10 se observa un consumo más lento de glucosa al aumentar la concentración de H_2SO_4 , en los cultivos con 0.4% de H_2SO_4 se alcanzaron concentraciones de glucosa menores a 100 mg/gms a las 24 horas, con 0.6% de H_2SO_4 a las 72 horas y con 0.8% de H_2SO_4 a las 96 horas.

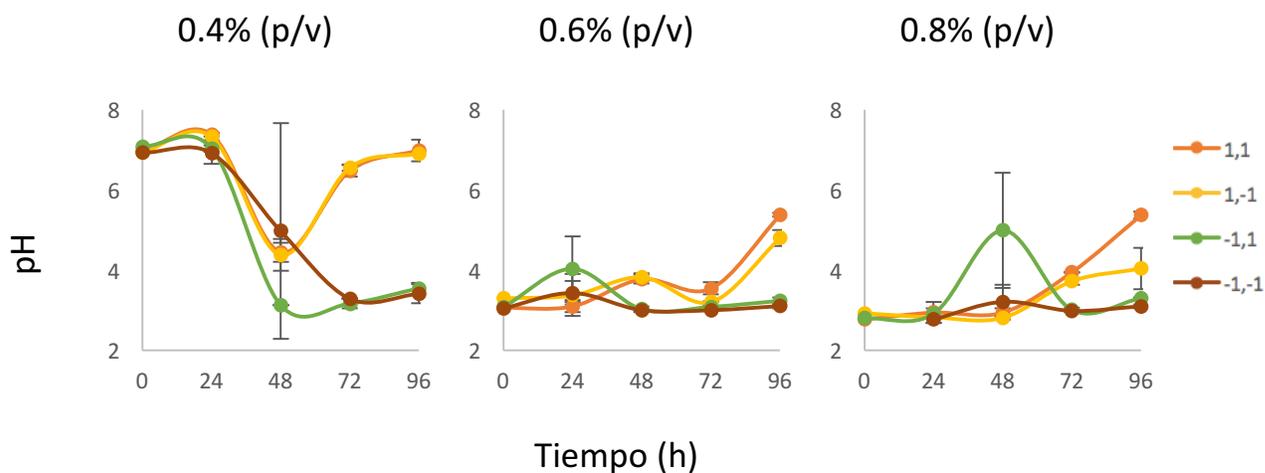


Gráfica 10. Cinéticas de consumo de glucosa de los cultivos de *A. brasiliensis* en medios a donde se adicionó 0.4, 0.6 y 0.8 % de H_2SO_4 de *A. Brasiliensis* hasta las 96 horas. Concentración de nutrientes: 1,1 (Alta-Alta); 1,-1 (Alta-Baja); -1,1 (Baja-Alta); -1,-1 (Baja-Baja).

Lo anterior pudo deberse al aumento de tiempo de la fase lag provocada por el descenso del pH. Para las tres concentraciones de H_2SO_4 se observó un mayor consumo de glucosa

en los medios con mayor concentración de macronutrientes. A continuación se presentan las cinéticas de pH para las condiciones evaluadas en las FES (Gráfica 11).

Para la concentración de 0.4% de H₂SO₄ se observa un pH inicial de 7 para las cuatro relaciones de nutrientes, este amortiguamiento en el pH se debe a la interacción agrolita-medio provocado por algún nutriente en éste (véase anexos). A las 48 horas de cultivo el pH disminuye en las cuatro relaciones de nutrientes, debido al aumento en la concentración de ácidos orgánicos en el medio. Soccol y col. (2006) reportaron que el pH disminuye por la producción de ácido cítrico en FES. Por otro lado, en la Gráfica 11 se observa que en los medios con altas concentraciones de macronutrientes, el pH aumentó hasta las 96 horas, provocado por el consumo de los ácidos orgánicos en el medio. Para los cultivos con bajas concentraciones de micronutrientes se observa que el pH se mantuvo en 3 hasta las 96 horas, este mantenimiento de un pH ácido pudo deberse al consumo parcial de la glucosa y el bajo consumo de ácidos orgánicos en el medio.

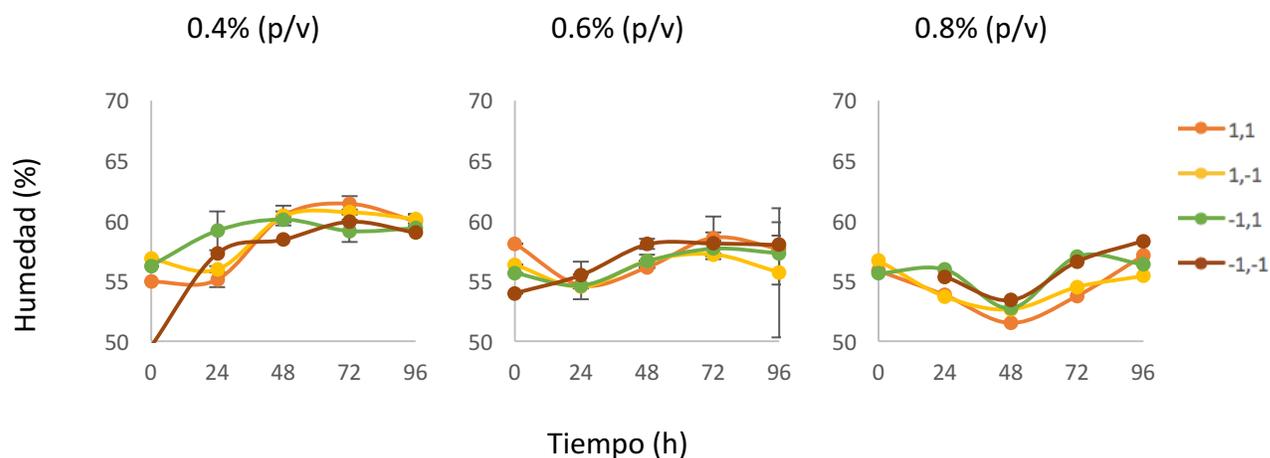


Gráfica 11. Cinéticas de pH de los cultivos de *A. brasiliensis* en medios a donde se adicionó 0.4, 0.6 y 0.8 % de H₂SO₄. Concentración de nutrientes: 1,1 (Alta-Alta); 1,-1 (Alta-Baja); -1,1 (Baja-Alta); -1,-1 (Baja-Baja).

En la concentración 0.6% de H₂SO₄ se observa un pH inicial de 3 para todas las relaciones de nutrientes. Este pH inicial es adecuado, de acuerdo a lo reportado, para la producción de ácido cítrico, la cual se favorece a un pH entre 2.5 a 3.5 (Papagianni, 2007; Max y col, 2010). Grewal y col. (1995) mencionaron que la producción de ácido cítrico e inhibición de la producción de ácido oxálico y ácido glucónico, es provocado por la inhibición parcial de enzimas encargadas de la síntesis estos productos, provocando un desacoplamiento del

CAT. El pH se mantuvo alrededor de 3 para las cuatro relaciones de nutrientes hasta las 72 horas de cultivo. En los medios con altas concentraciones de macronutrientes se observó un aumento de pH a las 96 horas. Esto pudo deberse al agotamiento de glucosa, provocando el consumo de ácido cítrico (Soccol y col., 2006) y posteriormente, el aumento del pH. Los medios con baja concentración de macronutrientes, se mantuvieron en 3 hasta las 96 horas.

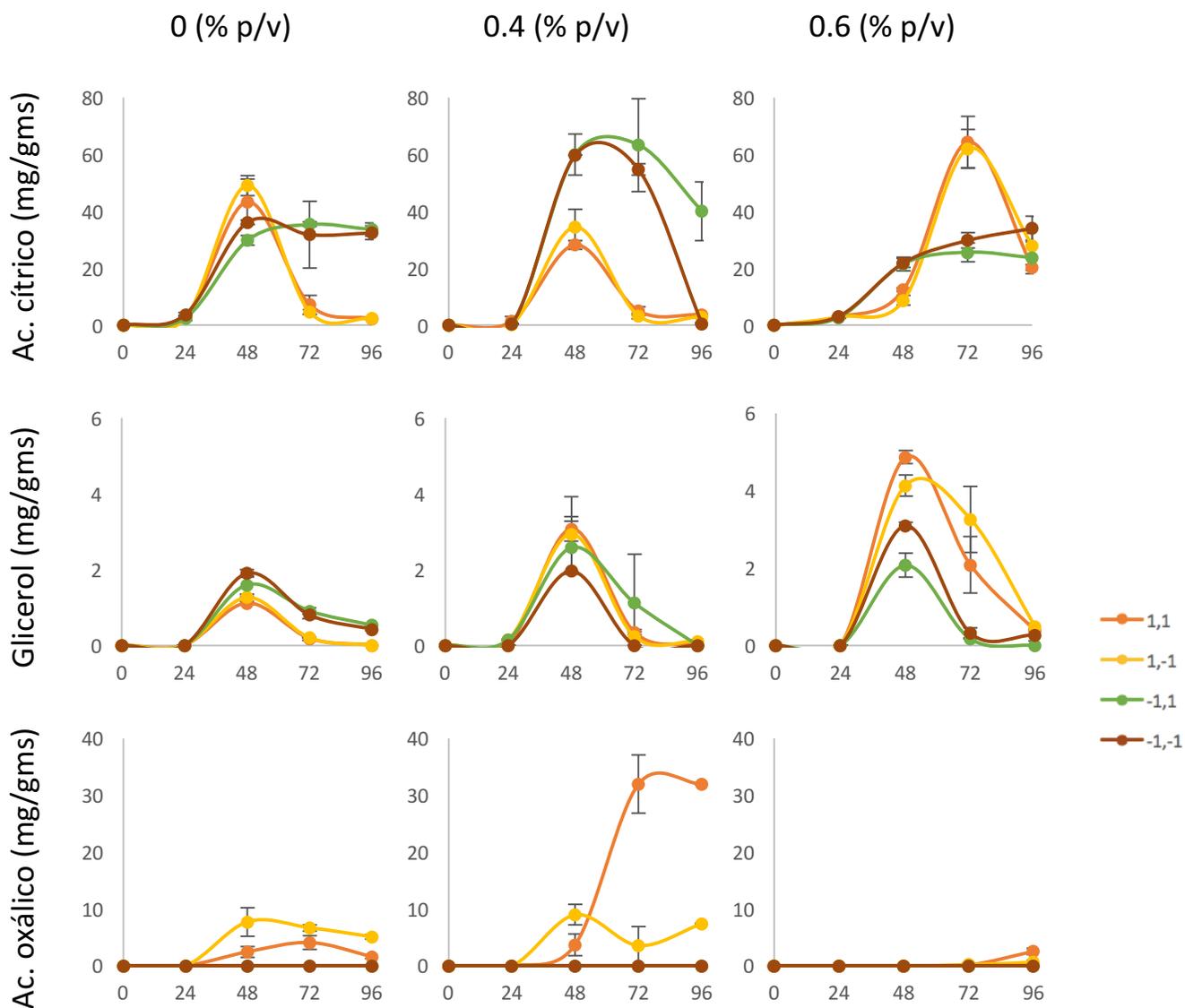
En la concentración de 0.8% de H_2SO_4 , se muestra un pH menor a 3 para las cuatro relaciones de nutrientes, el pH en los medios con altas concentraciones de macronutrientes, se mantuvo constante hasta las 48 horas de cultivo. A partir de ese tiempo subió hasta alcanzar valores entre 4 y 5 al finalizar el cultivo. Para los medios con bajas concentraciones de macronutrientes, se observaron distintos perfiles de pH. Esta variación en los perfiles pudo deberse a un problema de homogenización en el momento de distribuir el medio en el soporte; sin embargo, los dos presentaron un pH a las 96 horas de 3. Este ligero cambio en el pH pudo deberse a un bajo crecimiento del hongo sobre el soporte. Por otro lado, se calculó la humedad del medio, como se muestra a continuación (Gráfica 12).

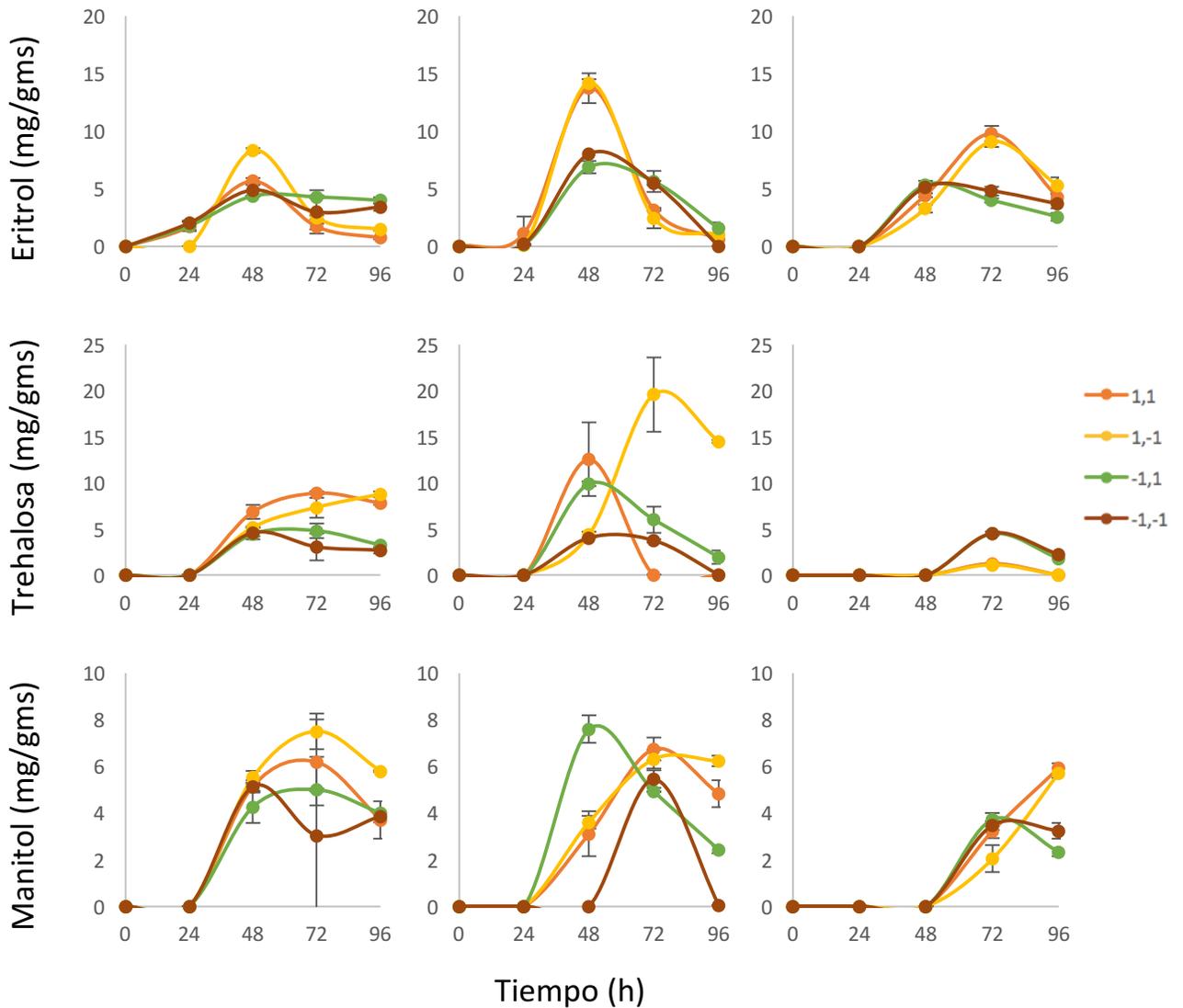


Gráfica 12. Cinéticas de humedad de los cultivos de *A. brasiliensis* en medios a donde se adicionó 0.4, 0.6 y 0.8 % de H_2SO_4 . Concentración de nutrientes: 1,1 (Alta-Alta); 1,-1 (Alta-Baja); -1,1 (Baja-Alta); -1,-1 (Baja-Baja).

La humedad se mantuvo constante para todos los cultivos evaluados, por lo tanto se puede afirmar que la relación de nutrientes y la concentración de ácido sulfúrico en el medio, no afectó la pérdida de humedad.

En la Gráfica 13 se presentan las concentraciones de ácidos orgánicos, polioles y azúcares en todos los medios evaluados. Se presentan la producción de metabolitos (filas) con base en la relación de nutrientes utilizada y la concentración de H₂SO₄ (columnas). En la gráfica 13 se presentan los resultados obtenidos en la sección 7.2, las cuales se denominarán “0% (p/v)”, debido a que es necesario para esta sección comparar la producción de metabolitos en FES con y en ausencia de H₂SO₄, para determinar el efecto de este factor.





Gráfica 13. Efecto de la concentración de ácido sulfúrico (columnas) con distintas relaciones de nutrientes (filas) sobre la producción de ácido cítrico, ácido oxálico, eritrol, manitol, trehalosa y glicerol durante las FES de *A. brasiliensis*. Concentración de nutrientes: 1,1 (Alta-Alta); 1,-1 (Alta-Baja); -1,1 (Baja-Alta); -1,-1 (Baja-Baja).

Se puede observar que, al disminuir el pH del medio (Gráfica 11) aumentó la producción de ácido cítrico (Gráfica 13). El ácido cítrico comienza a producirse a las 24 horas, con excepción de los cultivos con 0.6% de H₂SO₄, en donde se comienza a producir a las 48 horas, esto puede ser provocado por la disminución del pH del medio. A concentraciones de 0.4 y 0.6% de H₂SO₄ en el medio hubo una mayor acumulación de ácido cítrico; sin embargo, al comparar estas dos condiciones, se observa que no es la misma relación de nutrientes la

que favoreció la producción de ácido cítrico, siendo la relación -1,1, la que favoreció a 0.4% de H₂SO₄ y 1,1 a 0.6% de H₂SO₄.

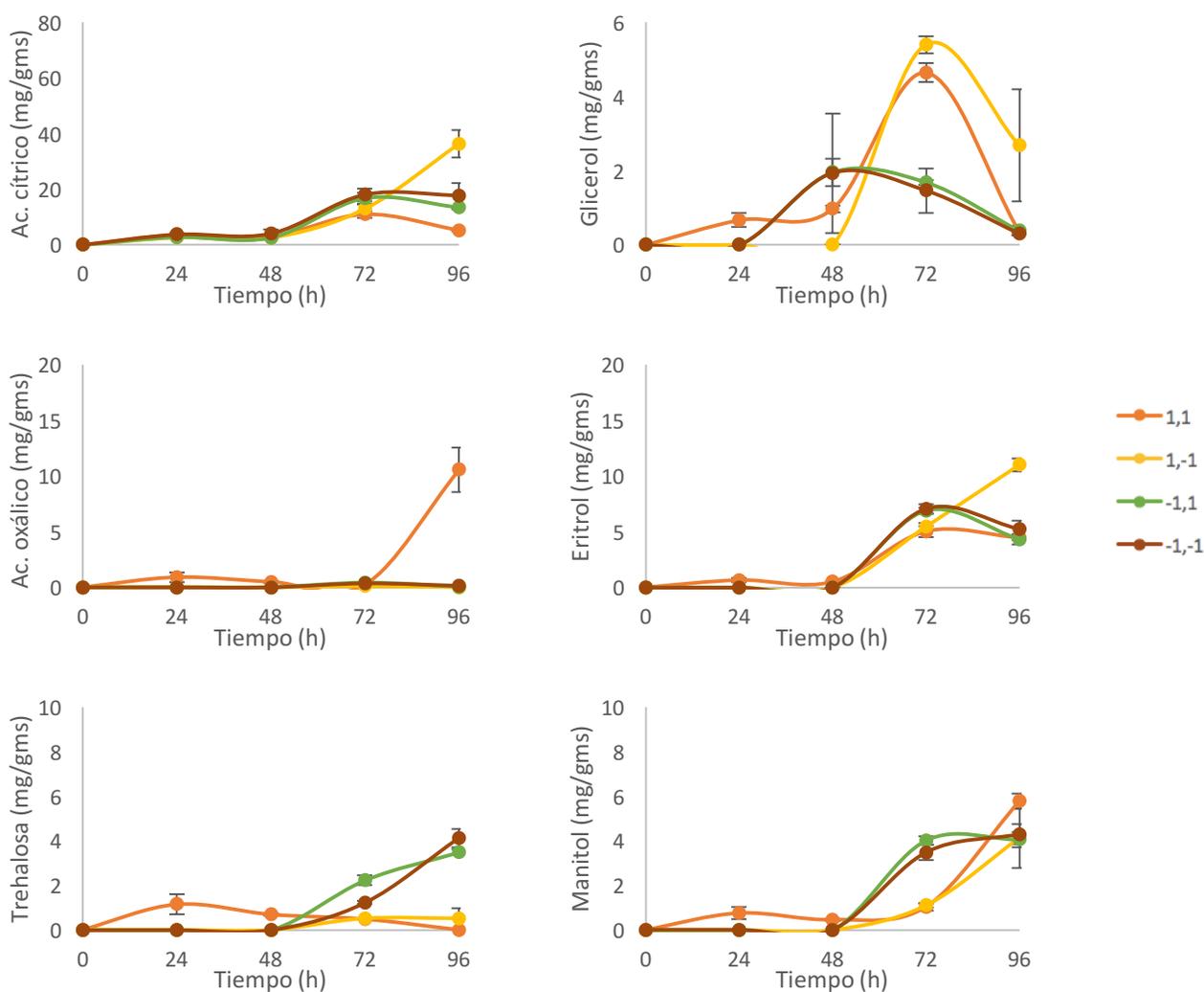
Con respecto a la producción de glicerol, se muestra que la máxima producción se alcanzó a las 48 horas de cultivo independientemente de la relación de nutrientes utilizada. El incremento en la concentración de H₂SO₄ favoreció la producción de glicerol. Esto pudo deberse al incremento de la producción de ácido cítrico (Legisa & Matthey; 1989; Diano y col., 2009). En relación con algunos antecedentes, se intentó relacionar la acumulación de ácido cítrico con la biosíntesis de glicerol. De acuerdo a lo descrito anteriormente para los medios con concentraciones de 0 y 0.4% de H₂SO₄, la máxima producción de ácido cítrico y glicerol se alcanzó a las 48 horas independientemente de la relación de nutrientes, esto no coincidió con lo reportado por Legisa y col (1989); ya que ellos encontraron que en el inicio del cultivo, el metabolismo del hongo se dirige a la ruta HMP y la síntesis de glicerol funciona para reoxidar el excedente de NADPH⁺H⁺ generado por su funcionamiento. La concentración intracelular de glicerol que se alcanza es capaz de inhibir a la isocitrato-deshidrogenasa (ICDH) y el citrato empieza a acumularse dentro de la célula. Al mismo tiempo el citrato inhibe a la 6 fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH), con lo que se detiene el metabolismo vía HMP y se activa el funcionamiento de la EMP, suspendiendo la biosíntesis del glicerol. La producción de citrato inicia lentamente, pero se incrementa a medida que el glicerol se consume. Con este antecedente podemos observar que este comportamiento sólo se presenta cuando la concentración de H₂SO₄ es de 0.6%, debido a que el ácido cítrico se empezó a producir una vez que el glicerol se consumió. Para la producción de ácido oxálico, se observó que se produjo sólo en los medios con relaciones de macronutrientes altos; sin embargo, la máxima producción de oxálico (32 mg/gms) se alcanzó con una concentración de H₂SO₄ de 0.4%. Esto pudo deberse a que la enzima encargada de la síntesis del ácido oxálico, la oxalacetato acetil-hidrolasa (OAH) es sensible a cambios de pH en el medio (Diano y col, 2009). Se ha reportado que la actividad de OAH disminuye en un 50% cuando el pH baja de 7.5 a 6.5 (Ruijter y col, 1999), lo cual coincide con lo observado en la Gráfica 11, debido a que los cultivos que tienen un pH inicial de 7

son los que tienen una concentración de H_2SO_4 de 0.4%, los cultivos con una concentración de 0 y 0.6% de H_2SO_4 tienen un pH inicial de 6.5 y 3 respectivamente. El eritrol es otro importante metabolito que se ha reportado como osmorregulador en hongos que crecen en altas concentraciones de azúcar (Gutiérrez-Rojas, 1995). Para la producción de eritrol, se observó que el aumento de la concentración de H_2SO_4 en el medio no favorece la producción de éste, al encontrar un máximo de producción de 14 mg/gms a una concentración de 0.4% de H_2SO_4 ; sin embargo las relaciones de nutrientes si afectaron la producción de este metabolito, debido a que en los medios con altas concentraciones de macronutrientes, se observó una mayor producción de eritrol, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura con respecto a que en altas concentraciones de macronutrientes, habrá una mayor producción de eritrol (Diano y col., 2006).

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 (Peralta, 1996). En la Gráfica 13 se observa que la producción de trehalosa aumentó, al aumentar la concentración de H_2SO_4 a 0.4% (19.5 mg/gms) sin embargo al aumentar a 0.6% la producción de trehalosa disminuyó (4.5 mg/gms), los medios con altas concentraciones de macronutrientes favorecen la producción de trehalosa para los medios con concentraciones de 0 y 0.4% de H_2SO_4 . El rápido consumo de trehalosa después de las 72 horas pudo, deberse a la escasez de fuente de carbono en el medio provocando el consumo de carbohidratos (Peralta, 1996).

El manitol es un poliol que se produce en la vía HMP por una enzima llamada manitol-1-fosfato deshidrogenasa, esta enzima ayuda a la reoxidar el NADH, cuando la cadena final de electrones se encuentra limitada en oxígeno (Diano y col., 2009). En la Gráfica 13 se muestra la producción de manitol en donde se observan perfiles similares para las tres concentraciones de H_2SO_4 , sin embargo para la concentración de 0.6% de H_2SO_4 , la producción disminuyó (5.7 mg/gms), y siendo alcanzada a las 96 horas de cultivo, para 0 y 0.4% de H_2SO_4 . Las producciones máximas de manitol (7.5 mg/gms) fueron encontradas entre las 48 y 72 horas. Esto pudo deberse a que la fase de adaptación del hongo se

prolongó más, entre mayor fue la concentración de H_2SO_4 , provocando que se haya alcanzado la mayor producción de manitol en mayor tiempo. Con respecto a las relaciones de nutrientes, se observa que los medios con altas concentraciones de macronutrientes, la concentración de manitol es mantenida hasta las 96 horas de cultivo, esto puede deberse a que el hongo utiliza al manitol como una fuente de reserva de energía. A continuación se muestra la gráfica de producción de metabolitos con una concentración de 0.8% de H_2SO_4 , debido a las bajas producciones obtenidas no se comparó con las 3 concentraciones de H_2SO_4 presentadas anteriormente.



Gráfica 14. Efecto de la concentración de ácido sulfúrico al 0.8% y de la relación de nutrientes sobre la producción de ácido cítrico, ácido oxálico, eritrol, manitol, trehalosa y glicerol durante la FES de *A. brasiliensis*. Concentración de nutrientes: 1,1 (Alta-Alta); 1,-1 (Alta-Baja); -1,1 (Baja-Alta); -1,-1 (Baja-Baja).

En la Gráfica 14 se presentan la producción de metabolitos para los medios conteniendo diferentes relaciones de nutrientes y adicionados con 0.8% de H₂SO₄. Para la producción de ácido cítrico, se observa la mayor producción a las 72 horas (entre 12-18 mg/gms) con excepción del medio con una alta concentración de macronutrientes y una baja de micronutrientes (1,-1), en donde se alcanzó la producción máxima de 36 mg/gms a las 96 horas. Los tiempos prolongados para alcanzar las máximas producciones de ácido cítrico pudieron deberse a las altas concentraciones de azúcares, combinadas con los bajos pH del medio durante la FES. En la literatura se ha reportado que un pH menor a 3 puede disminuir la producción de cítrico (Swain y col, 2011) .

Para la producción de glicerol se observa la producción máxima a las 72 horas para los cultivos con altas concentraciones de macronutrientes (5 mg/gms), para los cultivos con bajas concentraciones de macronutrientes la producción máxima (1.9 mg/gms) fue a las 48 horas, esto coincide con lo reportado en la literatura al describir al glicerol como el indicador de la producción de ácido cítrico (Legisa & Matthey, 1989), debido a que la producción máxima de ácido cítrico se encuentra 24 horas antes de encontrar la máxima producción de glicerol todos los cultivos con excepción del medio 1,1.

La producción de ácido oxálico fue inhibida, con excepción de los medios con altas concentraciones de macro y micronutrientes (1,1). Este hecho no coincide con lo reportado por Diano y col. (2009) debido a que, la enzima encargada de la síntesis de ácido oxálico, la oxalacetato acetil-hidrolasa (OAH) es sensible a cambios de pH en el medio, sin embargo, el medio 1,1 a las 96 horas de cultivo presento un pH de 5.3, lo cual podría activar la OAH (Ruijter y col, 1999) y, alcanzar la producción máxima de ácido oxálico (10.5 mg/gms).

Para la producción del eritrol, se observa que la producción máxima (5-7 mg/gms), se alcanzó a las 72 horas, con excepción del cultivo 1,-1, en donde se alcanzó a las 96 horas (11 mg/gms). La síntesis de este compuesto osmorregulador pudo deberse al incremento de las

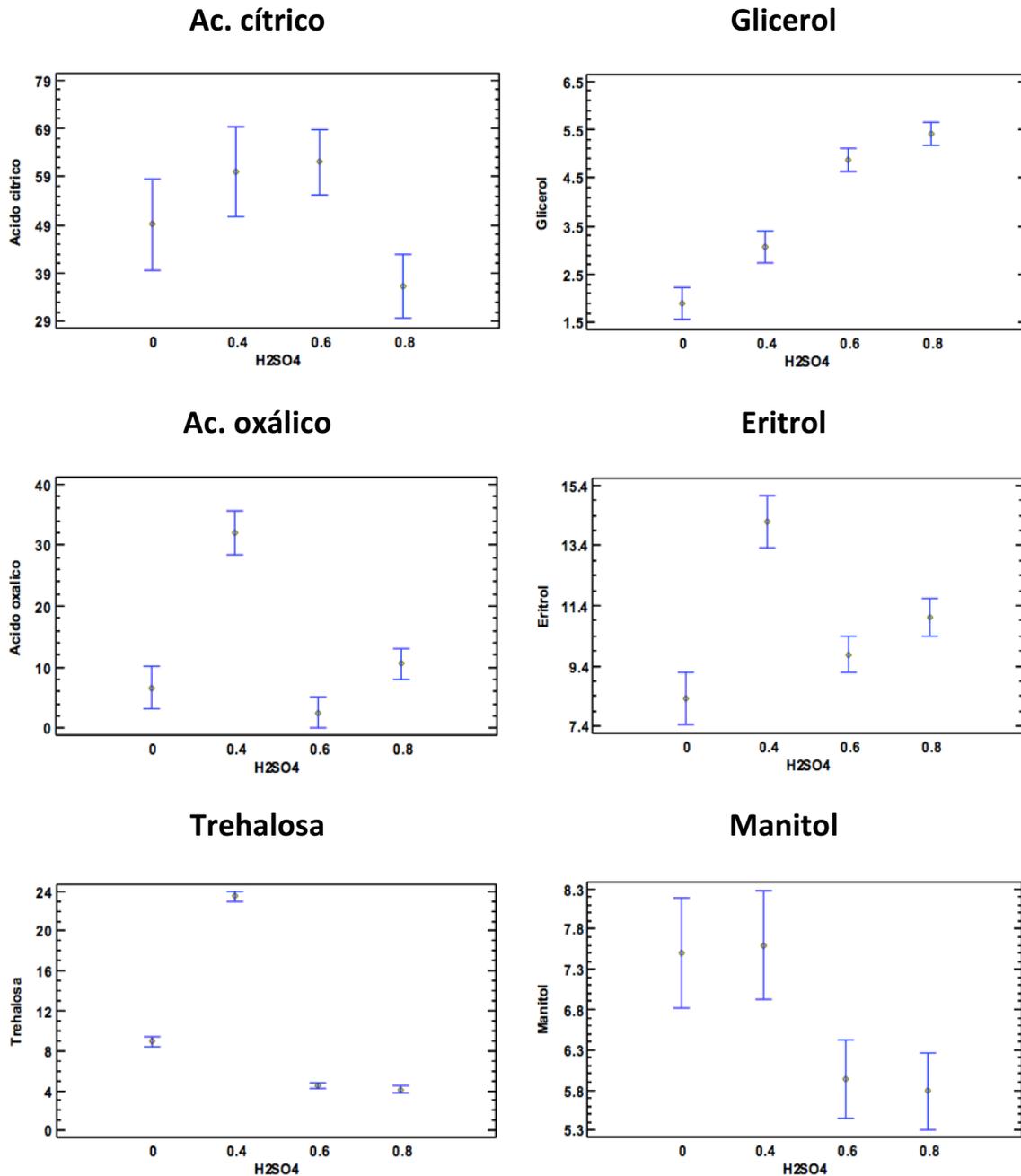
presión osmótica del medio (Córdova-López, 1994;Gutiérrez- Rojas, 1995; Diano y col., 2006).

Con respecto a la producción de trehalosa, se observa que en los medios con concentraciones altas de macronutrientes, no fue producida; y los medios con bajas concentraciones de macronutrientes, alcanzaron producciones de trehalosa (3.5-4 mg/gms) a las 96 horas. Este hecho indica que las concentraciones bajas de fuentes de nitrógeno y de magnesio favorecen la acumulación de este metabolito.

La producción máxima de manitol se obtuvo a las 96 horas para todos los medios de cultivo alcanzando de 4 a 6 mg/gms de manitol. La acumulación de este poliol hasta las 96 horas pudo deberse a los largos tiempos de adaptación de hongo a las condiciones del medio. Con base en los datos obtenidos, se procedió a analizarlos por medio de un software estadístico, para dar claridad del efecto que tiene el H_2SO_4 sobre la producción de metabolitos en FES.

7.3.1 Validación de diseño experimental sobre el efecto de la concentración de ácido sulfúrico sobre la producción de metabolitos

El diseño experimental se analizó con el software STATGRAPHICS Centurion XVI el cual arrojó la gráfica de la prueba de Tukey, teniendo en cuenta que los ANOVA (anexos) de cada metabolito, mostraron que existe diferencia significativa entre los tratamientos con ácido sulfúrico. Se tomaron las producciones máximas de cada metabolito, sin importar la relación de nutrientes utilizada. Esto fue realizado de esta manera, para poder observar el efecto del ácido sulfúrico sobre la producción de los metabolitos analizados. El factor sometido a este diseño fue la concentración de H_2SO_4 (%) en el medio. A continuación se presentan las gráficas de la prueba de Tukey obtenidas a partir de la producciones de ácidos orgánicos y polioles en la FES.



Gráfica 15. Gráficas de la prueba de Tukey con intervalo de confianza al 95% sobre el efecto de la concentración de H_2SO_4 (%) (eje de las abcisas) sobre la producción máxima de ácidos orgánicos y polioles. La concentración de los metabolitos esta dada en mg/gms.

Las producciones de ácido cítrico para las cuatro relaciones de medios, bajo el tratamiento con ácido sulfúrico al 0, 0.4 y 0.6% no son significativamente diferentes; sin embargo, el tratamiento que mostró ser significativamente diferente fue al utilizar al 0.8% de H_2SO_4 . El

tratamiento sin H_2SO_4 (0%) no mostró ser diferente al de 0.8% por consiguiente, no se observó un claro efecto del H_2SO_4 . Para la producción de glicerol, se observa que todos los tratamientos fueron significativamente diferentes, mostrando la tendencia a aumentar entre mayor fue la concentración de H_2SO_4 en el medio. Lo cual puede significar que el H_2SO_4 hace más activa la ruta metabólica encargada de la producción de glicerol (Legisa & Matthey., 1989). En la gráfica de ácido oxálico se observa que el tratamiento con 0.4% de H_2SO_4 , fue significativamente diferente. Esto posiblemente se debió a que el pH inicial con este tratamiento fue el más alto, debido a la capacidad amortiguadora del medio sólido (ver anexos). La enzima encargada de la síntesis de ácido oxálico, la oxalacetato acetil-hidrolasa (OAH), es sensible a cambios de pH en el medio (Diano y col., 2009); por esta razón, la adición de 0.6 y 0.8% de H_2SO_4 , posiblemente conlleva a una menor producción de ácido oxálico. Con respecto a la producción de eritrol, se observa que en el tratamiento con 0.4% de H_2SO_4 fue donde se encontró la mayor producción de eritrol. Esto también pudo deberse al pH inicial del cultivo. Con este tratamiento, el cultivo inició con un pH de 7, lo que haría más activa a la eritrosa reductasa, encargada de la síntesis de eritrol (Diano y col., 2009). Para la producción de trehalosa, se observa que los tratamientos con H_2SO_4 fueron significativamente diferentes, teniendo la mayor producción (24 mg/gms) con el tratamiento de 0.4% de H_2SO_4 . Al aumentar la concentración de H_2SO_4 , no se encontró diferencias significativas entre los tratamientos con 0.6 y 0.8% de H_2SO_4 , en donde la producción fue de 5 mg/gms de este metabolito. Por último para la producción de manitol se observan diferencias significativas entre los tratamientos con mayor concentración de ácido (0.6 y 0.8%) contra los que tienen una menor concentración de ácido (0 y 0.4%). Aunque no existen reportes del efecto del pH sobre la producción de manitol, estas diferencias podrían deberse a que bajos pH en el medio, provocan cierta inhibición de la manitol-1-fosfato deshidrogenasa, encargada de la síntesis de manitol (Diano y col., 2006).

7.3.2 Conclusiones parciales

La adición de H_2SO_4 a los medios de cultivo que serían absorbidos en el soporte, mostró ser un método sencillo para ajustar el pH inicial de un proceso de FES. El aumento de la concentración de H_2SO_4 en el medio sólido influencia la producción de metabolitos. La concentración de 0.4% de H_2SO_4 favoreció la producción de los metabolitos, con excepción del ácido cítrico y el glicerol.

No hubo diferencias significativas en la producción de ácido cítrico cuando aumentó la concentración de H_2SO_4 . La producción de glicerol aumentó entre mayor fue la concentración de H_2SO_4 en el medio.

8. Conclusiones

Las conclusiones finales de este trabajo son las siguientes:

- ❖ En cultivos con altas concentraciones de glucosa, el metabolismo de *A. brasiliensis* en medios balanceados está dirigido a la producción de polioles y en desbalanceados a ácidos orgánicos.
- ❖ Las altas tasas de aireación en los cultivos sólidos favorecieron la producción de CO_2 y ácidos orgánicos, y las bajas tasas de aireación en cultivos sólidos favorecieron la producción de polioles. El aumento de la tasa de aireación provocó un menor consumo de sustrato durante los cultivos.
- ❖ Altas concentraciones de macronutrientes en el medio, favorecieron la producción de metabolitos. La relación de nutrientes que favoreció la producción de metabolitos (con excepción de glicerol) fue una alta concentración de macronutrientes combinada con una baja concentración de micronutrientes (1,-1).
- ❖ La adición de H_2SO_4 en los medios de cultivo, influenció la producción de los metabolitos. Los medios de cultivos adicionados con una concentración de 0.4% de H_2SO_4 favorecieron la producción de ácido oxálico, eritrol, trehalosa y manitol.

9. Bibliografía

1. Canada, E. (2014). Draft Screening Assessment for *Aspergillus awawori* ATCC 22342 and *Aspergillus brasiliensis* ATCC 9642. *Draft Screening Assessment* , 7-9.
2. Legisa, M. (1988). Citrate regulation of the change in carbohydrate degradation during the initial phase of the citric acid production by *Aspergillus niger* . *Enzyme Microb. Technol.*(10), 33-36.
3. Legisa, M., & Matthey. (1989). Initiation of citric acid accumulation in the aerly stages of *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 453-457.
4. Cox, N. (2009). *Lehninger "Principios de bioquímica"*. Barcelona: W.H Freeman and Company.
5. Córdova-López, J. (1994). Efecto de la concentración de glucosa en el crecimiento y la producción de ácido cítrico en *Aspergillus niger* por fermentación en estado sólido. *Tesiunamí*, 1-90.
6. Aido, K. (1982). Solid State Fermentation. *Adv. Microbiol*(28), 201-237.
7. Bloomberg, A. (1992). Physiology of osmotolerance in fungi. *Advances Microbial Physiology* (33), 145-212.
8. Barrios-González , J., & Mejía, A. (1996). Production of secondary metabolites by solid-state fermentation. *Biotechnology Annual Review*(2), 85-121.
9. Beaudin, N., Caron, R., Legros, R., Ramsay, J., Lawlor, L., & Ramsay , B. (1996). Co-composting of weathered hydrocarbon-contaminated soil. *Compost Sci. Util.*, 37-45.
10. Bizukojc, M., & Ledakowicz, S. (2004). The kinetics of simultaneous glucose and fructose uptake and product formation by *Aspergillus niger* in citric acid fermentation. *Process biochemistry*(39), 2261-2268.
11. Boyer, R. (2000). *Conceptos de bioquímica*. México: THOMSON editores.
12. Brandao, R. (1990). Regulation of sugar transport systems in *Fusarium oxysporum* var. *Appl. Environ. Microbiol.*(56), 2417-2420.

13. Diano, A., Peeters, J., Dynesen, J., & Nielsen, J. (2009). Physiology of *Aspergillus niger* in oxygen-limited continuous cultures: influence of aeration, carbon source concentration and dilution rate. *Biotechnology and bioengineering*(103), 956-965.
14. Diano, S. (2006). Polyol synthesis in *Aspergillus niger*: Influence of oxygen availability, carbon and nitrogen sources on the metabolism. *Wiley InterScience*, DOI: 10.1002/bit.20915.
15. Dijkema, C., Kester, H., & Visser, J. (1985). ¹³C NMR studies of carbon metabolism in the hyphal fungus *Aspergillus nidulans*. *Proc Nat Acad Sci USA*, 82, 14-18.
16. Grewal, H., & Kalra, K. (1995). Fungal production of citric acid. *Biotechnology advances* (2), 209-234.
17. Gutiérrez-Rojas, M., Amar Aboul Hosn, S., Auria, R., Revah, S., & Favela-Torres, E. (1996). Heat transfer in citric acid production by solid state fermentation. *Process Biochemistry*(4), 363-369.
18. Gutiérrez-Rojas, M. (1995). Citric acid and polyols production by *Aspergillus niger* at high glucose concentration in solid state fermentation on inert support. *Biotechnol. Lett.*(17), 219-224.
19. Hondmann, D. (1991). Glycerol catabolism in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.*(137), 629-636.
20. Juárez-Cárdenas, I. (2015). Fisiología de crecimiento de *Aspergillus niger* en fermentación en medio sólido con soportes inertes. *Tesi uami*, 24-27.
21. Kitos, P. A. (1953). Influence of temperature on the trace element requirements for citric acid production by *Aspergillus niger*. *Applied microbiology*, (1953): 156.
22. Kubicek, C. (1985). Aconitase and citric fermentation by *Aspergillus niger*. *Appl. Envir. Microbiol.*(5), 1136-1138.
23. Kubicek, C., Zehentgruber, O., Housam, E., & Röhr, M. (1980). Regulation of citric acid production by oxygen: Effect of dissolved oxygen tension on adenylate levels

- and respiration in *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101-115.
24. Martínez-Ruiz, A. (2005). Hidrólisis de sacarosa en un reactor de lecho empacado con invertasa y *Aspergillus niger* inmovilizados en el medio de cultivo sólido. *Tesiuami*, 28-29.
 25. Martinko, J. (2009). *Brock, Biología de los Microorganismos* (12 ed.). UK: Pearson Education.
 26. Max, B. (2010). Biotechnological production of citric acid. *Brazilian Journal of Microbiology*(41), 862-875.
 27. Max, B., Salgado, J., Rodriguez, N., Cortes, S., Converti, A., & Dominguez, J. (2010). Biotechnological production of citric acid. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 862-875.
 28. Meijer, M. (2011). Growth and hydrolase profiles can be used as characteristics to distinguish *Aspergillus niger* and other black *Aspergilli*. *Stud. Mycol*(69), 19-30.
 29. Meixener, O. (1985). Effect of manganese deficiency on plasma membrane lipid composition and glucose uptake in *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiol. Lett*(26), 271-274.
 30. Mitchell, D. (2000). Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* (68), 65-135.
 31. Modig, T., Liden, G., & Taherzadeh, M. (2002). Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. *Biochem. J.*, 769-776.
 32. Moo-Young, M. M. (1983). Principles of solid substrate fermentation. *The filamentous fungi*(4), 171-188.
 33. Moo-Young, M. Y. (1992). Fermentative conversion of cellulosic substrates to microbial protein by *Neurospora sitophila*. *Biotechnol. Lett.*(9), 863-868.

34. Ooijkaas, L. (2000). Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. *Elsevier Science*(18), 356-360.
35. Pandey, A. (1992). Recent process developments in solid state fermentation . *Process Biochemistry*(27), 109-117.
36. Pandey, A. (1996). Special issue on solid state fermentation. *Journal of Scientific & Industrial Research*(55), 311-312.
37. Papagianni, M. (2007). Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger* : Biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnology Advances*, 25, 244-263.
38. Peralta, R. (1996). *Efecto de los iones metalicos en la producción de ácido cítrico por Aspergillus niger cultivado en medio sólido*. México, D.F: TESIAMI.
39. Pirt, S. (1975). Parameters of growth and analysis of growth data. *Principles of Microbe and Cell Cultivation*(27), 109-117.
40. Raimbault, M. (1998). General and microbiological aspects of solid substrate fermentation . *Electronical Journal of Biotechnology*(1), 3-5.
41. Rodrigues, C., Vandenbergue, L., Sturn, W., Dergint, E., Spier, M., Carvalho, J., & Soccol, C. (2013). Effect of forced aeration on citric acid production by *Aspergillus sp.* mutants in SSF. *World J Microbiol Bitechnol*(29), 2317-2324.
42. Romero-Gómez, S. J.-G. (2000). Invertase production by *Aspergillus niger* in sumerged and solid state fermentation system: Conidiophores of *Trichoderma harzianum*. *Biotechnology Techniques*(5), 415-420.
43. Ruijter, G. (2003). Mannitol is required for stress tolerance in *Aspergillus niger* condiospores. *Eukaryot Cell* (2), 690-698.
44. Ruijter, G., Van de Vondervoort, P., & Visser, J. (1999). Oxalic acid production by *Aspergillus niger*: An oxalate-non-producing mutant produces citric acid at pH 5 and in presence of manganese. *Microbiology* 145, 2569-2576.

45. Sánchez-Soto , J. (2001). Efecto de la composición del medio de cultivo en el metabolismo de *Aspergillus niger* 10 en fermentación en estado sólido. *Tesiuami*, 1-42.
46. Soccol, C., Vandenbergue, L., Rodrigues, C., & Pandey, A. (2006). New perspectives for citric acid production and application. *Food Technol. Botechnol.*, 141-149.
47. Swain, Ramesh, & Jayanta. (2011). Citric acid: Microbial Production and Applications in food and pharmaceutical industries. *Nova Science Publishers, Inc*, 1-22.
48. Vandenberghe , L. P., Soccol , C. R., Pandey , A., & Lebeault , J.-M. (2000). Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*(74), 175-178.
49. Vandenberghe, L., Soccol , C., Prado , F., & Pandey, A. (2004). Comparison of Citric Acid Production by Solid-State Fermentation in Flask, Column, Tray, and Drum Bioreactors. *Humana Press Inc.*, 273-293.
50. Vandenbergue, L. (2000). *Development of process for citric acid production by solid-state fermentation using cassava agroindustrial residues*. France: Université de Technologie de Compiègne, Compiègne.
51. Volke-Sepulveda, T., Gutierrez-Rojas, M., & Favela-Torres, E. (2003). Biodegradation of hexadecane in liquid and solid state fermentations by *Aspergillus niger*. *Bioresource technology*, 81-86.
52. Voet, D. (2007). *Fundamentos de Bioquímica*. Nueva York: Panamericana.
53. Wang, Y. a. (1995). Effect of temperature on scleroglucan synthesis and organic acid production by *Sclerotium gluconicum*. *Enzyme and microbial technology*, 893-899.
54. Zhao, S. D. (2008). Cost-effective production of *Bacillus licheniformis* using simple netting bag solid bioreactor. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2859-2863.

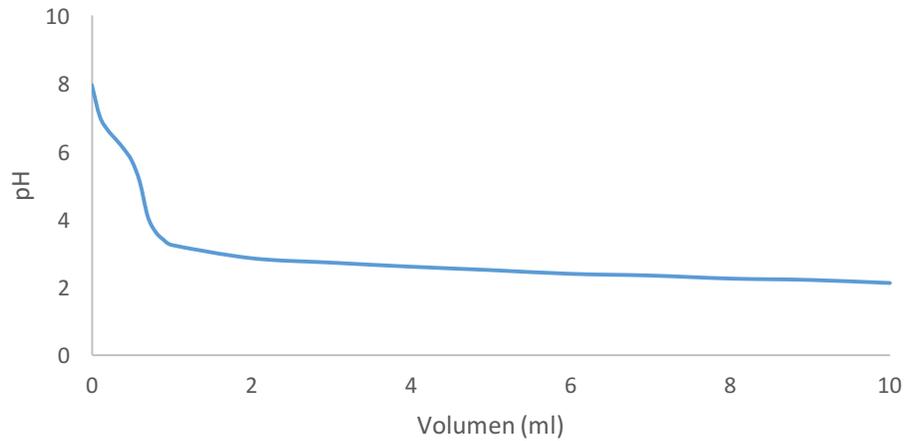
Referencia de patente

1. Patente 336733, IMPI, 2013. Sistema de respirometría con administración remota para el monitoreo en línea de la concentración de CO₂ y O₂ y flujo de los gases de salida en procesos biológicos. Cuyos inventores son Jesús Gerardo Saucedo Castañeda, Ernesto Favela Torres, Gustavo Viniegra González, María Teresa Torres Mancera, Arturo Alejandro Figueroa Montero y Gabriel Rosales Zamora.

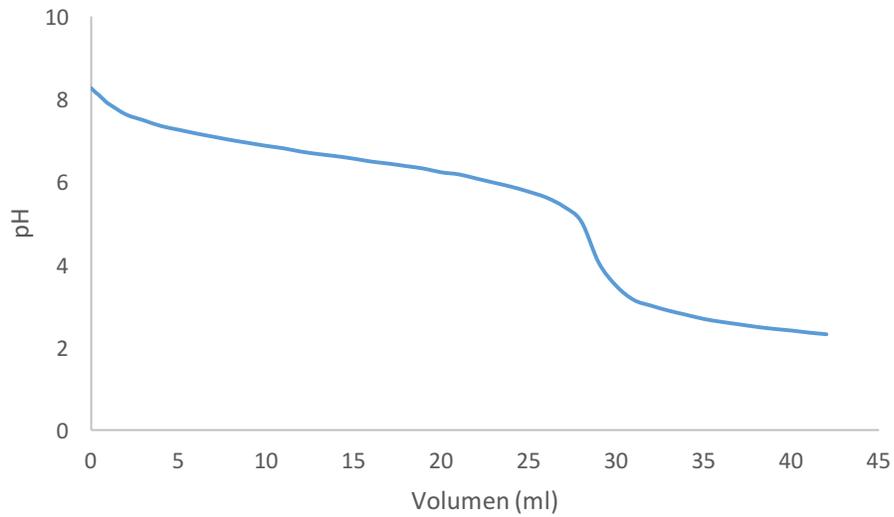
10. Anexos

Anexo A. Titulación del soporte (agrolita) con una solución de ácido sulfúrico al 0.05 M.

Gráfica A1. Titulación del soporte con agua



Gráfica A2. Titulación del soporte con el medio de cultivo (Sánchez-Soto, 2001).



Anexo B. Tablas de ANOVA sobre el efecto del ácido sulfúrico sobre la producción de metabolitos

ANOVA B1. Efecto de la concentración de ácido sulfúrico sobre la producción de ácido oxálico. Un valor de P menor a 0.05 demuestra indica que existe una diferencia significativa.

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Between groups	1208.08	3	402.694	81.44	0.0000
Within groups	39.5581	8	4.94477		
Total (Corr.)	1247.64	11			

ANOVA B2. Efecto de la concentración de ácido sulfúrico sobre la producción de Trehalosa. Un valor de P menor a 0.05 demuestra indica que existe una diferencia significativa.

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Between groups	588.18	3	196.06	2331.54	0.0000
Within groups	0.672722	8	0.0840903		
Total (Corr.)	588.853	11			

ANOVA B3. Efecto de la concentración de ácido sulfúrico sobre la producción de ácido cítrico. Un valor de P menor a 0.05 demuestra indica que existe una diferencia significativa.

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Between groups	1518.04	3	506.013	14.63	0.0013
Within groups	276.784	8	34.598		
Total (Corr.)	1794.82	11			

ANOVA B4. Efecto de la concentración de ácido sulfúrico sobre la producción de Manitol. Un valor de P menor a 0.05 demuestra indica que existe una diferencia significativa.

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Between groups	7.6546	3	2.55153	14.23	0.0014
Within groups	1.43491	8	0.179364		
Total (Corr.)	9.08951	11			

ANOVA B5. Efecto de la concentración de ácido sulfúrico sobre la producción de Eritrol. Un valor de P menor a 0.05 demuestra indica que existe una diferencia significativa.

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Between groups	39.1547	3	13.0516	43.64	0.0000
Within groups	2.39239	8	0.299049		
Total (Corr.)	41.5471	11			

ANOVA B6. Efecto de la concentración de ácido sulfúrico sobre la producción de Glicerol.

Un valor de P menor a 0.05 demuestra indica que existe una diferencia significativa.

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Between groups	20.5951	3	6.86505	156.76	0.0000
Within groups	0.350337	8	0.0437922		
Total (Corr.)	20.9455	11			