

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

IZTAPALAPA

**CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA**

T E S I S

para obtener el grado de
MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

**EFFECTO DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO EN
EL METABOLISMO DE *ASPERGILLUS niger 10* EN
FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO.**

POR

JUAN MANUEL SÁNCHEZ SOTO
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

DIRECTOR DE TESIS
Dr. ERNESTO FAVELA TORRES

ASESOR DE TESIS
Dr. MARIANO GUTIÉRREZ ROJAS

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

EFFECTO DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO EN EL
METABOLISMO DE *ASPERGILLUS niger 10* EN FERMENTACIÓN EN ESTADO
SÓLIDO.

Que presentó

Juan Manuel Sánchez Soto.

Director: Dr. Ernesto Favela Torres

Asesor: Dr. Mariano Gutiérrez Rojas

Jurado:

Presidente: Dr. Mariano Gutiérrez Rojas

Secretario: Dr. Sergio Huerta Ochoa

Sinodal: Dr. Cristóbal Noe Aguilar González

Sinodal: Dr. Jorge Gracida Rodríguez

Indice

Resumen	4
1. Introducción	5
2. Revisión bibliográfica	7
2.1. Fermentación en estado sólido (FES)	7
2.1.1. Ventajas y desventajas	8
2.1.2. Clasificación	9
2.2. Nutrientes del medio de cultivo	12
2.2.1. Fuente de carbono	13
2.2.2. Fuente de nitrógeno	14
1.2.3 Iones metálicos	15
2.3. Metabolismo	19
3. Objetivos	22
3.1. Objetivo general	22
3.2. Objetivos particulares	22
4. Materiales y métodos	23
4.1. El microorganismo aislamiento y conservación	23
4.2. Medio de cultivo para FES	23
4.2.1. Evaluación del consumo de glucosa en poliuretano	23
4.2.2. Medios para la producción de esporas	24
4.3. Cosecha de esporas	25
4.4. Conteo de esporas	25
4.5. Estimación de biomasa	25
4.6. Soporte	26
4.7. Inoculación	26
4.8. Columnas	27
4.9. Métodos analíticos	28
4.9.1. Humedad	28
4.9.2. pH	28

4.9.3. Cuantificación de biomasa	28
4.9.4. Cuantificación de carbohidratos, polioles y ácidos Orgánicos	29
5. Resultados y discusión	30
5.1. Efecto de la concentración inicial de glucosa en medios de cultivos balanceados	30
5.2. Efecto de la limitación de N, Fe y Mg sobre el consumo de glucosa y la producción de metabolitos	36
5.3. Efecto de la limitación de Fe y Mg sobre el consumo de glucosa y la producción de metabolitos	36
6. Conclusiones	42
7. Referencias	43

RESUMEN

En este trabajo se estudiaron los patrones de producción de ácido cítrico por *Aspergillus niger* 10 en fermentación en estado sólido (FES) utilizando espuma de poliuretano (PUF) como soporte. Los resultados obtenidos demuestran que la acumulación de ácido cítrico en FES no depende de la presencia del glicerol producido en la fermentación, sino de la concentración de glucosa e iones bivalentes; particularmente, de la concentración de hierro y magnesio presentes en el medio de cultivo, lo que implica que la inhibición de la enzima isocitrato–deshidrogenasa NADP-dependiente por glicerol, no es la causante de la producción y acumulación de ácido cítrico; pero al parecer en altas concentraciones de hierro y magnesio esta inhibición si se presenta. En FES la acumulación de ácido cítrico se asocia a altas concentraciones de glucosa, mayores a 200 gramos por litro y bajas concentraciones de los iones Fe^{+2} y Mg^{+2} . Al anular el hierro del medio y con una concentración de 0.284 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ se produce la mayor concentración de ácido cítrico de 149 mg/gPUF. Comparando con la misma concentración de glucosa de 300 g/L, 0.856 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0.55 de FeSO_4 la producción de ácido cítrico es de 36.8 mg/gPUF. Se tiene una variación cuatro veces mayor sin hierro y baja concentración de magnesio.

1. INTRODUCCIÓN

La fermentación en estado sólido (FES) es un sistema de cultivo microbiano que ha usado el hombre desde tiempos remotos y presenta notables ventajas en comparación de los cultivos líquidos y de superficie. Una de las ventajas más importante es la obtención de productos concentrados en tiempos relativamente cortos, partiendo de altas concentraciones de nutrientes, las cuales no inhiben el desarrollo de los microorganismos, como sucede en cultivo líquido.

El presente trabajo trata de apoyar los estudios que se han realizado en la evaluación del metabolismo de *A. niger* 10 para la producción de ácido cítrico en medios de cultivo sólido con altas concentraciones de fuente de carbono (Hang *et al*, 1987; Yong, *et al*, 1989; Córdova, 1994; Gutiérrez-Rojas *et al*, 1995; Pintado *et al*, 1997 y Pintado *et al*, 1998;) así como el efecto de éstas en la producción de polioles y ácidos orgánicos, en un soporte que se considera inerte, como es el PUF (Zhu *et al*, 1994).

En esté estudio se evaluó el consumo de sustrato y la formación de productos (ácido cítrico, glicerol, eritrol y trehalosa) durante el crecimiento del hongo en poliuretano como soporte sólido en diferentes condiciones de concentración de los nutrientes, además se presenta información sobre el efecto de la concentración del fierro y magnesio presentes en el medio de cultivo y la relación que éstos guardan con la producción de ácidos orgánicos y polioles.

El poliuretano tiene una alta capacidad de retención de agua (Zhu *et al*, 1994); a diferencia de otros soportes que han sido evaluados como la amberlita, la cual es una resina de intercambio aniónico que requiere un tratamiento de contraiones para disminuir su capacidad intercambiadora y evitar la adsorción de aniones del medio de cultivo (Córdova, 1994).

El objetivo general del presente trabajo fue el determinar el efecto de la composición del medio de cultivo en los perfiles metabólicos de *A. niger* 10 en FES utilizando glucosa como fuente de carbono y energía glucosa y poliuretano como soporte.

Al inicio de este documento se presenta la revisión bibliográfica, la cual ofrece un panorama de los factores físicos, químicos y bioquímicos, implicados en el proceso de fermentación; así como el planteamiento de los objetivos y materiales y métodos usados en

el trabajo. Posteriormente, se presentan los resultados de crecimiento y producción de metabolitos por *A. niger* en medios de cultivo con diferente concentración de nutrientes. Se estudió el efecto de la concentración de glucosa, el efecto de la disminución de la concentración de la fuente de nitrógeno y fósforo y por último la influencia que tiene la concentración de los metales en la acumulación de ácido cítrico.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO

La fermentación en estado sólido (FES) puede definirse como un proceso en el que los microorganismos crecen sobre la superficie de un sustrato sólido (Pandey, 1992). El sustrato contiene agua que se encuentra retenida en la matriz porosa que permite que las funciones vitales del microorganismo se realicen.

Antiguamente la FES era empleada principalmente en países orientales para la elaboración de alimentos fermentados; recientemente se ha utilizado además para la producción de enzimas (Shankaranand y Lonsane, 1994), proteínas, ácidos orgánicos (Hang *et al*, 1987), tratamiento de residuos tóxicos y biodegradación de compuestos tóxicos y/o recalcitrantes, entre otros.

En el sistema de FES está presente una mezcla gas-líquido-sólido en la cual la fase acuosa está íntimamente asociada a la superficie sólida en varios estados de adsorción y está en contacto con una fase gaseosa continua (Mudgett, 1986).

Los procesos de FES presentan una serie de ventajas para el crecimiento y metabolismo de hongos filamentosos, ya que éstos crecen en medios de cultivo con bajo contenido de humedad, con lo que se evitan eventuales contaminaciones bacterianas, bajo estas condiciones los hongos pueden crecer fácilmente con buenos niveles de producción de enzimas, antibióticos y otros productos de interés científico y comercial (Gutiérrez-Rojas *et al*, 1995).

En los últimos 20 años se han publicado varios trabajos en los que se indica que el crecimiento microbiano en FES está sujeto a una menor represión catabólica (Hang *et al*, 1987; Yong *et al*, 1989; Córdova, 1994; Gutiérrez-Rojas *et al*, 1995; Pintado *et al*, 1997 y 1998;) así como menor inhibición por producto final (permitiendo partir de altas concentraciones de sustrato para obtener elevadas concentraciones de producto), obteniendo además, enzimas con características diferentes a las obtenidas en cultivos líquidos (Shankaranand y Lonsane, 1994). En este sentido se han producido enzimas amilolíticas con una estabilidad mayor a las obtenidas por cultivo líquido (Shan *et al*, 1991). También se ha observado una mayor excreción de la enzima alfa-galactosidasa en

FES que en cultivo líquido utilizando el mismo tipo de microorganismo (Shankaranand y Lonsane, 1994).

2.1.1. VENTAJAS Y DESVENTAJAS

La FES presenta una serie de ventajas y desventajas con relación a la fermentación en medio líquido (Mudgett 1986, Shankaranand y Lonsane 1994 y Zhu *et al* 1994):

Ventajas:

- Los requerimientos de energía suelen ser reducidos.
- No se requieren condiciones estrictas de esterilidad.
- Se obtienen productos más concentrados.
- El sustrato sólido puede emplearse como se encuentra en la naturaleza adicionándole agua o bien complementándolo con nutrientes (soporte-sustrato).
- Las condiciones de crecimiento de los hongos son similares a las de su hábitat.
- Los rendimientos en el producto pueden ser mucho más altos que en cultivos líquidos.
- La aireación es facilitada por los espacios interparticulares.
- En la interfase sólido-sustrato-microorganismo y la fase gaseosa se dan condiciones muy favorables que permiten alcanzar velocidades de crecimiento superiores a las obtenidas en cultivo líquido, aún a elevadas concentraciones de sustrato.
- Parte de los productos de fermentación pueden extraerse fácilmente.
- Se requieren menos etapas de separación, dependiendo de la aplicación final del producto.
- Al utilizar bajas cantidades de agua, se generan pocos efluentes contaminantes.

Desventajas:

- Las fermentaciones con agitación pueden requerir un alto consumo de energía.
- Cuando se precisa adicionar agua en las etapas tempranas de la fermentación se incrementa el riesgo de contaminación.
- En ocasiones se requiere inocular con altas concentraciones de esporas.
- Algunos substratos agrícolas usados como soporte necesitan pretratamientos.
- Se tiene poco conocimiento sobre la ingeniería de los sistemas por la que se dificulta el escalamiento.
- Suelen presentar problemas de transferencia de calor y masa.
- Las variables fisicoquímicas (pH, temperatura) no se controlan fácilmente.
- Bajo ciertas condiciones de cultivo es difícil la cuantificación de la biomasa.

2.1.2. CLASIFICACIÓN

Los procesos de FES se ha clasificado de diversas formas dependiendo del modo de operación y de la naturaleza del sistema soporte-nutrientes. Pandey (1992) los clasifica de acuerdo al modo de operación (estática o agitada) y Ralp (1976) los clasifica de acuerdo a la relación soporte-nutrientes.

- I. El substrato sólido actúa como soporte y fuente de nutrientes.
- II. Los nutrientes en estado líquido se absorben en un soporte sólido inerte.

I. El substrato sólido actúa como soporte y fuente de nutrientes.

Se han utilizado productos o subproductos de origen agrícola como substratos, que también actúan como soporte, para la producción de enzimas, antibióticos, alcoholes, ácidos orgánicos, entre otros. Además de contener los nutrientes necesarios para promover el crecimiento microbiano y la producción del compuesto de interés, el substrato debe reunir una serie de características que permitan su utilización, entre las más importantes están: buena capacidad de retención de agua, resistencia mecánica y disponibilidad de nutrientes. En la tabla 1 se presentan algunos ejemplos de diferentes productos de origen agrícola que han sido utilizados como soporte en FES.

Tabla 1. Diversos tipos de soportes/substrato utilizados en FES (Córdova, 1994).

SOPORTE/SUBSTRATO
Bagazo de caña
Cáscara de kiwi
Desecho de manzana
Cáscara de naranja
Desechos de piña
Bagazo de yuca
Desecho de café
Orujo de uva

El uso de éste tipo de soportes/substratos, seleccionados y pretratados adecuadamente, favorece el crecimiento microbiano, así como la formación de productos de interés, con la gran ventaja de que se utilizan materiales naturales de bajo costo y que son fácilmente reciclados al final del proceso de fermentación para fines de alimentación animal o para actividades agrícolas como por ejemplo fertilizantes.

En términos de estudios de optimización y evaluación del metabolismo microbiano, este tipo de soporte/substrato presenta una gran desventaja, debido a su complejidad y heterogeneidad, la cuantificación del crecimiento microbiano y de los productos de su metabolismo se dificulta por la presencia de una gran cantidad de compuestos presentes que interfieren con los métodos de análisis para la cuantificación de biomasa y metabolitos.

II. Los nutrientes en estado líquido se absorben en un soporte inerte.

Las características que debe cumplir un soporte inerte impregnado con una solución nutritiva para estudios de FES son:

- Ser inerte a los componentes de medio de cultivo.
- No debe de inhibir el crecimiento del microorganismo.
- Porosidad y espacio libres disponibles.
- Resistencia mecánica para poder ser empacado.

- Capacidad de retención de agua y nutrientes.
- No debe de presentar interferencias con las técnicas analíticas.
- Poder ser reutilizado.
- Ser barato.
- Fácil de adquirir.

Sin embargo, dada la dificultad de encontrar soportes que cumplan con todas éstas características se han empleado materiales a los cuales se les realizan diferentes tipos de tratamiento físico-químicos de tal manera que éstos satisfagan el buen desarrollo de los microorganismos y la extracción de productos de interés de la forma más fácil posible.

La amberlita y el poliuretano son algunos ejemplos de soportes inertes utilizados en la FES para la producción de diferentes metabolitos. La amberlita es una resina de intercambio aniónico, que es necesario someterla a un tratamiento químico de contraiones para disminuir su capacidad intercambiadora y evitar la adsorción de aniones del medio de cultivo (Córdova, 1994); en cambio, el tratamiento realizado al poliuretano es un lavado con agua caliente y después con agua fría, esto para eliminar los compuestos químicos residuales, los cuales pueden interferir en el desarrollo del microorganismo y/o en la cuantificación de los metabolitos a producir. El secado del poliuretano se realiza bajo condiciones ambientales y, debido a su fotosensibilidad, se almacena en recipientes que lo protejan de la luz (Zhu *et al*, 1994).

Uno de los primeros soportes considerados como inerte, fue el bagacillo de caña de azúcar, al cual se le realiza un lavado para remover los nutrientes solubles presentes. El uso de este “soporte-inerte” con la adición de diferentes medios de cultivo permitió evaluar el efecto de diferentes tipos de fuente de carbono sobre la producción de pectinasas por *A. niger* CH4. Sin embargo, debido a su composición, este soporte contiene una gran cantidad de componentes biodegradables que no son completamente eliminados con simples lavados.

En la búsqueda de soportes no biodegradables, Auria *et al* (1993) y Córdova (1994) utilizaron amberlita para estudios de crecimiento de *A. niger* y producción de ácido cítrico respectivamente. A pesar de que esta resina no contiene compuestos fácilmente biodegradables, dadas sus características de intercambiador de iones, resulta altamente reactiva en cuanto a los componentes del medio de cultivo, como de los productos del

metabolismo microbiano. Para reducir estas interacciones se propuso la saturación de los sitios de intercambio con los iones apropiados.

Otro de los soportes inertes recientemente utilizado es la espuma de poliuretano, esta presenta una gran capacidad de retención de agua; es completamente inerte en cuanto a disponibilidad de nutrientes y no reacciona con los componentes del medio de cultivo, la extracción de los metabolitos a estudiar es relativamente sencilla y no interfiere con ellos. Esta ha sido exitosamente utilizada para estudios de producción de tanasas (Aguilar *et al*, 2001); en la producción de ácido cítrico con micelio inmovilizado en poliuretano (Yong *et al*, 1989) y para evitar la influencia que tiene la concentración de la fuente de nitrógeno sobre el metabolismo de *A. niger* (Pintado *et al*, 1997).

2.2. NUTRIENTES DEL MEDIO DE CULTIVO

La formulación del medio de cultivo tiene dos partes íntimamente ligadas: una parte científica que agrupa los fundamentos bioquímicos conocidos y otra parte empírica derivada de los detalles bioquímicos no conocidos para cada microorganismo. Para toda actividad microbiología se requieren dos factores nutricionales básicos:

- Una fuente de carbono y energía: generalmente compuestos orgánicos relativamente reducidos como carbohidratos, lípidos entre otros.
- Una fuente de nutrientes para síntesis de componentes celulares y productos como el nitrógeno, fósforo, magnesio, entre otros.

2.2.1. FUENTE DE CARBONO

Dado que la mayoría de los microorganismos industriales más importantes, como es el caso de *A. niger*, son heterótrofos, la fuente de carbono es utilizada también como fuente de energía. Las fuentes de carbono más comunes son los carbohidratos y entre ellos la glucosa. No todos los carbohidratos son igualmente asimilables; su facilidad de asimilación es en general de la siguiente manera:

Hexosas > Disacáridos > Pentosas > Polisacáridos

Los hidrocarburos requieren de una alta oxigenación al medio de cultivo, para los procesos de oxidación. El principal problema que presentan estos compuesto es su poca solubilidad en agua.

Los alcoholes se utilizan como fuente alternativa para la producción de diversos compuestos como son los aceites de cadenas cortas.

Las fuentes de carbono más comunes son:

Glucosa: hidrolizados ácidos o enzimáticos de almidón.

Sacarosa: melaza, que además contiene otros carbohidratos, minerales, compuestos nitrogenados, pigmentos y vitaminas.

Lactosa: suero de leche.

Almidón: cereales.

Celulosa: residuos vegetales.

Altas concentraciones de fuente de carbono incrementan el rendimiento de producción de ácido cítrico, ya que se origina un desequilibrio en el metabolismo necesario para la acidogénesis (Ding-Bang *et al*, 1989).

El tipo de fuente de carbono es importante también para la producción de polioles; estudios realizados con *Trichosporonoides sp* 150-5 y 33-1 muestran que la concentración de glicerol y eritrol se ven afectados por la fuente de carbono en un medio de cultivo sumergido. En la tabla 2 se presenta el efecto del tipo de fuente de carbono en la producción de polioles por dos levaduras (150-5 y 331-1); en el caso de la cepa 150-5 la producción de eritrol y glicerol disminuye cuando se utiliza sacarosa como fuente de carbono; en cambio, con la cepa 331-1 provoca una reducción en la producción de eritrol (Marina *et al*, 1993).

Tabla 2. Rendimiento de polioles, producidos por *Trichosporonoides sp.* 150-5 y 331.1(Marina *et al*, 1993).

Cepa	F. Carbono	Eritrol (%)	Glicerol (%)	Fructosa (%)
150-5	Glucosa	30.0	7.2	
331-1	Glucosa	43.0	2.7	
150-5	Sacarosa	27.3	4.1	6.5
331-1	Sacarosa	37.4	2.52	15.5

En estudios realizados en FES, con amberlita como soporte inerte, se demostró que con concentraciones de glucosa superiores a 300 g/L se favorece la producción de ácido cítrico, eritrol y glicerol (Cordova, 1994). Por otro lado, el uso de poliuretano como soporte inerte, con una concentración inicial de glucosa de 100 g/L permitió determinar la importancia que tienen los iones divalentes, estableciendo que existe una relación inversa en la concentración de fierro y la acumulación de ácido cítrico, el fierro actúa deteniendo el ciclo de ácidos tricarbónicos, implicando que en el proceso de FES sería muy parecido al de fermentación líquida (Pintado *et al*, 1998).

2.2.2. FUENTE DE NITROGENO

Después del carbono y del oxígeno, el nitrógeno es el compuesto más abundante en la célula, éste forma parte de las proteínas, ácidos nucleicos y nucleótidos. Las fuentes de nitrógeno inorgánicas más usadas son el amoníaco y las sales de amonio que son baratas y generalmente fáciles de asimilar por los microorganismos. Las fuentes de nitrógeno orgánicas generalmente están presentes en los subproductos agrícolas (harinas de soya, semillas de algodón, germen de trigo etc.) o en productos del mar (desecho de mariscos, harina de pescado, etc.). En el caso de la utilización de medios definidos se pueden utilizar aminoácidos, peptona o extracto de levadura como fuente de nitrógeno orgánico (Dawson y Maddox, 1998).

Para *A. niger* se ha utilizado una gran variedad de fuentes de nitrógeno tanto orgánicas como inorgánicas; ésta dependerá del tipo de productos que se deseen obtener, ya sea enzimas como proteasas en donde se utiliza harinas de pescado y soya; o sales de amonio o nitrato para la producción de ácidos orgánicos.

Jaehoon-Choe y Young (1991) al utilizar nitrato de amonio como fuente de nitrógeno en concentraciones que van de 1, 2, 3 y 4 g/L reportan que en la concentración de 3 g/L se obtuvo el mayor rendimiento en la producción de ácido cítrico (21 g/L), con lo cual se establece que los requerimientos de nitrógeno para la producción de ácido cítrico deben de estar acorde a la concentración de fuente de carbono que se emplea.

En la tabla 3 se presentan los resultados reportados por Dawson y Maddox (1988) en donde se observa que al incrementar la concentración de nitrógeno disminuye el rendimiento en la

producción de ácido cítrico; por lo que en este tipo de procesos se requieren concentraciones limitantes de nitrógeno en el medio de cultivo.

Tabla 3. Efecto de la concentración de nitrógeno en la producción de ácido cítrico (Dawson y Maddox 1988).

N inicial (mg/L)	N residual (mg/L)	Ácido cítrico (g/L)	Azúcar Utilizada (g/L)	Biomasa (g/L)	Ácido cítrico (mg/L)
210	0	21.1	34.1	7.9	62
250	43	20.5	33.1	6.9	62
314	101	19.0	31.2	8.9	56
420	218	9.1	33.3	9.4	27
525	317	10.7	54.6	10.3	20
630	410	14.3	58.3	10.6	25

Pintado *et al* (1998) establecen la importancia del uso de concentraciones bajas de nitrógeno y fósforo, estableciendo que al igual que el medio líquido altas concentraciones de estos nutrientes desfavorecen la producción de ácido cítrico.

2.2.3. IONES METÁLICOS

Casi un tercio de las enzimas conocidas requieren la presencia de iones metálicos para su función, éstos como cofactores de actividades enzimáticas involucradas en los procesos catabólicos y anabólicos.

Existen dos clases de enzimas que requieren iones:

- Las metaloenzimas, las cuales contienen iones metálicos fuertemente unidos, normalmente metales de transición (Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} o Co^{3+}).
- Las enzimas activadas por metales, que fijan débilmente iones metálicos presentes en una solución, normalmente iones alcalinos o alcalino-térreos (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} o Ca^{2+}).

Los iones participan en el proceso catalítico de alguna de las siguientes maneras (Voet y Voet, 1992):

- Fijándose a los sustratos, de modo que los orientan adecuadamente para la reacción.

- Facilitando reacciones de oxido-reducción, mediante cambios reversibles en el estado de oxidación del ion.
- Estabilizando electrostáticamente las cargas negativas.

Los iones metálicos promueven la catálisis mediante estabilización de cargas, actúan prácticamente igual que un protón, es decir, como una base de Lewis; éstos pueden estar presentes a elevadas concentraciones a pH neutro y pueden tener cargas mayores a +1. La carga de un ion metálico hace que las moléculas de agua ligadas sean más ácidas que el agua libre siendo una fuente de iones OH^- , incluso por debajo de pH neutro (Voet y Voet, 1992).

El fierro participa en diversos procesos esenciales de la célula, debido a su característica estructural, es un cofactor que presenta dos valencias con un amplio intervalo de potencial de oxido reducción; una deficiencia de fierro en los microorganismos es causante de una inhibición parcial o total del crecimiento (Byers y Arceneaux, 1975). En el ciclo de ácidos tricarboxílicos y la cadena respiratoria están presentes enzimas que requieren fierro. Bajo condiciones de limitación por fierro, los microorganismos aerobios satisfacen en parte sus requerimientos energéticos mediante glicólisis y mantienen parcialmente inhibida a la aconitasa, lo que favorece la acumulación de ácido cítrico. En cultivo sumergido, la concentración de iones de fierro no debe de ser mayor a 0.2 ppm para la producción de ácido cítrico (Shakaranand y Lonsane, 1994).

En el año de 1951 apareció el primer informe donde se reporta que la deficiencia de metales traza provoca un incremento en la producción de ácido cítrico con *A. niger* en un medio de cultivo sumergido. El Cu^{+2} , Mn^{+2} , Fe^{+2} y Zn^{+2} son considerados elementos traza y normalmente la cantidad adecuada de estos metales para el desarrollo de los microorganismos esta presente como contaminación de otros componentes del medio, mientras que el Mg^{+2} es considerado como un macronutriente y se le ha reconocido como un elemento esencial de las células desde hace 60 años. Estudios realizados por Infante *et al* (1999) han demostrado que la adición de Co^{+2} , Ca^{+2} , Cu^{+2} , Mn^{+2} , Fe^{+3} , y Zn^{+2} aumentan el rendimiento de producción de ácido cítrico.

Estudios realizados FES con amberlita demostraron que concentraciones altas de metales (45 y 180 ppm) modifican la velocidad de consumo de azúcar de 4.46 g/gsh a 5.23 g/gsh,

pero a bajas concentraciones de metales la velocidad se reduce asta 0.6 g/gsh (Peralta, 1995). Con concentraciones de metales de 180 ppm se favorece la acumulación de polioles (glicerol y eritrol), trehalosa y ácido cítrico, los cuales son consumidos al terminarse la glucosa; bajas concentraciones de metales favorecen la presencia de trehalosa.

La tabla 4 presenta algunos de los resultados obtenidos durante un estudio realizado variando concentraciones de metales. Con la adición de 51 ppb de Mn^{+2} , 5 ppb de Fe^{+3} y 75 ppb de Zn^{+2} se incrementa el rendimiento de producción de ácido cítrico (Roukas y Kotzekidou, 1986).

Tabla 4. Efecto de la adición de metales durante la producción de ácido cítrico de *A. niger* en cultivo de superficie (Roukas y Kotzekidou, 1986).

Elemento (ppb)	Ácido Cítrico (g/L)	Cambio en el Contenido de ácido cítrico (%)	Elemento (ppb)	Ácido Cítrico (g/L)	Cambio en el Contenido de ácido cítrico (%)
Control	19.0	-----	Control	19.0	-----
Mn⁺²			Co⁺²		
48	19.71	+3.7	5	11.30	-40.5
51	19.94	+4.9	10	11.03	-41.9
56	17.90	-5.7	50	10.58	-44.3
96	16.76	-11.7	100	9.56	-49.6
146	15.67	-17.5	500	9.22	-51.4
Fe⁺³			1000	8.76	-53.8
2	19.05	+0.2	Cu⁺²		
5	19.37	+1.9	0.5	17.00	-10.5
10	16.20	-14.7	1	15.06	-20.7
50	14.20	-25.2	5	13.7	-27.8
100	12.27	-35.4	10	11.47	-39.6
Zn⁺²			50	9.43	-50.3
72	19.37	+1.9	Ca⁺²		
75	21.08	+10.9	5	11.22	-40.9
80	17.10	-10.9	10	10.31	-45.7
120	15.44	-18.7	50	9.63	-49.3
170	12.27	-35.4	100	8.95	-52.8

El magnesio es cofactor de más de 300 enzimas. Tiene una función estructural en los tejidos, proteínas y membranas. En los últimos estudios realizados se ha demostrado que el magnesio tiene una función reguladora en el metabolismo, activando enzimas como la isocitrato deshidrogenasa NAD-dependiente en el ciclo de ácidos tricarbónicos y regulando la producción de ácidos orgánicos (Infante *et al*, 1999).

Algunos estudios han demostrado que las células son capaces de acumular selectivamente magnesio, lo que sugiere la existencia de sistemas complejos para el transporte.

El magnesio es un elemento esencial, los principales procesos biológicos en los cuales participa son los siguientes:

- Síntesis de DNA y RNA.
- Síntesis de proteínas.
- Transporte de membrana.
- División celular.
- Fosforilación oxidativa.
- Cofactor.

El magnesio se asocia con los ribosomas y está estrechamente ligado a ellos. Una parte del magnesio está asociado con la pared de las bacterias y participa en el mantenimiento de la pared celular, una pequeña disminución de la concentración de este metal en el medio provoca una disminución de la capacidad de producir polioles y carbohidratos de la membrana (Voet y Voet, 1992); probablemente, ésta sea una de las razones por lo que una deficiencia de magnesio favorece la acumulación de ácido cítrico en el medio de cultivo.

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

El magnesio es esencial para el crecimiento y el metabolismo de *A. niger*. Para obtener altas concentraciones de ácido cítrico en medio líquido se ha sugerido emplear concentraciones de magnesio no mayores a 2 mg/L (Shakaranend y Lonsane, 1994).

2.3. METABOLISMO

Las especies de *Aspergillus* son utilizadas para la producción de ácidos orgánicos y polioles. Múltiples publicaciones (Gancedo *et al*, 1968; Byers y Arceneaux 1975; Ding-Bang *et al*, 1989; Andreas *et al*, 1993; Córdova; 1994;) han tratado de explicar el metabolismo de este hongo en función de la composición del medio en cultivos líquido, de superficie y sólido (siendo este último en donde los estudios realizados son muy pocos). Se ha demostrado que *A. niger* utiliza dos vías para el catabolismo de la glucosa: Embden Meyerhof Parnas (EMP) y la vía de Hexosa Mono Fosfato (HMP).

En la década pasada se realizaron estudios en los cuales se identificaba los principales polioles (glicerol, eritrol, arabitol y manitol) y ácidos orgánicos (oxálico y cítrico) producidos por *A. niger* (Sannaa *et al*, 1992). La glicerol dehidrogenasa de *Klebsiella pneumoniae* se inhibe por la presencia de iones Fe^{+2} en el medio de cultivo (Johnson *et al*, 1985) Los polioles producidos actúan principalmente como osmoreguladores (Reed *et al*, 1987), siendo los más importantes el glicerol y el eritrol; los ácidos orgánicos se acumulan por un deficiente funcionamiento del ciclo de Krebs, causado principalmente por inhibición enzimática o por la concentración de cofactores enzimáticos (Visser, 1991).

A. niger es conocido por su capacidad para acumular diversos ácidos orgánicos (cítrico, oxálico y glucónico) en cantidades importantes; así como para la producción de diversas enzimas (glucoamilasa, α -amilasa, α -glucosidasa, proteasas entre otras) lo cual lo hace un hongo de una gran importancia comercial (MacKenzie *et al*, 2003). El pH tiene una marcada influencia sobre la producción de ácidos orgánicos; el tipo de ácido que se forma es controlado principalmente por el pH del medio de cultivo. A pH cercano a 2 se acumula principalmente el ácido cítrico; mientras que a un pH cercano a 5 predomina el ácido glutámico y a pH ligeramente neutro se producen ácidos glucónico, málico y oxálico. El mecanismo posible es el efecto de regulación que ejerce el pH sobre las diferentes enzimas involucradas en la formación de estos productos. Por ejemplo, la acumulación del ácido glutámico depende de transaminación del α -cetoglutarato por una aminotransferasa la cual es inactivada a un pH de 5. Al disminuir el pH del medio de cultivo se obtiene la activación de la enzima GOD y por consiguiente la acumulación de ácido cítrico (Harald *et al*, 1985). Legisa y Matthey (1986) establecen que en medio de cultivo líquido la acumulación de ácido cítrico es ocasionada por la inhibición de la enzima isocitrato deshidrogenasa NAD

dependiente por el glicerol, en cambio Arisan-Atac y Kubicek (1996) establecen que el glicerol no interviene en la acumulación del ácido cítrico. Estos autores proponen que es uno de los iones bivalentes el que origina tal acumulación. Infante *et al* (1997) establece que posiblemente los iones de hierro y magnesio son los principales factores en la acumulación del ácido.

Estudios hechos en FES sobre la producción de ácido cítrico a partir de cáscara de Kiwi utilizada como soporte/substrato con *A. niger*, reportan rendimientos de 100 g de ácido cítrico por kilogramo de kiwi fermentado en presencia de 2 % de metanol a 30 ° C durante 4 días de fermentación (Hang *et al*, 1987). En cambio con amberlita como soporte se demostró que la acumulación del ácido cítrico depende fuertemente de la concentración de glicerol en el medio de cultivo y que es independiente de la concentración inicial de sales de Fe, Mg y Mn a concentraciones inferiores a 200 g/L (Cordova, 1994; Gutiérrez-Rojas *et al*, 1995).

La producción de polioles (arabinol, glicerol y eritrol) por *Pichia farinosa* se realiza simultáneamente al consumo de glucosa. El mecanismo propuesto por Adler *et al* (1985) es el ciclo de HMP, glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, 6 fosfogluconato deshidrogenasa, transaldolosa y poliol deshidrogenasa.

La síntesis de glicerol involucra varias rutas metabólicas (Legisa y Matthey, 1986), una de ellas a partir de intermediarios fosforilados y consiste en la conversión de dihidroxiacetona-3-fosfato a glicerol-fosfato, catalizada por la glicerol-fosfato-deshidrogenasa y la glicerofosfatasa. La glicerol-deshidrogenasa NAD⁺ dependiente transforma directamente la dihidroxiacetona a glicerol. Al obtener un extracto enzimático de *A. niger*, se identificaron dos isoenzimas de glicerol deshidrogenasa NADP⁺ dependiente, una citoplasmática y otra mitocondrial y se evidenciaron cambios en las relaciones de HMP predominante en las primeras etapas de cultivo a EMP predominante en la etapa terminal del crecimiento (Legisa y Matthey, 1986, Patrus *et al*, 1991).

En *A. nidulans* se ha encontrado que la glicerol-cinasa y la glicerol-3-fosfatodeshidrogenasa de FAD dependiente son controladas por represión catabólica e inducción específica; se demostró que la dehidroxiacetona y gliceraldehído que son convertidos a glicerol (Ross *et al*, 1986). El gliceraldehído puede ser reducido por la enzima glicerol deshidrogenasa NADP⁺

dependiente o por la alcohol deshidrogenasa I; mientras que, la dihidroxiacetona es reducida exclusivamente por la primera enzima (Voet y Voet, 1992).

En estudios previos se ha tratado de explicar la importancia que presenta el glicerol en la acumulación de ácido cítrico por *A. niger*. Se ha demostrado que el glicerol producido por *A. niger* es uno de los responsables de la acumulación de ácido cítrico, dado que éste inhibe de una forma hasta ahora no determinada a la enzima isocitrato–deshidrogenasa ocasionando la interrupción del ciclo de los ácidos tricarbóxicos con la respectiva acumulación del ácido cítrico (Legisa y Matthey, 1986). La presencia de glicerol producido por el hongo a una concentración mayor de 0.1 M es capaz de reducir la actividad de la isocitrato deshidrogenasa hasta en un 90 % aproximadamente (Legisa y Matthey, 1986).

Estudios realizados por Arisan-Atac y Kubicek (1996) en donde realizan el mismo experimento que Legisa y Matthey (1986) en medios de cultivo líquido establecen que el glicerol no inhibe la enzima isocitrato–deshidrogenasa NADP-dependiente, con lo cual la acumulación de ácido cítrico no depende de la presencia de glicerol, sino que depende de la presencia de algunos de los metales (Arisan-Atac y Kubicek 1996, Infante *et al*, 1999). Los metales juegan un papel muy importante en la producción de ácido cítrico por *A. niger*; el cobre, manganeso y zinc ejercen un efecto activador en la enzima isocitrato deshidrogenasa NADP-dependiente del ciclo de ácidos tricarbóxicos, en tanto el calcio tiene un efecto inhibitorio en la enzima (Infante *et al*, 1999).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la composición del medio de cultivo en los perfiles metabólicos de *Aspergillus niger* en fermentación en estado sólido utilizando como fuente de energía glucosa y poliuretano como soporte.

3.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- ◆ Formular un medio de cultivo para el desarrollo de *Aspergillus niger* con concentraciones de 50-300 g/L de glucosa en fermentación en estado sólido utilizando poliuretano como soporte.
- ◆ Evaluar el efecto de la concentración de glucosa en el medio de cultivo sobre el crecimiento de *Aspergillus niger* y la producción de metabolitos (polioles y ácido cítrico).
- ◆ Evaluar el efecto de la concentración de nutrientes en el medio de cultivo sobre la producción de metabolitos.
- ◆ Evaluar el efecto de la composición del medio de cultivo en el metabolismo de glucosa por *Aspergillus niger*.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. EL MICROORGANISMO: AISLAMIENTO Y CONSERVACIÓN

Se tomó una colonia de *A. niger* conservada en agar papa dextrosa (PDA) y se resembró por punción en varios puntos en cajas de Petri con PDA, se incubó por dos días a 30°C. Al transcurrir este tiempo se seleccionó una colonia bien definida y se repitió el procedimiento de sembrado, posteriormente las esporas se procedieron a su conservación en perlas de crioprotección, las cuales fueron utilizados para todos los estudios realizados en este trabajo.

4.2. MEDIO DE CULTIVO PARA FES

4.2.1. EVALUACIÓN DEL CONSUMO DE GLUCOSA EN POLIURETANO

Se evaluó el consumo de glucosa a concentraciones iniciales de 50, 100, 200 y 300 gramos por litro en FES utilizando poliuretano como soporte, partiendo de un medio de cultivo de referencia en donde se reportaron resultados de producción de ácidos orgánicos y polioles en amberlita (Córdova, 1994) . En la tabla 6 se presentan las composiciones de los medios de cultivo utilizados para en el desarrollo de este trabajo.

Tabla 6. Formulación de los medios de cultivo utilizados en este trabajo valores en (g/L).

Compuesto	1L	2L	3L	4L	5L	6L	7L	8L	9L	10L	11L
Glucosa	50	100	200	300	50	100	200	300	300	300	300
NaNO₃	2.75	5.50	11	16.5	0.916	1.833	11	16.5	16.5	16.5	16.5
K₂HPO₄	0.91	1.83	3.66	5.50	0.303	0.61	3.66	5.50	5.50	5.50	5.50
MgSO₄·7H₂O	0.14	0.28	0.56	0.85	0.04	0.093	0.188	0.284	0.284	0	0
FeSO₄	0.09	0.18	0.36	0.5	0.03	0.06	0.122	0.183	0	0.183	0
KCl	0.45	0.91	1.83	2.75	0.15	0.30	0.611	0.916	0	0	0
Oligoelementos (µL)	330	660	1330	2000	100	200	400	600	600	600	600
Formulación de Oligoelementos (g/L)											
CuSO₄·5H₂O	0.15										
ZnSO₄	0.166										
MnSO₄·H₂O	0.08										
NaMnO₄·2H₂O	0.10										

Evaluación de 50 y 100 g/L de glucosa disminuyendo el resto de los nutrientes

Los medios 5L y 6L corresponden a la segunda etapa de la experimentación en donde se evaluó la disminución de dos terceras partes de los nutrientes de 1L y 2L de la fuente de nitrógeno, fosfato e iones metálicos; por tanto se tiene una alta concentración de glucosa y bajas concentraciones de los macro y micro nutrientes para el desarrollo del microorganismo.

Evaluación de 200 y 300 g/L de glucosa disminuyen la concentración de iones Mg^{+2} , Fe^{+2} y K^{+1} .

Los medios 7L y 8L corresponden a la tercera etapa de la experimentación en donde se evaluaron las fermentaciones de 200 y 300 g/L disminuyendo en dos terceras partes la concentración de iones metálicos; la relación de nitrógeno y fosfato se mantuvieron como en la etapa I.

Evaluación de 300 gr/L de glucosa variando la concentración de iones Mg^{+2} y Fe^{+2} .

Los medios 9L, 10L y 11L corresponden por último a tres fermentaciones de 300 g/L de glucosa con la relación de nitrógeno y fósforo de la etapa I, en donde se evaluó la importancia que presenta los iones en el metabolismo, variando la presencia de iones metálicos de fierro y magnesio, en la primera sólo se le adicionó magnesio, a la segundo sólo contiene fierro y en la tercera la ausencia de los dos iones.

4.2.2. MEDIO PARA PRODUCCIÓN DE ESPORAS.

El procedimiento para la producción de esporas es el siguiente: a 100 mL de agua se agregaron 3.9 gramos de PDA se hidrataron y después se calienta para disolverlo totalmente. Se colocan en dos matraces Erlenmeyer de 250 mL 50 mL de medio en cada uno y se esteriliza a 121 °C y 15 lb de presión durante 15 minutos, al término se deja solidificar el agar y se siembra el hongo por punción. Se incuban 5 días a 30 °C después de este tiempo se tiene las esporas del hongo.

4.3. COSECHA DE ESPORAS

A un matraz con las esporas del hongo propagadas se le agregaron 50 mL de una solución estéril de tween 80 al 0.1 % en agua con un agitador magnético, en condiciones asépticas y se agitan durante 5 minutos.

4.4. CONTEO DE ESPORAS

En una cámara de Neubauer se agregaron una capa de suspensión de esporas con la dilución pertinente para lograr una cuenta de entre 20 y 60 esporas por cuadro. Al microscopio, con el objetivo de 40x, se contaron las esporas de 10 cuadros seleccionados al azar. El número de esporas por cuadro, se transforma a concentración de esporas (esporas/mL). Las esporas que normalmente se cuentan en este medio y bajo estas condiciones de incubación son del orden de 5×10^8 esporas/mL.

4.5. ESTIMACIÓN DE BIOMASA

Para la elaboración de las curvas estándar de biomasa, se trabajó usando micelio de *A. niger* 10 incubado en placas de agar con el medio de cultivo indicado en la tabla 7. El tiempo de incubación fue de 36 h y se evitó la formación de esporas para poder estimar la proteína asociada al micelio (Bradford, 1976; Córdova-López *et al*, 1996).

Tabla 7. Formulación de los medios de cultivo para la producción de micelio.

Compuesto	g/L
Glucosa	30
KH_2PO_4	2.47
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6.6
CaCl	0.48
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.38
NaCl	0.32
FeSO_4	0.124
Agar	12.5
Oligoelementos	1 mL

Oligoelementos	g/L
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.2
H_3BO_3	2.2
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.5
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.16
$\text{CaSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.16

El contenido de cada placa (agar con micelio) se vació en un vaso de precipitado de 500 mL y se le agregó agua destilada a 60 °C a fin de fundir el agar, posteriormente se filtró y lavó el micelio con agua a 60 °C para eliminar totalmente el agar (Córdova, 1994). Finalmente, el micelio obtenido se secó durante 24 horas a 60 °C sobre papel aluminio, posteriormente se trituroó en un mortero hasta obtener un polvo fino.

Se tomaron siete muestras de 0, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 miligramos de micelio triturado seco, se colocaron en un tubo de ensaye y se suspendieron en H₃PO₄ 0.15 M cada una, se calentaron por un tiempo de 8 minutos en un baño de agua en ebullición.

Transcurrido este tiempo, se centrifugaron durante 5 minutos a 3000 rpm, se tomaron alícuotas de 800 µl de cada muestra y se traspasaron a una tubo de ensaye. Por último se agregaron 200 µl de reactivo de Bradford (1976) y se lee en el espectrofotómetro a 595 nm (Córdova-López *et al*, 1996).

4.6. SOPORTE

El soporte utilizado fue poliuretano conocido comercialmente como súper-firme 20-24, el cual se encuentra en trozos de estructura cúbica irregular de aproximadamente 2 cm³. Antes de ser utilizado se le realiza el siguiente tratamiento: se lava con agua caliente varias veces y después se enjuaga con agua fría, posteriormente se exprime y se coloca en charolas para su secado, el cual se realiza a temperatura ambiente. En esta etapa se debe detener el cuidado de no exponer el poliuretano a la luz durante mucho tiempo dado que esto puede ocasionar que se oxide, provocando su oscurecimiento. Al secarse totalmente, se muele en un molino de cuchillas Branbendor OHG tipo 880804, a un tamaño de partícula malla No. 60, y se guarda en recipientes oscuros para protegerlo de la luz.

4.7. INOCULACIÓN

La suspensión de esporas (obtenida en la cosecha) se agregó al medio de cultivo y se mezcló perfectamente con la espuma de poliuretano. El medio con esporas se agrega al soporte seco para tener una concentración de inóculo de 2.7×10^7 esporas/g de soporte seco.

4.8. COLUMNAS

Las columnas de vidrio con un diámetro interno de 2.5 cm y una altura de 20 cm (con una entrada reducida, para la aireación). Se llenaron con 5.5 g de soporte impregnado con medio de cultivo e inóculo, en una relación de 1 g de soporte por 2 mL de medio inoculado, lográndose una altura de empaque de 10.6 cm aproximadamente. Encima del empaque se coloca un tapón de algodón sin tener contacto el soporte. Las condiciones de cultivo fueron de 35 °C y un flujo de aire de 20 mL/min (Fig. 1).

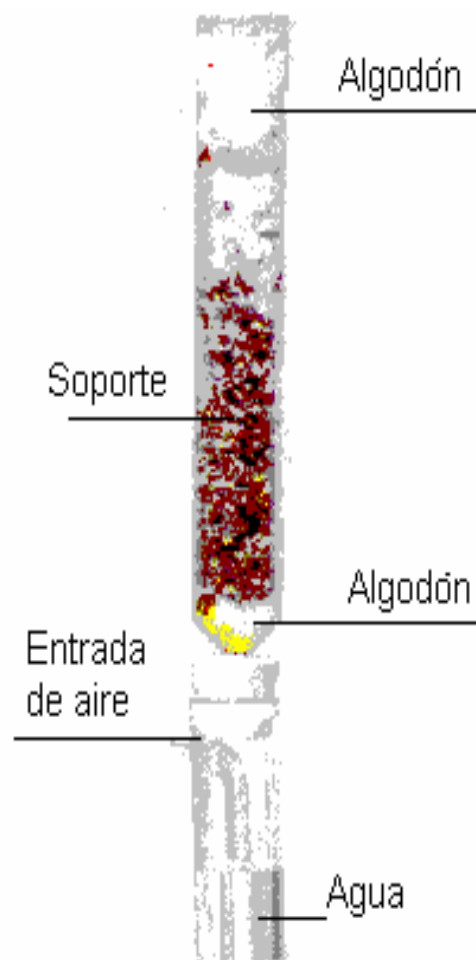


Figura 1. Fotografía del reactor tubular empleado en FES.

4.9. MÉTODOS ANALÍTICOS

4.9.1. HUMEDAD

La humedad de las muestras se determinó gravimetricamente en una termobalanza (Ohaus modelo 6010).

4.9.2. pH

A un gramo de materia fermentada previamente homogenizada se le agregaron 10 mL de agua desionizada, se agitaron con ayuda de un agitador magnético por 10 minutos y se mide el pH en un potenciómetro (Conductronic pH 20). La suspensión es retenida en un frasco para el análisis de metabolitos y carbohidratos que se realizará posteriormente.

4.9.3. CUANTIFICACIÓN DE BIOMASA

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

Tratamiento de la muestra.

A 0.3 gramos de materia fermentada se le agregaron 5 mL de H_3PO_4 0.15 M (Córdova-López *et al*, 1996) y se mantuvo en un baño maría a ebullición durante 8 minutos; se dejó enfriar y se centrifugó durante 15 minutos a 5000 rpm; se tomaron 0.8 mL del sobrenadante y se agregaron 0.2 mL del reactivo de Bradford, por último se leyó la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro (Shimadz UV-160^a) usando como blanco 0.8 mL de H_3PO_4 0.15 M más 0.2 mL de reactivo.

Uno de los principales problemas que se marca durante el desarrollo de este método es que sólo se estima la proteína micelar, por tanto durante la etapa de esporulación al parecer el crecimiento es negativo, por lo cual sólo se presentan los resultados de concentración máxima de biomasa y el tiempo en la que ésta se alcanzó.

4.9.4. CUANTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS, POLIOLES Y ÁCIDOS ORGÁNICOS

La cuantificación de metabolitos y carbohidratos se realizó con un estándar de referencia por medio de HPLC (Perkin Elmer mod-250), con una precolumna (Redex organic guas), una columna (Redex organic acid) colocada en una chaqueta de calentamiento (Eppendorf) a 60 °C y un detector de índice de refracción (Perkin Elmer LC-30-RI bajo). De la suspensión restante de la cuantificación de pH, se centrifugó durante 5 minutos a 5000 r.p.m., se tomaron 2 mL del sobrenadante y se filtró con una membrana de 0.2 µm. Se inyectaron 20 µL en el HPLC con una fase móvil de H₂SO₄ 5 mM a una velocidad de 0.6 mL/min, y se determinó la concentración de acuerdo al cálculo con el estándar.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE GLUCOSA EN MEDIOS DE CULTIVO BALANCEADOS

En la primera parte de este trabajo se evaluó el efecto de la concentración inicial de glucosa sobre el consumo de sustrato, crecimiento, producción de ácido cítrico y polioles por *A. niger* en FMS con poliuretano como soporte inerte. Se evaluaron concentraciones iniciales de glucosa de 50 a 300 g/L.

En el medio de cultivo con 50 g/L de glucosa (86.0 mg/gPUF) se obtuvo un consumo del 100% en 46 h, sin acumulación de ningún metabolito (ácidos orgánicos o polioles).

Los resultados obtenidos con una concentración inicial de glucosa de 100 g/L (115 mg/gPUF) se presentan en la figura 2.

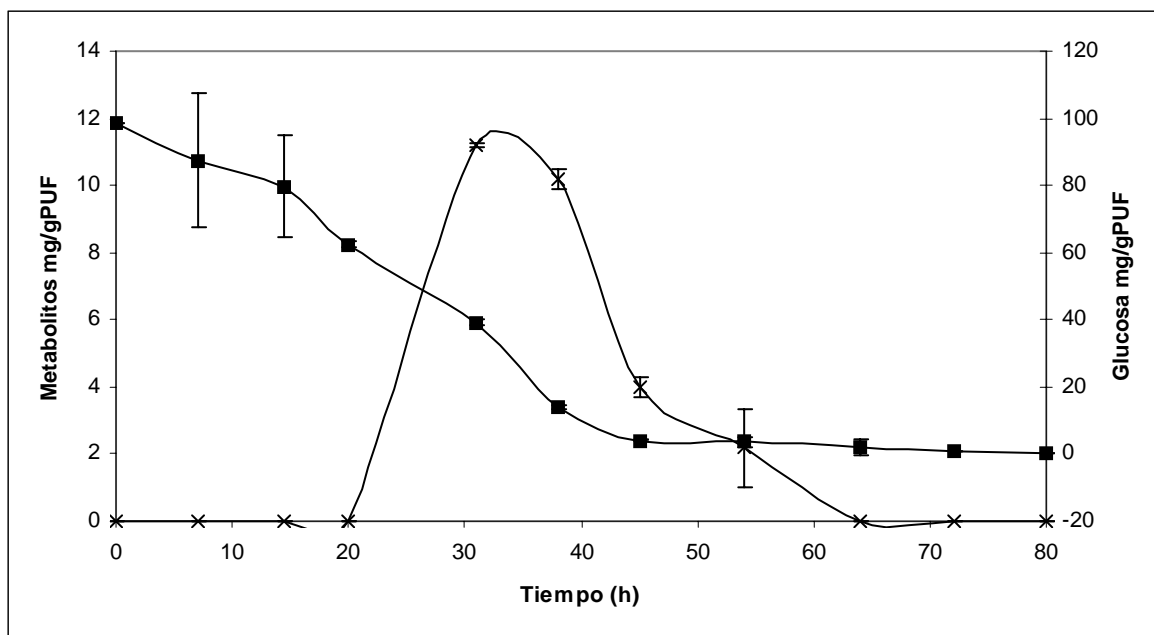


Figura 2. Cinética de consumo de glucosa (■) y producción y consumo de ácido cítrico (×) a partir de un medio de cultivo con 115 miligramos de glucosa por gramo de poliuretano, correspondientes a 100 gramos de glucosa por litro (medio de cultivo 2L).

El consumo de glucosa se presenta de una forma acelerada durante las primeras 40 h, consumiéndose totalmente a las 48 h. De los metabolitos analizados, únicamente se detectó la producción de ácido cítrico. Éste alcanzó su máxima concentración (10.61 mg/gPUF) a las 30 h de cultivo, posteriormente es utilizado como fuente de carbono. El consumo del ácido cítrico es simultáneo al de la glucosa a partir de las 30 h de cultivo.

En la figura 3 se presentan los resultados obtenidos con una concentración inicial de glucosa de 200 g/L (410 mg/gPUF).

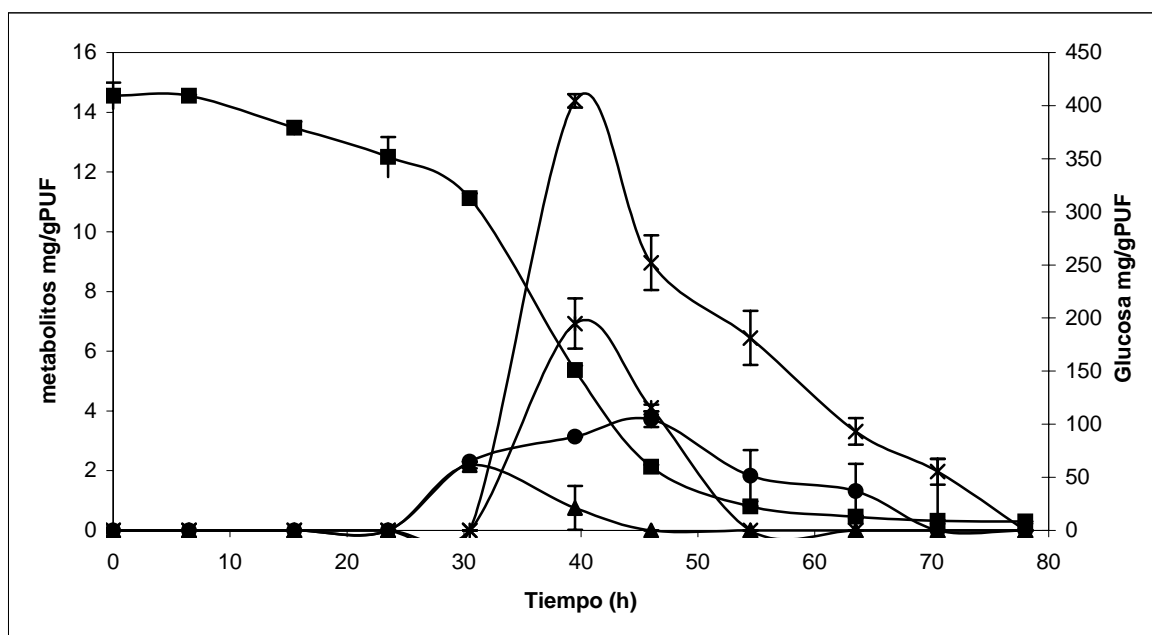


Figura 3. Cinética de consumo de glucosa (■), y producción y consumo de ácido cítrico (×), glicerol (▲), eritrol (*) y trehalosa (●) de 410 miligramos de glucosa por gramo de poliuretano correspondientes a 200 gramos de glucosa por litro, medio de cultivo 3L.

Al igual que en el caso anterior, la glucosa es completamente consumida al final del cultivo. Durante las primeras 30 h de cultivo el consumo de glucosa es lento (3.33 mg/gPUF h), posteriormente, el consumo de glucosa aumenta a 14 mg/gPUF h hasta alcanzar casi el 98 % de glucosa consumida.

La producción de glicerol y trehalosa inicia después de las 25 h de cultivo. El glicerol alcanza su máxima concentración a las 30 h, después de lo cual es completamente metabolizado. Por otro lado, la trehalosa alcanza su máxima producción a las 46 h para ser posteriormente consumida. La producción de eritrol y ácido cítrico inicia después de las 30 h; tiempo en el que se alcanza la máxima producción de glicerol. Ambos, eritrol y ácido cítrico, alcanzan sus mayores concentraciones a las 40 h de cultivo, siendo posteriormente utilizados como fuente de carbono.

En la figura 4 se presentan los resultados obtenidos con una concentración inicial de glucosa de 300 g/L (1090 mg/gPUF).

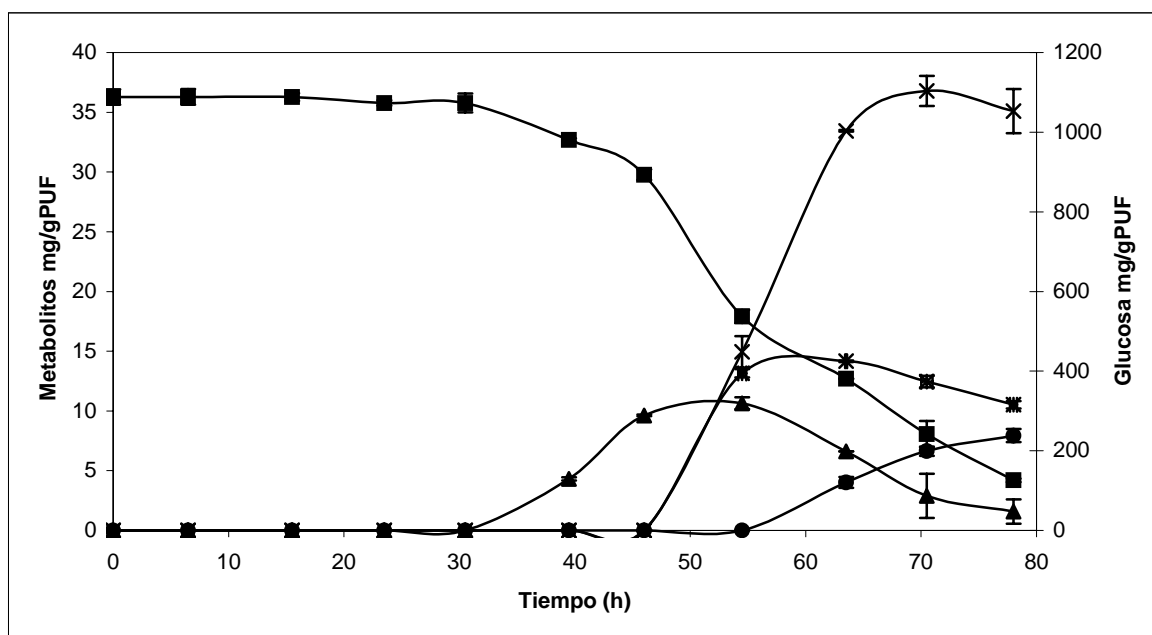


Figura 4. Cinética de consumo de glucosa (■), y producción y consumo de ácido cítrico (×), glicerol (▲), eritrol (*) y trehalosa (●) de 1090 miligramos de glucosa por gramo de poliuretano correspondientes a 300 gramos de glucosa por litro, medio de cultivo 4L.

En este caso, el consumo de glucosa inicial es después de 30 h de cultivo y esta es consumida a una velocidad de 10 mg/gPUF h. El consumo de glucosa durante las 80 h de cultivo fue del 88 %.

El perfil de producción de ácido cítrico y polioles fue muy similar al obtenido con el medio de cultivo con 200 g/L de glucosa. Primero se produce el glicerol, y cuando este alcanza su máxima concentración (10.65 mg/gPUF) inicia la producción de eritrol y ácido cítrico. A diferencia del cultivo con 200 g/L de glucosa, en este caso, el eritrol y ácido cítrico producidos no son consumidos por el microorganismo. Finalmente, la producción de trehalosa inicia después de las 55 h de cultivo, alcanzando su máxima concentración a las 80 h.

En la tabla 10 se resumen los principales resultados obtenidos durante los estudios con concentraciones iniciales de glucosa de 50 a 300 g/L (86 a 1090 mg/gPUF).

Tabla 10. Máxima producción de biomasa de *A. niger* y de metabolitos en medios de cultivo con diferentes concentraciones iniciales de nutrientes en FMS con PUF como soporte inerte*.

	2L	3L	4L
Glucosa inicial (mg/gPUF)	115	410	1090
Glucosa final (mg/gPUF)	0	8	126
Glicerol max. (mg/gPUF)	0	2.9 (30 h)	10.5 (52 h)
Eritrol max. (mg/gPUF)	0	7 (40 h)	36.8 (70 h)
Trehalosa max. (mg/gPUF)	0	3.7 (46 h)	8.0 (80 h)
Ácido cítrico max. (mg/gPUF)	10.16 (30 h)	15.4 (40 h)	36.8 (70 h)
Biomasa máxima (mg/gPUF)	18.2 (24 h)	41.1 (30 h)	69.4 (45 h)
Fase lag (h)	17	18	29

* Las cifras entre paréntesis indican el tiempo al que se obtuvo la máxima concentración de cada uno de los productos indicados.

La producción de metabolitos en el medio 4L es mucho mayor que en el medio 3L, con lo cual podemos establecer que en condiciones mayores de estrés por una alta concentración de glucosa se presenta una mayor producción de osmorreguladores (glicerol y eritrol), de ácido cítrico y de trehalosa.

Así mismo, el tiempo de germinación de las esporas (fase lag) es directamente proporcional a la concentración de glucosa.

Los resultados obtenidos a partir de medios de cultivo con la misma relación de nutrientes pero a diferentes concentraciones, demostraron que con baja concentración de nutrientes (medio 1L) la fuente de carbono se utiliza principalmente para el desarrollo del hongo. En este medio no se detectaron metabolitos extracelulares demostrando que los metabolitos no se producen en concentraciones bajas de glucosa (Córdova, 1994). En el medio 2L con 100 g de glucosa por litro se produce ácido cítrico como único metabolito extracelular detectado. En los medios 3L y 4L se producen también glicerol, eritrol y trehalosa a parte del ácido cítrico. La producción de metabolitos extracelulares (ácido cítrico, glicerol, eritrol y trehalosa) aumenta en función de la concentración de nutrientes en el medio de cultivo. En los medios 3L y 4L se observa que la producción de ácido cítrico y de eritrol inició al obtenerse la máxima concentración de glicerol en el medio de cultivo; por lo que se puede inferir que bajo las condiciones de cultivo utilizadas la fermentación con el medio 2L, la producción de ácido cítrico puede estar asociada a una máxima concentración intracelular de glicerol, que no pudo ser detectada en el medio de cultivo. Estudios realizados por Legisa y Matthey (1986) demostraron que el glicerol a concentración de 0.1 M reduce la actividad de la isocitrato deshidrogenasa hasta en un 90 % aproximadamente, provocando la acumulación del ácido cítrico. Estudios realizados por Córdova (1994) utilizando amberlita como soporte demostraron que la acumulación de ácido cítrico en el medio de cultivo requiere de la producción de glicerol.

En general, trabajos previos (Hang *et al*, 1987; Yong *et al*, 1989; Córdova, 1994; Gutiérrez-Rojas *et al*, 1995; Pintado *et al*, 1997 y 1998; y Infante *et al* 1999) han demostrado que la limitación de nutrientes (excepto la fuente de carbono) estimula la producción de ácido cítrico, particularmente nitrógeno, fierro, magnesio y manganeso.

A partir de los resultados obtenidos en los estudios realizados sobre la producción de ácidos orgánicos y polioles con *A. niger* en FES utilizando poliuretano como soporte, se encontró que la mayor producción de metabolitos (glicerol, eritrol, trehalosa y ácido cítrico) se obtuvo en los medios de cultivo con concentraciones iniciales de glucosa superiores a 200 g/L.

En la figura 6 se presentan los resultados de consumo de glucosa y producción de metabolitos en el medio de cultivo con 300 g/L de glucosa (8L).

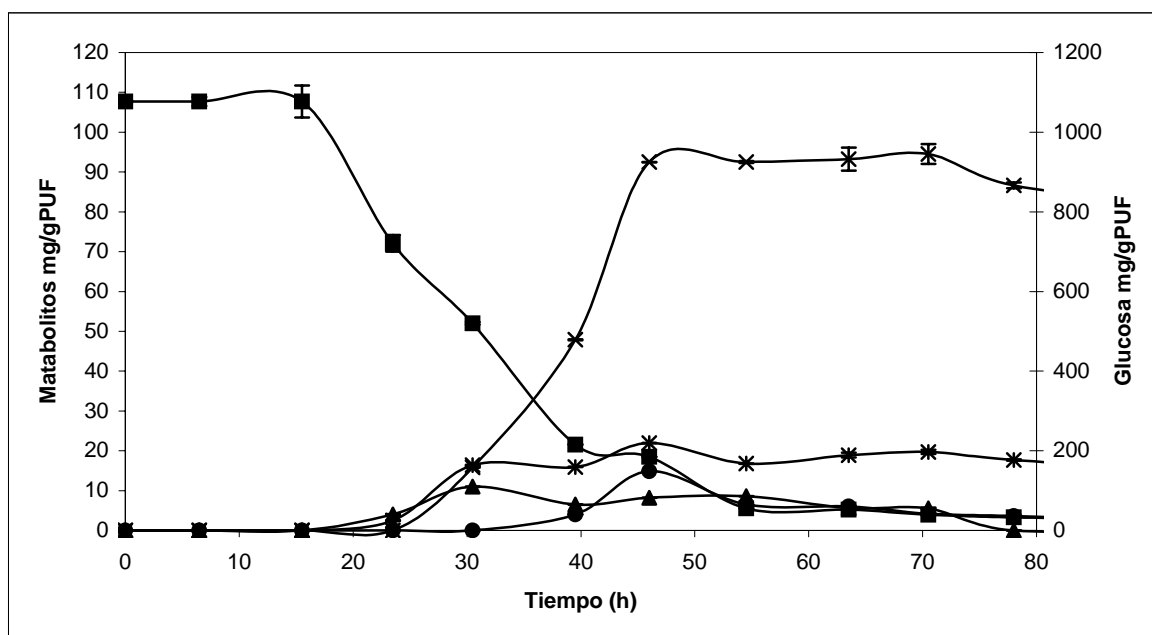


Figura 6. Cinética de consumo de glucosa (■) y producción y consumo de ácido cítrico (X), glicerol (▲), eritrol (*) y trehalosa (●) de 1080 miligramos de glucosa por gramo de poliuretano correspondientes a 300 gramos de glucosa por litro y concentración de iones divalentes y KCl disminuida, medio de cultivo 8L.

Al igual que en el caso interior, el 80 % de la glucosa es consumida en las primeras 40 h de cultivo, alcanzándose un consumo del 98 % al final. La producción de glicerol, eritrol y ácido cítrico inicia entre las 15 y 24 h de cultivo y la producción de trehalosa inicia a las 30 h. El glicerol alcanzó una concentración máxima de 10.9 mg/gPUF a las 30 h, posteriormente, su concentración en el medio de cultivo disminuye hasta su consumo total al final de la fermentación. El eritrol alcanzó una máxima concentración a las 30 h de cultivo, y ésta permanece prácticamente constante hasta el final del mismo. El ácido cítrico alcanza su máxima concentración (94 mg/gPUF) a las 70 h de cultivo, y al igual que el eritrol, el ácido cítrico producido permanece hasta el final. Finalmente, la trehalosa alcanza una concentración máxima de 14.8 mg/gPUF a las 40 h, posteriormente disminuye hasta alcanzar 3.6 mg/gPUF al final del cultivo.

Una vez que se determinó la concentración de fuente de nitrógeno necesaria para la producción de ácido cítrico y polioles en un medio de cultivo con 300 g/L (9L) de glucosa, se procedió a evaluar el efecto de la limitación por Fe^{+2} sobre la producción de metabolitos.

5.2. EFECTO DE LA LIMITACIÓN POR N, FE Y MG SOBRE EL CONSUMO DE GLUCOSA Y LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS

En esta etapa se evaluó el efecto de la disminución de nutrientes minerales (90 %) sobre los perfiles de crecimiento, consumo de sustrato y producción de metabolitos en medios de cultivo con concentraciones iniciales de glucosa de 50 y 100 g/L (medios 5L y 6L). Se seleccionaron estas concentraciones de glucosa, debido a que el consumo de glucosa en ambos fue del 100 %.

En los cultivos con 50 y 100 g/L de glucosa se observó un consumo de glucosa del 51 y 37% respectivamente, debido a una fuerte limitación por nutrientes, particularmente por nitrógeno. En ninguno de los medios ensayados hubo producción de ácido cítrico y polioles.

Estudios similares reportados por Pintado *et al*, (1997) demostraron que medios de cultivo con relación carbono/nitrógeno cercanas a 60, favorecen tanto el consumo de glucosa como la producción de ácido cítrico. En nuestro caso, con los medios utilizados (5L y 6L) se tiene C/N de 134; por lo que la baja concentración de nitrógeno limita considerablemente el consumo de la fuente de carbono, el crecimiento y la formación de polioles y ácidos orgánicos.

5.3. EFECTO DE LA LIMITACIÓN POR Mg^{+2} Y Fe^{+2} SOBRE EL CONSUMO DE GLUCOSA Y LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS

Con base a los resultados obtenidos en los medios limitados por nitrógeno, se evaluó el efecto de la reducción de minerales (Fe^{+2} , Mg^{+2} , K^{+1} y Cl^{-1}), con concentraciones iniciales de glucosa de 200 y 300 g/L, manteniendo una relación C/N de 44.

En la figura 5 se presentan los resultados de consumo de glucosa y producción de metabolitos en el medio de cultivo con 200 g/L de glucosa (7L).

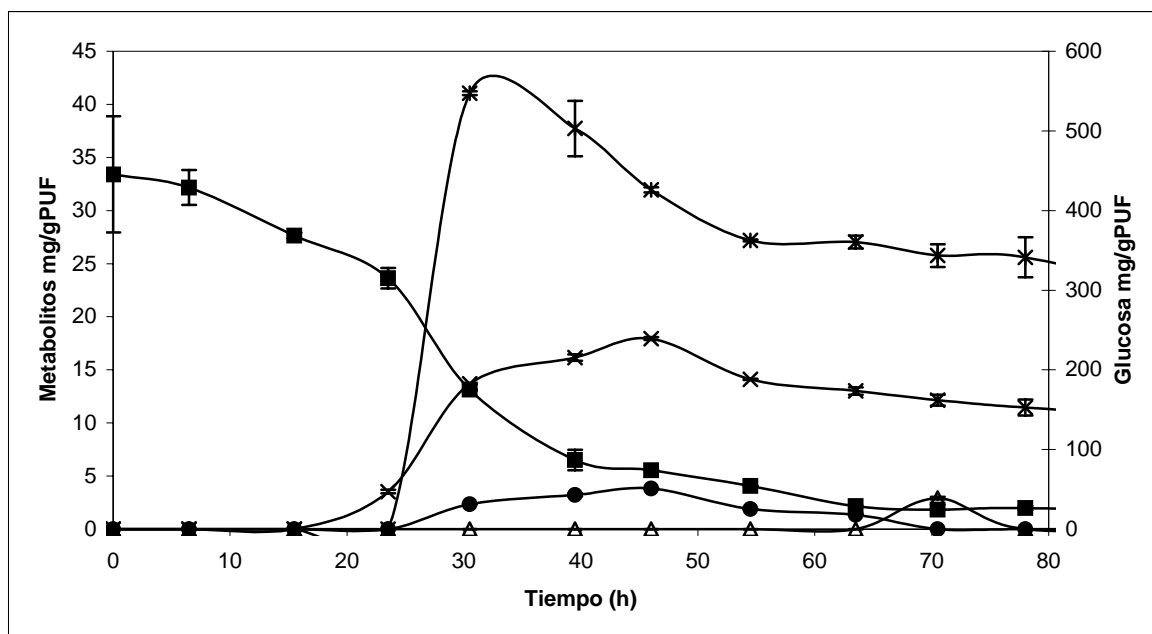


Figura 5. Cinética de consumo de glucosa (■) y producción y consumo de ácido cítrico (×), glicerol (▲), eritrol (*) y trehalosa (●) de 445 miligramos de glucosa por gramo de poliuretano correspondientes a 200 gramos de glucosa por litro y concentración de iones divalentes y KCl disminuida, medio de cultivo 7L.

Al final del cultivo (80 h) se obtuvo el 96 % de consumo de glucosa; sin embargo, a las 40 h de cultivo ya se había consumido el 83 % de la glucosa inicial.

De los productos del metabolismo detectados en el medio de cultivo, el ácido cítrico es el primer metabolito en presentarse en el desarrollo de la fermentación. Su producción inicia a las 16 h, obteniéndose la máxima concentración (18.0 mg/gPUF) a las 55 h de cultivo, posteriormente disminuyó hasta llegar a una concentración final de 11.5 mg/gPUF a las 80 h al final de la fermentación.

El eritrol es el segundo metabolito en producirse durante la fermentación. Su producción inicia a las 24 h de cultivo y alcanza una concentración máxima de 41.1 mg/gPUF a las 30 h, después de este momento empieza disminuir hasta llegar a una concentración final de 25.6 mg/gPUF a las 80 h. La trehalosa es sintetizada como carbohidrato de reserva, ésta se empieza a producir a partir de las 24 h llegando a una concentración máxima de 3.8 mg/gPUF a las 46 h y se consume a las 70 h de fermentación, lo cual nos indica que el hongo empieza a utilizarla como fuente de carbono para su metabolismo. La producción de glicerol bajo estas condiciones de cultivo fue prácticamente nula, sólo se detectó a las 70 h de cultivo a una concentración de 2.9 mg/gPUF, para posteriormente ser metabolizado.

En la figura 7 se presentan la cinéticas de consumo de glucosa y producción de ácido cítrico y polioles por *A. niger* en un medio de cultivo sin adición de Fe^{+2} , medio 9L.

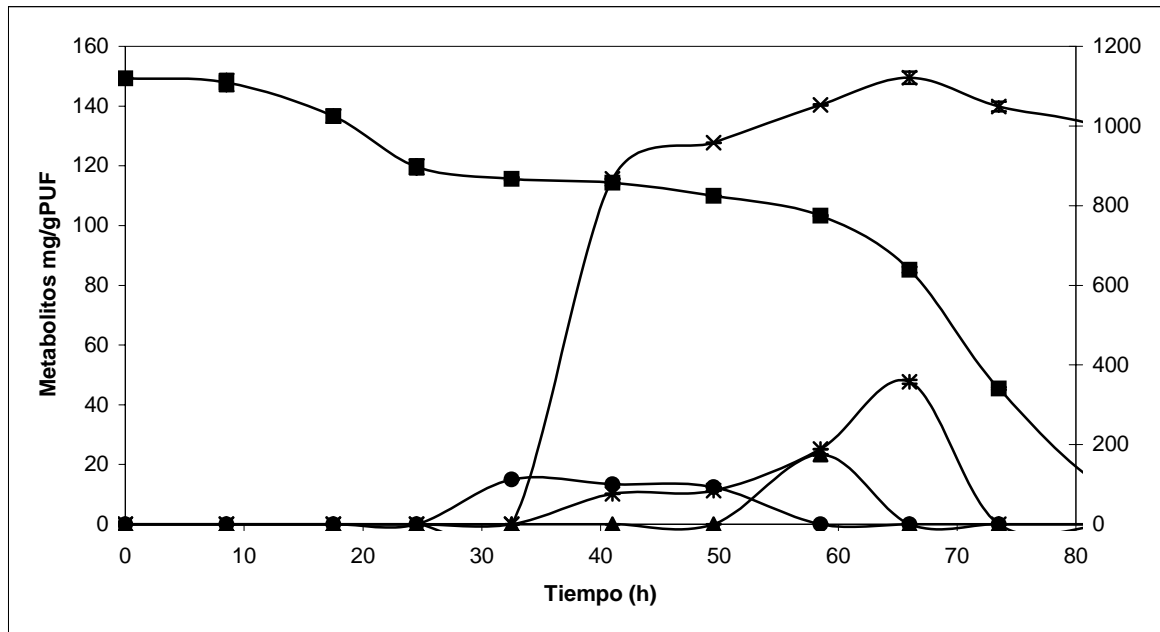


Figura 7. Cinética de consumo de glucosa (■) y producción y consumo de ácido cítrico (×), glicerol (▲), eritrol (*) y trehalosa (●) de 1062 miligramos de glucosa por gramo de poliuretano correspondientes a 300 gramos de glucosa por litro y concentración 0 de FeSO_4 , medio de cultivo 9L.

A pesar de que se obtiene un consumo de glucosa del 93 % en etapas se consume rápidamente a partir de las 50 h de cultivo. En las primeras 16 h de la fermentación se tiene un consumo lento (menor al 4 %), en la segunda de las 16 a las 55 h el consumo es del 25 %, y en las últimas 25 h de fermentación se consume el 48 % de la glucosa inicial.

La producción de trehalosa inicia a las 25 h de cultivo y alcanza su máxima concentración (14.9 mg/gPUF) a las 36 h; permaneciendo constante hasta las 50 h, posteriormente es consumida. La producción de eritrol y de ácido cítrico inicia a las 33 h de cultivo. El eritrol alcanza su máxima concentración (47.6 mg/gPUF) a las 66 h, y es consumido por completo a las 72 h. La máxima concentración de ácido cítrico (149. mg/gPUF) se obtiene a las 66 h de cultivo y permanece constante hasta el final de la fermentación. La acumulación de glicerol en el medio de cultivo inicia a las 50 h, alcanzando su máxima concentración (23.3 mg/gPUF) a las 58 h de cultivo, después de lo cual es metabolizado completamente. Es importante hacer notar que bajo estas condiciones no existe ninguna relación entre la producción del ácido cítrico y la del

glicerol, por tanto también se puede establecer que el glicerol no es el causante de la detención del ciclo de ácidos tricarbóxicos.

En los cultivos realizados en ausencia de Mg^{+2} no se observó crecimiento de *A. niger*. En la tabla 11 se resumen los principales resultados durante los estudios de los medios de cultivo 7L, 8L y 9L.

En los tres medios de cultivo se produjeron los metabolitos esperados, tales como el glicerol, eritrol, ácido cítrico y trehalosa. Por tanto, se establece que para la producción de metabolitos se requiere una alta concentración de glucosa. Bajo estas condiciones de fermentación la producción de metabolitos sigue el mismo patrón hasta hora reportado por Córdova (1994) y Pintado *et al* (1998).

Tabla 11. Máxima producción de biomasa de *A. niger* y de metabolitos en medios de cultivo con diferentes concentraciones iniciales de nutrientes en FMS con PUF como soporte inerte*.

	7L	8L	9L
Glucosa inicial (mg/gPUF)	445	1072	1060
Glucosa final (mg/gPUF)	17.8	32	78
Glicerol max. (mg/gPUF)	2.9 (70 h)	10.9 (30 h)	23.3 (52 h)
Eritrol max. (mg/gPUF)	41.1 (30 h)	21.9 (46 h)	47.6 (66 h)
Trehalosa max. (mg/gPUF)	3.8 (46 h)	14.8 (46 h)	14.9 (32 h)
Ácido cítrico max. (mg/gPUF)	18 (55 h)	94 (70 h)	149 (66 h)
Biomasa máxima (mg/gPUF)	24.9 (30 h)	67.9 (46 h)	40.5 (50 h)
Fase lag (h)	8	31	33

* Las cifras entre paréntesis indican el tiempo al que se obtuvo la máxima concentración de cada uno de los productos indicados.

Como se puede observar claramente la producción de metabolitos en el medio 9L es mucho mayor que en el medio 7L y 8 L, con lo cual podemos establecer que en condiciones de limitación de iones se obtiene una mayor concentración de metabolitos excepto de trehalosa. Es importante remarcar que la ausencia de Fe^{+2} en el medio de cultivo es uno de los factores más importante para la acumulación y producción de

ácido cítrico. Otro posible factor se encuentra en la concentración de los iones presentes en la formulación.

Bajo las condiciones de cultivo de los medios 7L y 8L, la producción de ácido cítrico es independiente de la producción de glicerol. En el medio de cultivo con 200 g/L de glucosa (7L) la producción de ácido cítrico tiene lugar sin que se acumule glicerol en el medio de cultivo. Por otra parte, en el medio de cultivo con 300 g/L (8L) de glucosa la producción de ácido cítrico y glicerol inician al mismo tiempo, por lo que no se observa que la acumulación de ácido cítrico dependa de una concentración alta de glicerol, tal y como lo determinaron Legisa y Matthey (1986) para fermentaciones líquidas y Córdova (1994) para FES utilizando amberlita como soporte.

Los resultados obtenidos demuestran que el eritrol es el poliol de mayor importancia dentro de la osmoregulación causada por el estrés de altas concentraciones de glucosa en FES utilizando poliuretano como soporte.

Nuestros resultados rompen con el esquema establecido por los estudios realizados anteriormente en donde indican que el glicerol es la pauta para la acumulación del ácido cítrico. Excepto por lo propuesto por Arisan-Atac y Kubicek (1996), quién establece que el glicerol no inhibe la enzima isocitrato–deshidrogenasa NADP-dependiente con lo cual la acumulación de ácido cítrico no depende de la presencia de glicerol, sino de la presencia de algunos de los metales en el medio de cultivo. Infante *et al* (1999) proponen que los metales juegan un papel muy importante dentro de la fermentación de *A. niger*. El cobre, el manganeso y el zinc ejercen un efecto activador en la enzima isocitrato deshidrogenasa NADP-dependiente del ciclo de ácidos tricarbóxicos, en tanto que el calcio tiene un efecto inhibitorio en la enzima.

En el caso de la fermentación con 300 g/L de glucosa (medio 8L), el inicio de la producción de glicerol y de ácido cítrico se da al mismo tiempo. Al parecer en ésta fermentación tampoco existe la influencia del glicerol sobre la isocitrato deshidrogenasa NADP dependiente debido a que si empiezan al mismo tiempo la inhibición de la enzima no es por la presencia del glicerol en el medio es por otra causa y la acumulación de ácido cítrico depende de otro factor.

La dependencia del glicerol sobre la enzima isocitrato deshidrogenasa esta directamente relacionada con la formulación del medio de cultivo y la concentración de cada uno de los minerales, por tanto se planeó la siguiente y ultima etapa de experimentos en donde se elimina totalmente uno de los iones divalentes o ambos.

Los resultados obtenidos de estos experimentos contradicen los estudios realizados anteriormente, los cuales indican que el glicerol es la pauta para la acumulación del ácido cítrico, por tanto se establece que en FMS la acumulación del ácido cítrico requiere de concentraciones limitantes de N (C/N=44), Mg (C/Mg=2090) y Fe (C/Fe=1780). Incluso la exclusión de la fuente de Fe^{+2} del medio de cultivo (medio 9L), no limita completamente el crecimiento, ni la producción de ácido cítrico y polioles.

Se establece que la acumulación del ácido cítrico esta determinada por la concentración de iones Fe^{+2} y Mg^{+2} presentes en el medio. También nos establece que sin la presencia del magnesio *A. niger*, es incapaz de sobrevivir, en cambio sin la presencia de hierro existe una mayor acumulación de ácido cítrico.

6. CONCLUSIONES

- Los estudios realizados con diferentes concentraciones de glucosa demostraron que la producción de metabolitos sólo se da a concentraciones altas de glucosa (mayores a 200 g/L). Bajo estas condiciones, el glicerol es el causante de la acumulación de ácido cítrico en medios de cultivo con bajo altas concentraciones de iones divalentes.
- La ausencia de fierro y con bajas concentraciones de magnesio (magnesio 0.284 g/L) es el que origina la acumulación de ácido cítrico; bajo estas condiciones, la producción de ácido cítrico es independiente de la producción y acumulación de glicerol.
- El eritrol es el osmoregulador mas importante en FES utilizando poliuretano como soporte, con altas concentraciones de glucosa .

7. REFERENCIAS

1. Aguilar, CN; Augur, C; Favela-Torres, E y Viniestra-Gonzales G. (2001). Production of tannase by *Aspergillus niger* Aa20 in submerged and solid-state fermentation: influence of glucose and tannic acid. *J. Ind. Microbio. Biotechnol.*: 26, 296-302.
2. Aisan-Atac Inci and Kubicek P. C. (1996). Glycerol is not an inhibitor of mitochondrial citrate oxidation by *Aspergillus niger*. *Microbiology.*: 142, 2937-2942.
3. Adler L., Anders B. and Anders N. (1985). Glycerol metabolites and osmoregulation in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *J. Bacteriol.*: 162, 300-306.
4. Andreas F., Wolfgang B., Brigitte M. and Franz S. (1993). Influence of medium components and metabolic inhibitors on citric acid production by *Penicillium simplicissimum*. *J. Gen. Microbiol.*: 1993, 2101-2107.
5. Auria, R.; Hernandez S.; Villegas E.; y Revah S. (1993). Influence of mold growth on the pressure drop in aerated solid state fermentation of *Aspergillus niger*. *Biotechnol, Bioeng.*: 41, 1007-1013.
6. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*: 72, 248-254.
7. Byers B. R. and Arceneaux J. E. (1975). Microbial Transport and utilization of iron. *Microorganism and minerals*. Vol 3 Wainber, E.D. USA.
8. Córdova, 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. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana, México.
9. Córdova-López J. M. Gutiérrez-Rojas, S Huerta, G Saucedo-Castañeda and E. Favela-Torres. (1996). Biomass estimation of *Aspergillus niger* growing on real and model supports in solid-state fermentation. *Biotechnol Tech.*: 10: 1-6.
10. Dawson M. W. and Maddox I. S. (1988). Application of fed-batch culture to citric acid production by *Aspergillus niger*: The effects of dilution rate and dissolved oxygen tension. *Biotechnol. Bioeng.*: 32, 220-226.

11. Dawson M. W. and Maddox I. S. (1989). Evidence for nitrogen catabolite repression during citric acid production by *Aspergillus niger* under phosphate-limited growth conditions. *Biotechnol. Bioeng.*: 33, 1500-1504.
12. Ding-Bang X., Cynthia P. M., Rohr M. and C. P. Kibicek (1989). The influence of type and concentration of the carbon source on production of citric acid by *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*: 30, 553-558.
13. Gancedo, C., J. M. Gancedo and Sols A. (1968). Glycerol metabolism in yeast's. *Eur. J. Biochem.*: 5, 165-172.
14. Gutiérrez-Rojas M., Cordova J., Auria R., Revah S., and Favela-Torres E. (1995). Citric acid and polyos production by *Aspergillus niger* at high glucose concentration in solid state fermentation on inert support. *Biotechnol. Lett.*: 17, 219-224.
15. Hang Y. D., Luh B. S. And Woodams E. E. (1987). Microbial production of citric acid by solid state fermentation of Kiwifruit peel. *Enzyme Microb. Technol.*: 52, 226-227.
16. Harald M., Kubicek C. P., and Rohr M. (1985). Formation and location of glucose oxidase in citric acid producing mycelia of *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol.*: 21, 27-31.
17. Infante M. M. V., Aguirre S. N. y Danley A. S. (1999). Estudios del efecto in vitro e in vivo de ciertos metales sobre la actividad isocitrato deshidrogenasa de una cepa de *Aspergillus wentii* productora de ácido cítrico. IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería.
18. Jaehoon-Choe and Young Je Yoo (1991). Effect of ammonium ion concentration and application to fed-batch culture for overproduction of citric acid. *J. Ferm. Biochnol.*: 72, 106-109.
19. Johnson E. A., Levine R. L. And Lin C. C. (1985). Inactivation of glycerol deshidrogenase of *Klebsiella pneumoniae* and the role of divalent cations. *J. Bacteriol.*: 164, 479-483.
20. Legisa M. And Mattey. (1986a). Glycerol as an initiator of citric acid accumulation in *Aspergillus niger*. *Enzyme Microb. Technol.*: 8, 258-259.
21. Legisa M. And Mattey. (1986b). Glycerol synthesis by *Aspergillus niger* under citric acid accumulating conditions. *Enzyme Microbial Technol.*: 8, 607-609.
22. MacKenzie Donal, Jeenes David, Gou X. and Archer D. B. (2003). Molecular basis of glucoamylase overproduction by a mutagenised industrial strain of *Aspergillus niger*. *Enzyme Microbial Technol.*: 29, 193-200.

23. Marina A. Y. Aoki, Glauca M. Pastore and Yong K. Park (1993). Microbial transformation of sucrose and glucose to erythritol. *Biotechnol. Letters*, 15, 383-388.
24. Mudgett E. R. (1986). Solid state fermentation. *Microbiology and Biotechnology*: 66-83.
25. Pandey A. (1992). Recent process developments in solid state fermentation. *Process Biochem.*: 27. 109-117.
26. Patrus J. van Z., Bernard A. P. and Stephanus G. K. (1991). Regulation of glycerol metabolism in *Zygosaccharomyces rouxii* in response to osmotic stress. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*: 36, 369-374.
27. Peralta, R. (1996). Efecto de la concentración de iones en el crecimiento y la producción de ácido cítrico en *Aspergillus niger* por fermentación en estado sólido. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana, México.
28. Pintado A., Torrado M. P, González and Murado M. A. (1997). Interactions between pretreatment and nutrient concentrations of muced processing effluents for citric acid production. *Enzyme Microb. Technol.*: 20, 544-549.
29. Pintado A., Torrado M. P, González and Murado M. A. (1998). Optimization of nutrient concentration for citric acid production by solid-state culture of *Aspergillus niger* on polyurethane foams. *Enzyme Microb. Technol.*: 23, 149-156.
30. Ralp J. A. (1976). Solid substrate fermentation's. *Food Technol.*: 28, 247-251.
31. Reed R. H., Chudek J.A., Foster R. and Geoffrey M. (1987). Gad Osmotic significance of glycerol accumulation in exponentially growing yeast's. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*: 53, 2119-2123.
32. Ross E. B. and Laracy R. E. (1986). Osmotic adjustment in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.*: 168, 1358-1365.
33. Roukas T. And Kotzekidou P. (1986). Influence of some trace metals and stimulants on citric acid production from brewery wastes by *Aspergillus niger*. *Enzyme Microb. Techno.*: 9, 291-294.
34. Sannaa H. O., Siegfried H. and Hans-Jurgen R. (1992). A comparative study on the formation of citric acid and polyols and on morphological changes of three strains of free and immobilizad *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*: 36, 518-524.
35. Shan N. K., Ramamurth V. and Kothar R. M. (1991). Comparative production by sudmerged and surfafe fermentation. *Biotechnol. Lett.*: 13, 361-364.

36. Shankaranand V. S. and Lonsane B. K. (1994). Ability of *Aspergillus niger* to tolerate metal ions and minerals in solid state fermentation for the productions of citric acid. *Process. Biochem.*; 29, 29-37.
37. Torres N. V. (1994a). Modeling approach to control of carbohydrate metabolism during citric acid accumulation by *Aspergillus niger*: I. Model definition and stability of the steady state. *Biotechnol. Bioeng.*: 44, 104-111.
38. Torres N. V. (1994b). Modeling approach to control of carbohydrate metabolism during citric acid accumulation by *Aspergillus niger*: II. Sensitivity analysis. *Biotechnol. Bioeng.*: 44, 112-116.
39. Visser, J. (1991). Biochemical and molecular approaches in understanding carbohydrate metabolism in *Aspergillus niger*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*: 50: 111-113.
40. Voet D., y Voet J. (1992). *Bioquímica*. Ed. Omega. J. Bozal Fes, C. Cuchillo Foix y J. Farrés Vincén. Barcelona, España.
41. Yong Hee L., Chang Woo L. and Ho Nam Chang (1989). Citric acid production by *Aspergillus niger* immobilized on polyurethane foam. *Appl Microbiol Biotechnol.*: 30, 141-143.
42. Zhu Y., Smits J.P, Knol W. and Bol J. (1994). A novel solid-state fermentation system using polyurethane foam as inert carrier. *Biotechnol. Lett.*: 16, 643-648.