

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA**



**Producción de ácido cítrico por *Aspergillus brasiliensis* en  
fermentación en estado sólido**

Tesis

Que para obtener el grado de

**Doctor en Biotecnología**

Presenta

**Christian Jesús Mora Pérez**

Director

**Dr. Ernesto Favela Torres**

Asesores

**Dr. Gustavo Viniegra González**

**Dr. Roberto Olivares Hernández**

Ciudad de México a 19, abril 2024

**“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Sistema Nacional de Posgrado (SNP, antes Programa Nacional de Posgrados de Calidad o PNPC) del CONAHCYT con la referencia 001466”**

Ciudad de México a 19 de abril del 2024

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

**Producción de ácido cítrico por *Aspergillus brasiliensis* en fermentación en  
estado sólido**

Presentó

Christian Jesús Mora Pérez

Director: Dr. Ernesto Favela Torres

Asesor: Dr. Gustavo Viniegra González

Asesor: Dr. Roberto Olivares Hernández

Jurado:

Presidente: Dr. Héctor Bernardo Escalona Buendía 

Secretario: Dr. Roberto Olivares Hernández 

Vocal: Dra. Mayola García Rivero 

Vocal: Dr. Gerardo Díaz Godínez 

## Agradecimientos

A mis padres, Felipe Mora y Flor Pérez, por apoyarme en todos los momentos de mi vida. A mi padre cuanto más crezco, más te comprendo y más quiero darte las gracias por todo lo que has hecho por mí. A mi madre eres mi fuente de inspiración, mi modelo a seguir y mi consejera en la vida. Los quiero mucho.

A Ernesto, cuando el agradecimiento es mucho, las palabras son pocas para expresar todo lo que un alumno siente en su corazón. Siento que más que un profesor, te has convertido en un guía, amigo y maestro. Llevaré por siempre el recuerdo de la huella que tu presencia dejó en mi vida y nunca lo olvidaré. Me has enseñado, pero mejor aún, me has inspirado. ¡Muchas gracias por todo!

A mi familia, mis abuelos, tíos, primos, a Dani mi hermana, no podría haber llegado hasta donde estoy sin su amor y dedicación. Gracias por ser mi hogar.

A mis asesores, Dr. Gustavo Viniegra y Dr. Roberto Olivares por participar en el desarrollo de mi tesis doctoral, contribuyendo con sus grandes ideas.

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

A mis amigos (Pau, Eduardo, Gerardo, Victor, Mafer, Carlitos, Luisa), mi gratitud hacia ustedes es infinita, por compartir momentos inolvidables, por sus consejos y por su amor. Gracias por ser mi familia elegida.

A mi hija Abril, quien ha sido mi mayor motivación para nunca rendirme y poder llegar a ser un ejemplo para ella. ¡Cumple tus sueños!

A Brenda, gracias por ser mi confidente, mi consejera y mi mejor amiga. Eres mi apoyo en los momentos difíciles y mi cómplice en los momentos divertidos. ¡Te amo con todo mi corazón!

## Dedicatorias

Juan Pérez Munive  
Leticia Martínez Ilizaliturri

*En la vastedad del espacio y en la inmensidad del tiempo.*

## Resumen

El ácido cítrico se produce industrialmente por fermentación en estado líquido utilizando hongos del género *Aspergillus*; sin embargo, este proceso depende en gran medida de la composición del medio de cultivo. Por otro lado, la producción de ácido cítrico por fermentación en estado sólido es más robusta en términos fisiológicos y nutricionales, favoreciendo el crecimiento y permitiendo el desarrollo de procesos más productivos. Tradicionalmente, la fermentación en estado sólido utiliza residuos agroindustriales; sin embargo, esto provoca problemas operativos relacionados con la composición química del medio y problemas analíticos para la cuantificación de sustrato, biomasa y de recuperación de productos. Por ello, una alternativa es el uso de soportes inertes como la espuma de poliuretano, ya que tiene una alta capacidad de retención de agua (hasta 60 veces su peso), permitiendo recuperar productos concentrados, ya que no es necesario añadir agentes de extracción como ocurre con el uso de residuos agroindustriales como sustrato. El uso de espuma de poliuretano impregnada con un medio definido permite diseñar condiciones de cultivo precisas para la producción de ácido cítrico. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la composición del medio de cultivo definido sobre la producción de ácido cítrico por *A. brasiliensis* cuando crece sobre espuma de poliuretano aprovechando las ventajas de la FES. Para esto, se utilizó un enfoque estadístico basado en diseños factoriales para incrementar la producción de ácido cítrico. Como resultado, los rendimientos máximos de ácido cítrico y polioles a partir de glucosa como fuente de carbono fueron 0.62 Cmol/Cmol y 0.11 Cmol/Cmol respectivamente. La producción de ácido cítrico y el consumo de sustrato se vieron afectados negativamente por la concentración hipertónica de glucosa en el medio (>150 mg/mL). Adicionalmente, se determinó que los elementos traza ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Mo}^{2+}$ ) tienen influencia negativa (> 0.016 mg/mL) sobre la producción de ácido cítrico, polioles y biomasa. Hasta donde sabemos, este trabajo reporta el mayor rendimiento de producción de ácido cítrico en fermentación en medio sólido sobre espuma de poliuretano con un medio de cultivo definido.

## Abstract

Citric acid is industrially produced by liquid-state fermentation using fungi of the genus *Aspergillus*; however, this process heavily relies on the composition of the culture medium. On the other hand, citric acid production by solid-state fermentation is more robust in physiological and nutritional terms, favoring the growth and enabling the development of more productive processes. Traditionally, solid-state fermentation employs agro-industrial residues; however, this causes operational issues related to the chemical composition of the medium and analytical problems for substrate, biomass, and product recovery analysis. Therefore, an alternative is the use of inert supports such as polyurethane foam, which has a high-water retention capacity (up to 60 times its weight), allowing the recovery of concentrated products without the need to add extraction agents as required with agro-industrial residues as substrates. The use of polyurethane foam impregnated with a defined medium allows for the design of precise cultivation conditions for citric acid production. The objective of this work was to evaluate the effect of the composition of the defined culture medium on citric acid production by *A. brasiliensis* when grown on polyurethane foam, taking advantage of the benefits of solid-state fermentation. For this purpose, a statistical approach based on factorial designs was used to enhance citric acid production. As a result, the maximum yields of citric acid and polyols from glucose as a carbon source were 0.62 Cmol/Cmol and 0.11 Cmol/Cmol respectively. Citric acid production and substrate consumption were negatively affected by the hypertonic concentration of glucose in the medium (>150 mg/mL). Additionally, it was determined that trace elements ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Mo}^{2+}$ ) have a negative influence (>0.016 mg/mL) on citric acid, polyols, and biomass production. To the best of our knowledge, this work reports the highest citric acid production yield in solid-state fermentation on polyurethane foam with a defined culture medium.

## Contenido

<b>1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Antecedentes .....</b>	<b>3</b>
2.1. Hongos filamentosos.....	3
2.2. <i>Aspergillus brasiliensis</i> .....	3
2.3. Producción de ácido cítrico por <i>Aspergillus niger</i> .....	4
2.4. Mecanismos de regulación del metabolismo .....	6
2.5. Regulación del metabolismo de carbohidratos .....	6
2.6. Regulación del metabolismo en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos.....	9
2.7. Metabolismo y producción de polioles.....	11
2.8. Factores ambientales que afectan la producción de ácido cítrico.....	14
2.8.1. Fuente y concentración de macronutrientes.....	14
2.8.2. pH.....	16
2.8.3. Aireación .....	16
2.8.4. Elementos traza .....	17
2.8.5. Alcoholes.....	19
2.9. Fermentación en estado sólido .....	20
2.10. Tipos de soportes utilizados en fermentación en estado sólido .....	21
2.11. Espuma de poliuretano como modelo de estudio para procesos de FES .....	21
2.12. Comparación de los procesos de FES y FEL.....	22
2.12.1. Comparación de los procesos de FES y FEL para la producción de ácido cítrico.....	24
<b>3. Justificación.....</b>	<b>26</b>
<b>4. Hipótesis .....</b>	<b>26</b>
<b>5. Objetivo .....</b>	<b>27</b>
5.1. General .....	27
5.2. Específicos .....	27

<b>6.</b>	<b><i>Materiales y métodos</i></b> .....	<b>28</b>
6.1.	Microorganismo.....	28
6.2.	Activación y propagación de <i>Aspergillus spp.</i> ....	28
6.3.	Soporte y unidad experimental .....	29
6.4.	Medio de cultivo para la FES .....	29
6.5.	Fermentación en estado sólido .....	29
6.6.	Obtención del extracto celular .....	30
6.7.	Métodos analíticos.....	30
6.7.1.	pH.....	30
6.7.2.	Biomasa .....	30
6.7.3.	Cuantificación de glucosa y metabolitos extracelulares.....	31
6.8.	Determinación del rendimiento .....	31
6.9.	Análisis estadístico.....	31
6.10.	Diseño experimental .....	32
6.10.1.	Efecto del microorganismo y la adición de metanol sobre la producción de ácido cítrico..	32
6.10.2.	Efecto del pH sobre la producción de ácido cítrico.....	33
6.10.3.	Efecto de la concentración de glucosa y pH sobre la producción de ácido cítrico.....	33
6.10.4.	Efecto de la composición del medio de cultivo sobre la producción de ácido cítrico.....	34
6.10.5.	Efecto de la concentración de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , MgSO <sub>4</sub> y una solución mineral con glucosa sobre la producción de ácido cítrico.....	35
6.10.6.	Efecto de la concentración de elementos traza y extracto de levadura sobre la producción de ácido cítrico .....	36
<b>7.</b>	<b><i>Resultados y discusión</i></b> .....	<b>37</b>
7.1.	Efecto del microorganismo y la adición de metanol sobre la producción de ácido cítrico .....	37
7.1.1.	Validación del diseño experimental.....	41
7.2.	Efecto del pH sobre la producción de ácido cítrico.....	44
7.3.	Efecto de la concentración de glucosa y pH sobre la producción de ácido cítrico .....	48
7.3.1.	Validación del diseño experimental.....	52

<b>7.4.</b>	<b>Efecto de la composición del medio de cultivo sobre la producción de ácido cítrico ..</b>	<b>55</b>
7.4.1.	Validación del diseño experimental.....	59
<b>7.5.</b>	<b>Efecto de la concentración de <math>K_2HPO_4</math>, <math>MgSO_4</math> y una solución mineral con glucosa sobre la producción de ácido cítrico ..</b>	<b>62</b>
7.5.1.	Validación del diseño experimental.....	66
<b>7.6.</b>	<b>Efecto de la concentración de elementos traza y extracto de levadura sobre la producción de ácido cítrico.....</b>	<b>69</b>
7.6.1.	Validación del diseño experimental.....	72
<b>8.</b>	<b><i>Conclusión</i>.....</b>	<b>75</b>
<b>9.</b>	<b><i>Perspectivas</i> .....</b>	<b>76</b>
<b>10.</b>	<b><i>Bibliografía</i>.....</b>	<b>77</b>

## Contenido de figuras

<b>Figura 1.</b> Proceso metabólico de <i>A. niger</i> para la producción de ácido cítrico.....	11
<b>Figura 2.</b> Producción de polioles en <i>A. niger</i> .....	13

## Ecuaciones

<b>Ecuación 1.</b> Para la determinación de rendimiento en base Cmol.....	31
---	----

## Contenido de gráficos

<b>Gráfica 1.</b> Análisis cinético de pH (A) y biomasa (B) de <i>A.niger</i> y <i>A. brasiliensis</i> en fermentación en estado sólido ante variaciones de microorganismo y adición de metanol. ....	38
<b>Gráfica 2.</b> Análisis cinético de la producción de ácido cítrico (A), consumo de glucosa (B), glicerol (C) y eritrol (D) de <i>A.niger</i> y <i>A. brasiliensis</i> en fermentación en estado sólido ante variaciones de cepa y adición de metanol al medio. ....	39
<b>Gráfica 3.</b> Diagramas de Pareto para analizar los factores que influyen en la producción de ácido cítrico (A), eritrol (B) y glicerol (C) en cultivo sólido, específicamente en relación con la cepa y la adición de metanol. Para el factor cepa se utiliza el color gris para representar la cepa <i>A. brasiliensis</i> y el color azul para <i>A. niger</i> .....	41
<b>Gráfica 4.</b> Gráfica de interacción de los factores principales que afectan la producción de ácido cítrico (A), eritrol (B) y glicerol (C) en cultivo sólido. Se utiliza el valor +1 para representar la cepa <i>A. brasiliensis</i> y el valor -1 para <i>A. niger</i> . En cuanto al factor metanol, se utiliza el valor +1 para indicar una concentración del 3% (v/v) y el valor -1 para indicar una concentración del 0% (v/v). ....	42
<b>Gráfica 5.</b> Análisis cinético de pH (A) y biomasa (B) de <i>A. brasiliensis</i> en FES ante variaciones de pH inicial. .	45
<b>Gráfica 6.</b> Análisis cinético de la producción de ácido cítrico (A), glicerol (B) y consumo de glucosa (C) de <i>A. brasiliensis</i> en FES ante variaciones de pH inicial.....	46
<b>Gráfica 7.</b> Análisis cinético de pH (A) y biomasa (B) de <i>A. brasiliensis</i> en FES ante variaciones de concentración inicial de sustrato y pH. ....	49
<b>Gráfica 8.</b> Análisis cinético de la producción de ácido cítrico (A), consumo de glucosa (B), glicerol (C) y eritrol (D) de <i>A. brasiliensis</i> en FES ante variaciones de concentración de glucosa y pH inicial. ....	51
<b>Gráfica 9.</b> Diagramas de Pareto para analizar los factores que influyen en la producción de ácido cítrico (A), eritrol (B) y glicerol (C) en cultivo sólido, específicamente en la concentración de glucosa y el pH inicial.. ....	52

<b>Gráfica 10.</b> Gráfica de interacción de los factores principales que afectan la producción de ácido cítrico (A), eritrol (B) y glicerol (C) en cultivo sólido. Los valores de 100 y 200 (mg/mL) corresponden al factor de concentración inicial de glucosa, mientras que 3.5 y 4.5 indican el valor de pH a los cuales se intentó ajustar el medio de cultivo.....	53
<b>Gráfica 11.</b> Análisis de pH final de <i>A. brasiliensis</i> en FES ante variaciones de la composición del medio de cultivo.....	56
<b>Gráfica 12.</b> Efectos estimados obtenidos a partir del DFC en el rendimiento de ácido cítrico, biomasa, eritrol, glicerol y consumo de glucosa, de acuerdo con los resultados experimentales (*el efecto es significativo al 95% de nivel de confianza). El efecto del factor glucosa en el consumo de glucosa fue dividido entre cien. SM representa la solución mineral. ....	60
<b>Gráfica 13.</b> Análisis de pH de <i>A. brasiliensis</i> en condiciones de FES ante variaciones de la concentración de $K_2HPO_4$ , $MgSO_4$ y una solución mineral con glucosa.....	63
<b>Gráfica 14.</b> Efectos estimados obtenidos a partir del DFF en el rendimiento de ácido cítrico, biomasa, eritrol, glicerol y consumo de glucosa, de acuerdo con los resultados experimentales (*el efecto es significativo al 95% de nivel de confianza). SMCG representa la solución mineral que contiene glucosa. ....	67
<b>Gráfica 15.</b> Análisis de pH de <i>A. brasiliensis</i> en condiciones de FES ante variaciones de la concentración de los elementos traza y extracto de levadura.....	70
<b>Gráfica 16.</b> Efectos estimados obtenidos a partir del DFC sobre el rendimiento de ácido cítrico, biomasa, eritrol, glicerol y consumo de glucosa, de acuerdo con los resultados experimentales (*el efecto es significativo al 95% de nivel de confianza). SMCG representa la solución mineral. ....	72

## Contenido de tablas

<b>Tabla 1.</b> Enzimas reguladoras del metabolismo de carbohidratos.....	8
<b>Tabla 2.</b> Reacciones enzimáticas en el CAT .....	10
<b>Tabla 3.</b> Análisis comparativo entre condiciones de FES y FEL.....	23
<b>Tabla 4.</b> Ventajas y desventajas de la FES y FEL para la producción de ácido cítrico. ....	25
<b>Tabla 5.</b> Diseño factorial $2^2$ , utilizado para determinar el efecto del microorganismo y la adición de metanol sobre la producción de metabolitos.La concentración de metanol (B) esta dada en % (v/v).....	32
<b>Tabla 6.</b> Diseño factorial $2^2$ , utilizado para determinar el efecto de la concentración de sustrato y pH sobre la producción de metabolitos.La concentración de glucosa (A) esta dada en mg/mL. ....	33
<b>Tabla 7.</b> Diseño factorial $2^{6-2}$ , utilizado para determinar el efecto de la composición del medio de cultivo sobre la producción de metabolitos.La concentración de los factores esta dada en mg/mL.....	34

<b>Tabla 8.</b> Diseño factorial 2 <sup>3</sup> , utilizado para determinar el efecto de la concentración de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O y una solución mineral con glucosa sobre la producción de metabolitos.La concentración de los factores esta dada en mg/mL.....	35
<b>Tabla 9.</b> Diseño factorial 2 <sup>2</sup> , utilizado para determinar efecto de la concentración de elementos traza y extracto de levadura sobre la producción de metabolitos.La concentración de los factores esta dada en mg/mL. ....	36
<b>Tabla 10.</b> Máximo rendimiento de ácido cítrico en FES por etapa.....	47
<b>Tabla 11.</b> Máximo rendimiento de ácido cítrico en FES por etapa.....	54
<b>Tabla 12.</b> Balance de carbono en Cmol por Cmol de glucosa consumida .....	58
<b>Tabla 13.</b> Máximo rendimiento de ácido cítrico en FES por etapa.....	61
<b>Tabla 14.</b> Balance de carbono en Cmol por Cmol de glucosa consumida .....	64
<b>Tabla 15.</b> Máximo rendimiento de ácido cítrico en FES por etapa.....	68
<b>Tabla 16.</b> Balance de carbono en Cmol por Cmol de glucosa consumida .....	71
<b>Tabla 17.</b> Máximo rendimiento de ácido cítrico en FES por etapa.....	74

## Glosario de abreviaturas

$\mu\text{m}$	micrómetro
6PFK	6-fosfofructoquinasa
6PGDH	6-fosfogluconato deshidrogenasa
ADP	Adenosín difosfato
AMP	Adenosín monofosfato
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosín trifosfato
CAT	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
CGDH	$\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa
cm	Centímetro
Cmol	Carbono mol
CoA	Coenzima A
DFC	Diseño factorial completo
DFF	Diseño factorial fraccionado
E4P	Eritrosa-4-fosfato
EMP	Embden-Meyerhof-Parnas
F6P	Fructosa-6-fosfato
FAD	Flavina adenina dinucleótido
FBP	Fructosa-1-6-bifosfato
FEL	Fermentación en estado líquido
FES	Fermentación en estado sólido
g	Gramo
G6P	Glucosa-6-fosfato
h	altura
ICDH	Isocitrato deshidrogenasa
kg	Kilogramo
L	Litro
$\text{m}^3$	Metro cúbico

mg	Miligramo
mL	Mililitro
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
PFK	Fosfo fructoquinasa
PGI	fosfoglucoisomerasa
pH	Potencial de hidrógeno
PP	Pentosas fosfato
ppm	Partes por millón
r	radio
SM	Solución mineral
SMCG	Solución mineral con glucosa
spp	Especie
USD	Dólar estadounidense
V	Volumen
YPDA	Yeast-Peptone-Dextrose-Agar

## 1. Introducción

Los hongos filamentosos se utilizan ampliamente en la industria para producir ácidos orgánicos, proteínas heterólogas y enzimas de uso industrial (Troiano *et al.*, 2020). Con relación a la producción de ácidos orgánicos, el ácido cítrico es uno de los más importantes porque se utiliza en la industria de alimentos, bebidas, química, detergentes, farmacéutica, cosmética, entre otras (Majumder *et al.*, 2010; Campanhol *et al.*, 2019). La industria alimentaria representa alrededor del 70% del consumo mundial de ácido cítrico y se espera que alcance los 3.9 billones de USD para 2024 (Behera *et al.*, 2021; Reena *et al.*, 2022). El ácido cítrico (ácido 2-hidroxi-propano-1,2,3-tricarboxílico) es un metabolito intermediario del ciclo de ácidos tricarboxílicos o también conocido como ciclo de Krebs, liberando energía de carbohidratos, grasas y proteínas a través de la oxidación de acetyl-CoA (Adeoye *et al.*, 2015). El ácido cítrico se produce industrialmente utilizando hongos de género *Aspergillus* mediante un proceso de fermentación en medio líquido (FEL); sin embargo, este tipo de cultivo depende en gran medida de la composición del medio de cultivo (Show *et al.*, 2015). Por otro lado, la producción de ácido cítrico por fermentación en medio sólido (FES) es más robusta en términos nutricionales, favorece el crecimiento de *Aspergillus brasiliensis* y permite el desarrollo de procesos más productivos (Behera *et al.*, 2021). Los procesos de FEL alcanzan un mayor rendimiento de ácido cítrico en comparación con la FES (Karaffa & Kubicek, 2003). Muchos estudios han tratado de aumentar el rendimiento de ácido cítrico en condiciones de FES; no obstante, ninguno de ellos ha alcanzado rendimientos superiores a 0.55 Cmol/Cmol a partir de glucosa como fuente de carbono. En promedio el rendimiento de producción de ácido cítrico en FES es alrededor de 0.30 Cmol/Cmol (Gutiérrez-Rojas *et al.*, 1995; Pintado *et al.*, 1998; Vandenbergue *et al.*, 2000; Kuforiji *et al.*, 2010). Tradicionalmente, la FES utiliza residuos agroindustriales (residuos de piña, bagazo de caña de azúcar, granos de maíz, bagazo de yuca, cáscara de café, cáscara de kiwi, cáscara de plátano, entre otros) cuya heterogeneidad y complejidad provoca problemas operativos relacionados con la composición química del medio y problemas analíticos para la cuantificación de sustrato, biomasa y producto; además de complicar la recuperación del

producto (Kumar *et al.*, 2022). Por ello, una alternativa es el uso de soportes inertes como la espuma de poliuretano (EPU), debido a su alta capacidad de retención de agua (hasta 60 veces su peso), permitiendo recuperar el ácido cítrico concentrado; ya que no es necesario añadir agentes de extracción como ocurre con el uso de residuos agroindustriales como sustrato (Nuñez-Reyes *et al.*, 2022). Como se ha mencionado, la producción de ácido cítrico está regulada por la composición del medio de cultivo (Show *et al.*, 2015). Dicha composición incluye aspectos como el tipo y concentración de la fuente de carbono, limitación de oxígeno, concentraciones limitantes de fosfato, magnesio y oligoelementos (Guilherme *et al.*, 2008; Diano *et al.*, 2009; Ozdal & Kurbanoglu, 2019). En particular, la limitación de oxígeno durante la producción de ácido cítrico conduce a la producción de polioles como glicerol, eritritol, manitol y arabitol (Diano *et al.*, 2006); además, otros polioles como el xilitol, ribitol y dulcitol pueden llegar a producirse en condiciones específicas. Por ejemplo, una disminución repentina de la disponibilidad de oxígeno provoca la producción de manitol y el uso de xilosa como sustrato provoca una gran producción de xilitol (David *et al.*, 2003; Ruijter *et al.*, 2003; Diano *et al.*, 2009). Los polioles tienen distintas funciones como: 1) reservas de carbohidratos, 2) osmorregulación, 3) almacenamiento de poder reductor y 4) componentes de translocación (Lewis & Smith, 1967). Por ejemplo, el eritritol y glicerol están ligados a una alta presión osmótica en el medio provocado por una alta concentración de fuente de carbono. Por otro lado, el papel de la enzima manitol-1-fosfato deshidrogenasa es ayudar en la re-oxidación de NADH cuando el aceptor final de electrones, el oxígeno es limitante (Diano *et al.*, 2009). Las vías de biosíntesis y catabolismo de los polioles pueden ser diferentes para cada especie de *Aspergillus*. Estas vías han sido estudiadas principalmente en *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus nidulans* y *Aspergillus niger* en condiciones de cultivo líquido (Hohmann, 2002; Diano *et al.*, 2006). Además de ser muy poco estudiado, el uso de soportes inertes como la EPU impregnado con un medio definido permite diseñar condiciones de cultivo precisas para la producción de ácido cítrico por FES. Este estudio tuvo como objetivo analizar el efecto de la composición de un medio de cultivo definido sobre la producción de ácido cítrico por *Aspergillus brasiliensis* cuando crece en EPU aprovechando las ventajas de la FES.

## 2. Antecedentes

### 2.1. Hongos filamentosos

Los hongos son organismos eucariontes capaces de degradar materia orgánica, con una estimación de más de un millón de especies diferentes, los hongos representan un reino extremadamente diverso debido a sus propiedades morfológicas y fisiológicas. Dentro de este reino se encuentran los hongos filamentosos que se distinguen por formar micelio compuesto de hifas septadas o estructuras filamentosas ramificadas que se dividen en distintas secciones (Troiano *et al.*, 2020). Los hongos filamentosos se caracterizan por producir una amplia gama de enzimas como celulasas, xilanasas, peroxidasas, lacasas, proteasas,  $\alpha$ -amilasas,  $\beta$ -xilosidasas, lo que les permite degradar sustratos como celulosa, lignina, almidón y sus respectivos monómeros (Troiano *et al.*, 2020). Posteriormente, los monómeros se metabolizan y se generan productos valiosos como ácidos orgánicos y etanol (Liaud *et al.*, 2014). La biomasa de los hongos filamentosos también puede ser fuente de vitaminas, fibra, proteínas, pigmentos y enzimas. Estos metabolitos tienen muchas aplicaciones en la industria de los alimentos, combustibles y biopolímeros (Wikandari *et al.*, 2021). Estas cualidades, han sido aprovechadas por la humanidad para la producción de metabolitos de interés industrial como el ácido cítrico, ácido fumárico, así como la penicilina producidos por *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* y *Penicillium chrysogenum* (Troiano *et al.*, 2020). En la actualidad, el ácido cítrico es el producto fúngico más importante en términos de producción a nivel industrial (Reena *et al.*, 2022).

### 2.2. *Aspergillus brasiliensis*

La taxonomía del género *Aspergillus* es complicada debido a la falta de criterios taxonómicos adecuados que discriminen las diferencias entre especies. Tanto *Aspergillus niger* como *Aspergillus brasiliensis* se encuentran dentro de la sección Nigri. Esta sección abarca un conjunto de 26 taxones caracterizados por la producción de un pigmento negro

y la capacidad de producir ácido cítrico. Ambas especies son morfológicamente indistinguibles, lo cual da origen a ambigüedades al atribuir características morfológicas y bioquímicas (Canada, 2014). La especie *A. brasiliensis* fue formalmente reconocida en el año 2007, engloba diversas cepas previamente catalogadas como *A. niger*, entre las cuales se encuentra la cepa ATCC 9642 (Varga *et al.*, 2007). El nombre de la especie hace referencia al lugar de aislamiento (Pedreira, Sao Paulo, Brasil). Esta especie presenta diferencias morfológicas con respecto a *A. niger* y *A. tubingensis* como el tamaño de sus conidios (3.5-4.5  $\mu\text{m}$ ) y el tamaño de sus vesículas (30-45  $\mu\text{m}$ ); además, presenta diferencias en determinadas regiones de su genoma como se evidencia en las secuencias de los genes de  $\beta$ -tubulina y calmodulina (Varga *et al.*, 2007). Adicionalmente, es capaz de producir metabolitos extracelulares únicos como pironas (aurasperona B), tensidol A, entre otros; por el contrario, no produce ocratoxina A, y funalenona lo que hace que sea considerada como una especie independiente (Varga *et al.*, 2007).

### **2.3. Producción de ácido cítrico por *Aspergillus niger***

El ácido cítrico (ácido 2-hidroxi-propano-1,2,3-tricarboxílico) es un metabolito intermediario del ciclo de ácidos tricarboxílicos o ciclo de Krebs, su peso molecular es de 192.12 g/mol, el cual tiene tres valores de pKa (3.13, 4.76 y 6.39) (Börekçi *et al.*, 2021). Para producir ácido cítrico se han empleado una gran variedad de microorganismos, incluidas bacterias, hongos y levaduras; sin embargo, *A. niger* es superior a otros microorganismos debido a su alto rendimiento (95 kg de ácido cítrico por cada 100 kg de azúcares suministrados) de producto final (Karaffa & Kubicek, 2003; Chergui *et al.*, 2021). Este ácido orgánico tiene una amplia demanda en la industria alimentaria (70%), farmacéutica (12%) y otras (18%) y se espera que alcance los 3.9 billones de USD para 2024 (Behera *et al.*, 2021; Reena *et al.*, 2022), debido a sus aplicaciones como: 1) antioxidante, 2) acidulante, 3) aromatizante, 4) conservante y 5) emulsionante (Börekçi *et al.*, 2021).

El ácido cítrico fue identificado por primera vez en 1784, por el químico Carl Scheele, que lo

obtuvo a partir de jugo de limón (Show *et al.*, 2015). La producción comercial de ácido cítrico a partir de limones inició en Inglaterra en 1826. Con el aumento del valor comercial del ácido cítrico, se inició la producción en Italia y se estableció un monopolio que duró hasta finales del siglo XIX. Durante la Primera Guerra Mundial se interrumpieron las exportaciones italianas de ácido cítrico, lo que provocó la demanda de fuentes alternativas. Esto resultó en el descubrimiento en 1917, por el químico estadounidense James Currie, de la capacidad de *A. niger* para producir ácido cítrico; sus observaciones indicaron que las condiciones de cultivo son valores bajos de pH, alta concentración de azúcar y la adición de sales minerales (Currie, 1917), antes de ese hallazgo *A. niger* solo era conocido por producir ácido oxálico. A partir de estos estudios la producción de ácido cítrico se incrementó y a principios de los años 50, ya existía toda una industria para su producción basada en procesos de FEL. El ácido cítrico (anhidro, pureza: 99.5%~100.5%) tiene un bajo costo relativo a otros productos biotecnológicos (0.75 USD por kilo) ([www.alibaba.com](http://www.alibaba.com)) provocando que mejorar el rendimiento de producción tenga poco beneficio económico. Tradicionalmente, la industria ha intentado mejorar el rendimiento de producción de ácido cítrico utilizando técnicas de mutagénesis con agentes químicos y físicos, lo que permite obtener cepas superproductoras (Mores *et al.*, 2021). Otras estrategias se centran en el uso de la ingeniería metabólica para aumentar el consumo de sustrato, el uso de nuevos sustratos y la regulación morfológica-metabólica fúngica (Mores *et al.*, 2021); no obstante, es poco común que tales mejoras estén protegidas por patentes. En consecuencia, el secreto sobre la producción de ácido cítrico es una herramienta importante para la industria. Esta situación ha motivado a la industria a invertir en investigaciones para comprender los procesos metabólicos implicados en la producción de ácido cítrico (Alekseev *et al.*, 2015). Tratando de comprender mejor los procesos de regulación metabólica fúngica, se ha incursionado en el uso alternativo de otras especies como *A. brasiliensis* para la producción de ácido cítrico.

## **2.4. Mecanismos de regulación del metabolismo**

Las rutas del metabolismo de la glucosa proporcionan, en la dirección catabólica, la energía esencial para las funciones fundamentales de la célula y en la dirección anabólica, precursores biosintéticos y una forma de almacenamiento de energía metabólica (Popovic, 2019). Estas reacciones son tan importantes para la célula que han surgido complejos mecanismos de regulación 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 el uso de diversos mecanismos regulatorios, se producen ciertos ajustes sobre la velocidad de flujo metabólico a través de toda la ruta cuando se existen cambios sobre las condiciones ambientales a la cuales está expuesta una célula; por ejemplo, una alta concentración de glucosa (Karaffa & Kubicek, 2019).

El término regulación metabólica se refiere al proceso para mantener algún parámetro celular, por ejemplo, la producción de un metabolito a través de tiempo como el ácido cítrico, aun cuando cambie el flujo metabólico debido al cambios en la ruta como, por ejemplo, la producción de polioles durante la producción de ácido cítrico (Diano *et al.*, 2006). Por otro lado, el control metabólico se refiere a un proceso que conduce a una variación sobre el rendimiento de una vía metabólica durante el tiempo en respuesta a alguna señal o cambio sobre las condiciones ambientales (Karaffa & Kubicek, 2019).

## **2.5. 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; 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 (Voet, 2007).

El transporte mediado tiene dos clasificaciones acordes 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 concentración; 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 (Voet, 2007). Durante el proceso de transporte de la glucosa a través de la membrana se han identificado dos diferentes permeasas (transportadores) en *A. niger* que difieren en su afinidad por la glucosa. Las permeasas de alta afinidad actúan cuando la concentración de glucosa es baja (1% p/v) en el medio; mientras, que las permeasas de baja afinidad actúan cuando existe una alta concentración de glucosa (15% p/v) en el medio (Torres *et al.*, 1996). Un consumo acelerado del carbono de la glucosa provoca un alto flujo en la vía glucolítica, lo que ha sido relacionado con una alta producción de ácido cítrico (Mora-Pérez *et al.*, 2023). Adicionalmente, el análisis transcriptómico de *A. niger* durante un proceso de fermentación confirma que las permeasas de baja afinidad mantienen un alto nivel de transcripción, mientras que las permeasas de alta afinidad no (Yin *et al.*, 2017).

Una vez dentro del citoplasma, la glucosa se descompone por dos rutas metabólicas: (i) la glucólisis o Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) y (ii) pentosas fosfato (PP). La EMP está regulada por energía, la regulación del metabolismo de carbohidratos es crucial para mantener constantes los niveles de ATP. No obstante, no es prioritario que su concentración sea alta, 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 la concentración de glucosa libre y de la 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 favorecer

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. Entre las moléculas efectoras de mayor relevancia en la célula son ATP, ADP y AMP. Su concentración es un indicador del nivel de energía en la célula, mientras que la abundancia de AMP y ADP indica un bajo nivel de energía dando una señal para que entre en acción el catabolismo glucolítico y se produzca energía en forma de ATP (Voet, 2007; Alekseev *et al.*, 2015). Utilizando ATP, la glucosa se transforma en piruvato mediante 10 reacciones enzimáticas, algunas de las más importantes se presentan a continuación (Tabla 1).

**Tabla 1.** Enzimas reguladoras del metabolismo de carbohidratos

Nombre de la enzima	Efecto positivo	Efecto negativo	Comentario
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 glucolisis.
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.

En el otro caso de que la glucosa se descomponga por medio de la ruta PP, los principales productos resultantes de este serán los polioles (Diano *et al.*, 2009), las reacciones específicas para su formación serán abordadas en siguientes secciones.

## 2.6. Regulación del metabolismo en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos

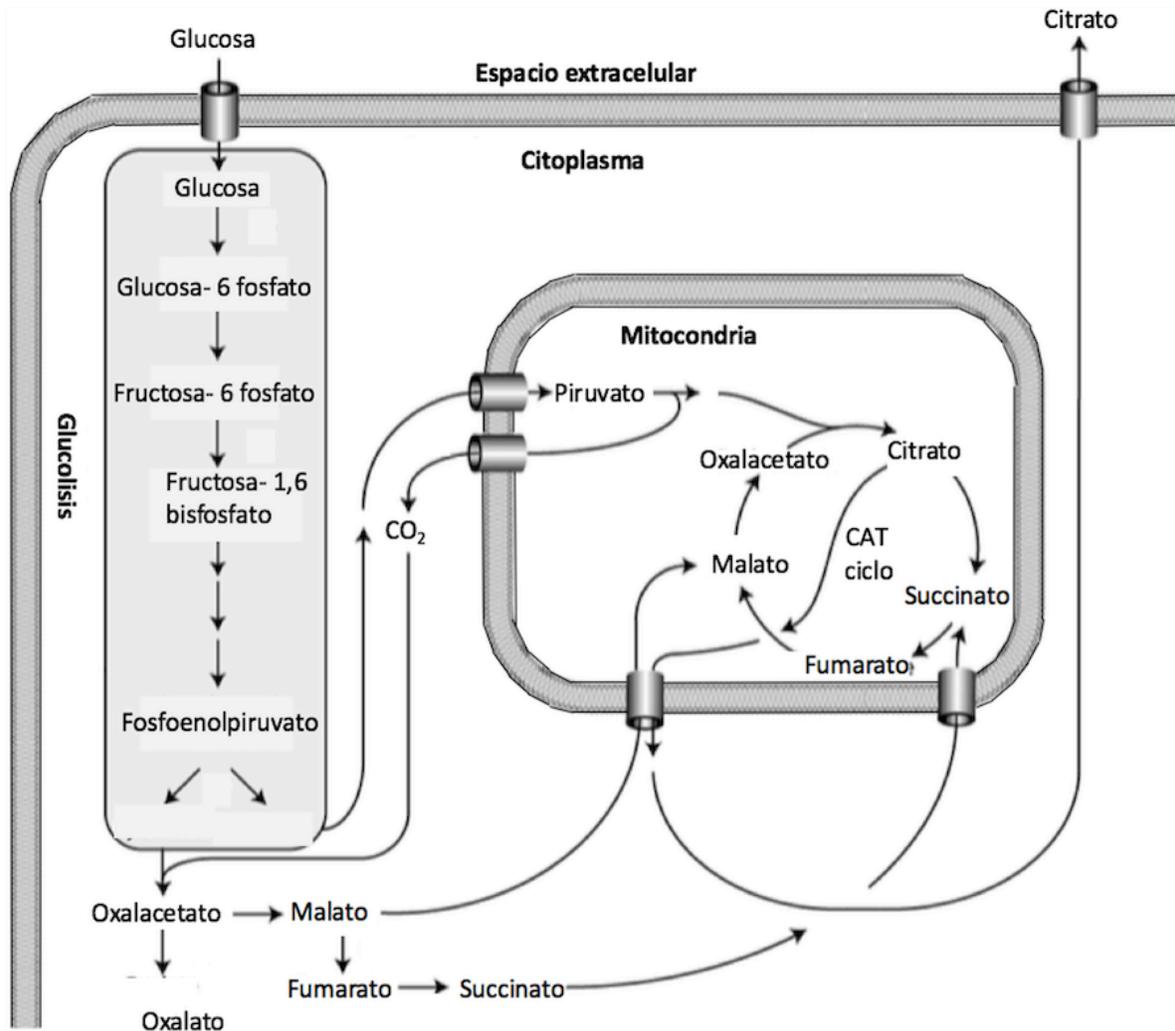
Las moléculas de piruvato entran a la mitocondria, donde el complejo piruvato deshidrogenasa oxida al piruvato transformándolo en una molécula de dos carbonos; la cual se une a la coenzima A (CoA) y forma acetil-CoA, cuya función es transportar el grupo acetilo hacia el ciclo de Krebs o ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT). Enzimas como la aconitasa, la isocitrato deshidrogenasa (ICDH) y la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa (CGDH) son las encargadas de regular el CAT. La CGDH y la ICDH tienen en común que catalizan las reacciones con energías libres negativas; lo que significa, que estas reacciones son favorables termodinámicamente (Kumar & Kumar, 2019). 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 hierro, el cual es un componente estructural y activador de la aconitasa. Por otro lado, el cobre y el peróxido de hidrógeno que inhiben la aconitasa *in vitro*, actúan como estimuladores sobre la producción de ácido cítrico (Kubicek, 1985). La CGDH es un complejo multi-enzimático que cataliza la reducción de  $\alpha$ -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 (Kumar & Kumar, 2019). Por otra parte, la ICDH es la enzima que media la reacción entre el isocitrato y el  $\alpha$ -cetoglutarato y algunos estudios *in vitro* han mostrado que es inhibida por la acumulación 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 *A. niger*, no sólo por ser cofactor de la ICDH (Legisa & Matthey, 1989), sino además por actuar sobre los transportadores de membrana e influenciar la composición de la membrana, causando la secreción de ácido cítrico *A niger* cuando crece deficiente 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 micelial en *A. niger*. Además, el glicerol inhibe la ICDH y es considerado como el iniciador de la acumulación de citrato

(Legisa & Matthey, 1989). El CAT, a través de la oxidación de la acetil-CoA libera energía en forma de ATP, por medio de 9 reacciones enzimáticas (Tabla 2).

**Tabla 2.** Reacciones enzimáticas en el CAT

Reacción no.	Sustrato	Producto	Enzima	Tipo de reacción	Clasificación
1	Acetil CoA + oxalacetato	Citrato	Citrato sintasa	Irreversible	EC 2.3.3.1
2	Citrato	Cis-aconitato	Aconitasa	Reversible	EC 4.2.1.3
3	Cis- aconitato	Isocitrato	Aconitasa	Reversible	EC 4.2.1.3
4	Isocitrato + NAD <sup>+</sup>	α-cetoglutarato + NADH + CO <sub>2</sub>	Isocitrato deshidrogenasa	Irreversible	EC 1.1.1.41
5	α-cetoglutarato + NAD <sup>+</sup> + CoA	Succinil CoA + NADH + CO <sub>2</sub>	α-cetoglutarato deshidrogenasa	Irreversible	EC 1.2.4.2
6	Succinil CoA + Pi + ADP	Succinato + ATP + CoA	Succinil CoA sintasa	Reversible	EC 6.2.1.5
7	Succinato + FAD	Fumarato + FADH <sub>2</sub>	Succinato deshidrogenasa	Reversible	EC 1.1.1.42
8	Fumarato	Malato	Fumarasa	Reversible	EC 4.2.1.2
9	Malato + NAD <sup>+</sup>	Oxalacetato + NADH	Malato deshidrogenasa	Reversible	EC 1.1.1.37

Por otra parte, se han realizado estudios donde se han mostrado evidencias de un cambio en el catabolismo de carbohidratos; de una ruta PP predominante en las primeras etapas de crecimiento de *A. niger*, a una ruta glucolítica durante la producción de citrato (Legisa *et al.*, 1988). El citrato al inhibir a la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH), reduce el flujo de carbono a través de la vía PP 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<sup>+</sup>.



**Figura 1.** Proceso metabólico de *A. niger* para la producción de ácido cítrico (Poulsen, 2012).

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 (Kumar & Kumar, 2019).

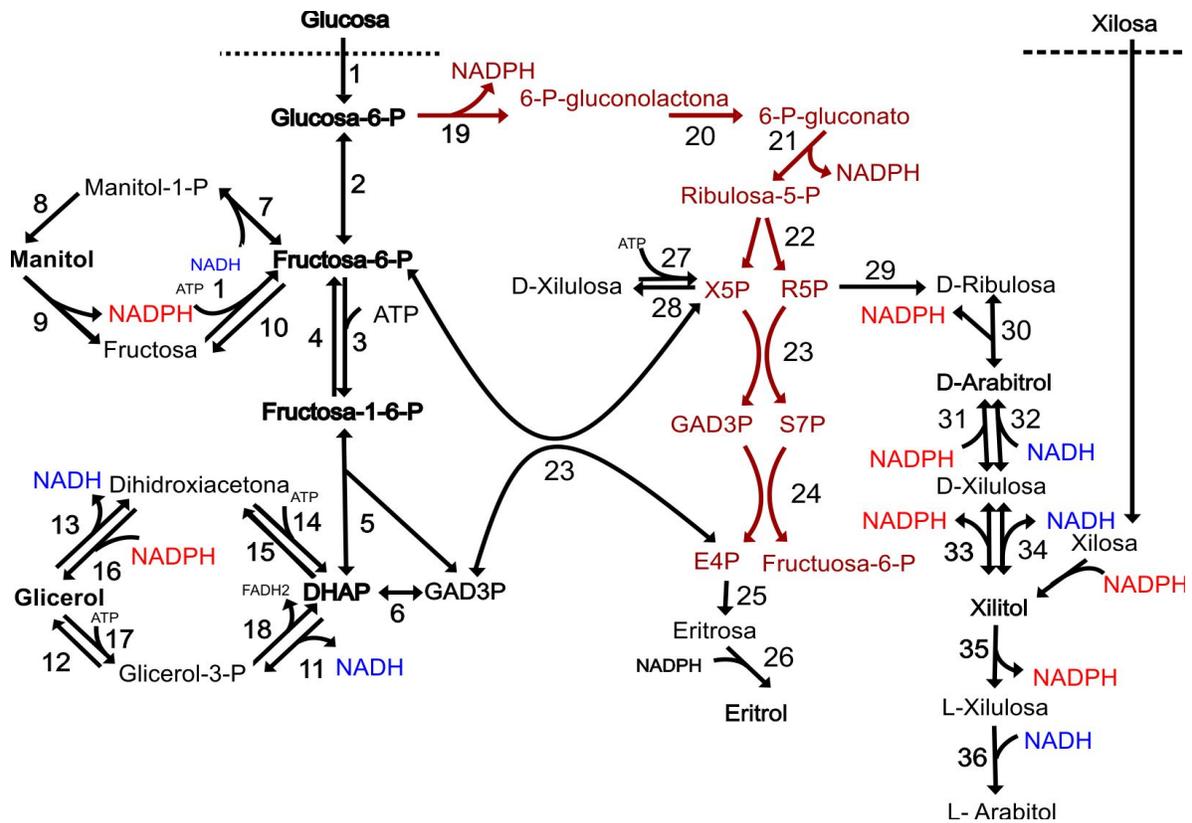
## 2.7. Metabolismo y producción de polioles

En la industria, el cultivo de hongos filamentosos en cultivos sumergidos representa un problema por en el control del aumento de la biomasa en el medio, lo que provoca un incremento en la viscosidad y problemas de transferencia de masa, especialmente sobre la transferencia de oxígeno. Una baja transferencia de oxígeno en el cultivo, causa una alta

producción de polioles, algunos ejemplos son: (i) manitol, (ii) glicerol, (iii) arabitol, (iv) xilitol y (v) dulcitol (Diano *et al.*, 2006).

Los mecanismos de regulación para la biosíntesis y catabolismo de polioles pueden ser diferentes de un *Aspergillus spp.* a otro. Los polioles tienen varias funciones sobre el crecimiento de los hongos filamentosos, sirven como fuente de carbohidratos de reserva, moléculas osmorreguladoras y de translocación de componentes (Diano *et al.*, 2006). Los polioles son metabolizados en las primeras fases del cultivo. Adicionalmente, se ha reportado que los polioles con cadenas de 6 carbonos son los primeros en producirse, posteriormente con 5 y por último con 4 (Dijkema *et al.*, 1985). Otros autores han reportado, que cuando el potencial osmótico disminuye como consecuencia del consumo de sustrato los polioles almacenados son utilizados como fuente de carbono (Diano *et al.*, 2006).

Por otro lado, el manitol tiene un efecto en la formación de los conidios protegiéndolos de altas temperaturas, estrés oxidativo y congelamiento (Ruijter *et al.*, 2003). El glicerol y eritrol han sido descritos como moléculas que juegan un papel osmorregulador en *A. niger* y *A. nidulans* (Gutiérrez-Rojas *et al.*, 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, convirtiendo la dihidroxiacetona y el gliceraldehido en glicerol. El gliceraldehido puede ser reducido por la enzima glicerol deshidrogenasa dependiente del NADP<sup>+</sup> o por la alcohol deshidrogenasa (Hondmann *et al.*, 1994). Adicionalmente, 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, aun cuando no son capaces de sustituir completamente al glicerol en términos de osmorregulación (Bloomberg, 1992). A partir de distintos sustratos (glucosa, xilosa, etc.) se sintetizan por medio de 37 reacciones enzimáticas distintos polioles relacionados a las funciones ya descritas (Figura 2).



**Figura 2.** 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-arabitol deshidrogenasa; 37, D-xilosa reductasa (Diano *et al.*, 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 *et al.*, 2006). Las mejores condiciones para la producción de polioles varían en función del poliol específico que se

busque producir. La limitación de oxígeno en el cultivo induce la producción de manitol, mientras que un incremento sobre la concentración de fuente de carbono (>80 g/L) conduce a la producción de glicerol y eritrol; sin embargo, es importante destacar que el rendimiento obtenido no supera los 0.2 Cmol/Cmol de Xilosa (Diano *et al.*, 2009). A medida que la fuente de carbono se agota por completo al final de la fermentación, se observa el agotamiento total de todos los polioles (Diano *et al.*, 2006). Es fundamental mencionar que las condiciones para la producción de polioles están interrelacionadas con aquellas para la producción de ácido cítrico.

## **2.8. Factores ambientales que afectan la producción de ácido cítrico**

Existen ciertos factores que pueden influenciar la fisiología y el metabolismo de *A. brasiliensis* para favorecer la producción de ácido cítrico, algunos de los cuales pueden ser: (i) fuente y concentración de macronutrientes, (ii) pH, (iii) aireación, (iv) elementos traza y la (v) adición de alcoholes (Behera *et al.*, 2021).

### **2.8.1. Fuente y concentración de macronutrientes**

Carbono, nitrógeno y fósforo son los macronutrientes utilizados para la producción de ácido cítrico. El tipo y la concentración de la fuente de carbono son dos de los factores más importantes, ya que si la concentración inicial de fuente de carbono es menor a 2.5% (p/v) no se produce ácido cítrico, aun cuando otros factores como la fuente de nitrógeno y fósforo estén en su concentración óptima (Xu *et al.*, 1989; Alekseev *et al.*, 2015). Behera *et al.* (2021) reportó que la concentración óptima de fuente de carbono para la producción de ácido cítrico oscila entre 10% y 14% (p/v). Este efecto se presenta debido a que una alta concentración de fuente de carbono inhibe la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa, lo que conduce a la producción de ácido cítrico (Hossain *et al.*, 1983; Behera *et al.*, 2021). La fuente de carbono más utilizada en la industria (para procesos de fermentación) son los jarabes glucosados provenientes de la hidrólisis de almidón, las melazas y los subproductos de la caña de azúcar (baja calidad); en general, estos están contaminados por cationes

provenientes de procesos anteriores para su obtención (Max *et al.*, 2010). Estos cationes pueden llegar a tener efectos negativos sobre la producción de ácido cítrico ya que actúan como activadores de ciertas enzimas, por este motivo es esencial el control riguroso de estos (Mora-Pérez *et al.*, 2023). Debido a esto, se han realizado diversos estudios utilizando azúcares refinados como sacarosa y glucosa. Adicionalmente, se ha reportado que uso de monosacáridos y disacáridos favorecen el aumento del flujo glucolítico lo que a su vez aumenta el rendimiento de ácido cítrico (Alekseev *et al.*, 2015; Show *et al.*, 2015).

Por otro lado, la concentración de nitrógeno tiene un impacto destacado, no solo la composición estructural de las proteínas, sino también por desempeñar una función primordial en el metabolismo celular. Los medios complejos como las melazas suelen ser ricos en nitrógeno; en contraste, los medios minerales requieren de sales de amonio y nitratos adicionales como suplementos (Show *et al.*, 2015). La limitación de nitrógeno es esencial, debido a que a una concentración superior al 0.25% (p/v) ocurre la producción de metabolitos como el ácido oxálico, provocando que disminuya el rendimiento de producción de ácido cítrico (Behera *et al.*, 2021). Se ha reportado que las principales fuentes de nitrógeno utilizadas para la producción de ácido cítrico son el sulfato de amonio y nitrato de amonio, debido a que el consumo de sales de amonio conduce a una reducción del pH (Alekseev *et al.*, 2015); sin embargo, fuentes de nitrógeno en su forma oxidada como el nitrato de sodio también pueden ser utilizadas como una alternativa (Mora-Pérez *et al.*, 2023).

En conjunto con las fuentes de carbono y nitrógeno, se destaca la relevancia del fósforo como un factor determinante para la producción de ácido cítrico. Este es usado en la célula en forma ácidos nucleicos, fosfolípidos y como ATP. La adición de fósforo tiene efecto sobre la producción de ácido cítrico y crecimiento micelial (Show *et al.*, 2015); sin embargo, este debe ser adicionado a baja concentración (0.25 g/L) para tener un efecto positivo sobre la producción del ácido cítrico (Ozidal & Kurbanoglu, 2019), no existe una explicación concreta sobre este efecto, pero algunos informes sugieren que el fósforo actúa a nivel de eficiencia enzimática en lugar de expresión genética (Alekseev *et al.*, 2015).

### **2.8.2. pH**

El pH del medio cambia en respuesta de la actividad metabólica microbiana, esto se debe principalmente a la producción de ácidos orgánicos, tales como cítrico, oxálico y glucónico. Se sabe que valores de pH bajos (cerca de 3) durante la etapa de producción de ácido cítrico, inhiben la formación de subproductos como el ácido oxálico y glucónico; además, se reduce la probabilidad de contaminación del cultivo (Max *et al.*, 2010; Show *et al.*, 2015). Este fenómeno (reducción del pH) se puede explicar al saber que las reservas de NADH se oxidan en la cadena respiratoria, mientras que el ATP es utilizado por ATPasas asociadas a la membrana celular para mantener el gradiente de pH entre el citoplasma (pH a 6.5) y el medio extracelular; por lo tanto, disminuir el pH del medio es una herramienta para regular el estado energético de la célula y utilizar el ATP resultante, que de otro modo crearía un desequilibrio metabólico e inhibiría la acidogénesis (Alekseev *et al.*, 2015).

### **2.8.3. Aireación**

La aireación en FES es uno de los factores críticos que afecta el crecimiento microbiano, su metabolismo y la productividad del proceso (Rodrigues *et al.*, 2013), ya que no sólo suministra oxígeno, sino que también remueve el calor metabólico, gases y productos volátiles formados durante la fermentación (Vandenberghe *et al.*, 2020). La aireación puede usarse para controlar la humedad en el sistema e influenciar la producción de metabolitos microbianos. Diano *et al.*, (2006) reportan que la producción de polioles incrementa, cuando el oxígeno disuelto de los cultivos disminuye en FEL. Otro estudio enfocado en la producción de succinato con *A. niger*, demostró que el cambio de la disponibilidad de oxígeno afecta la fisiología y producción de metabolitos en el medio, al disminuir la aireación del medio se aumenta la producción de succinato y polioles, sin embargo; a pesar de esto, los productos están presentes en baja concentración (Meijer *et al.*, 2007).

Vandenberghe *et al.*, (1999) reportaron que se requiere una concentración superior al 25% (oxígeno disuelto) para optimizar producción de ácido cítrico; sin embargo, la elevada tasa de aireación resulta en la formación de espuma en el medio, lo cual implica la necesidad de utilizar agentes antiespumantes. Otros autores sugieren que, durante la fase de

crecimiento, es esencial mantener una baja concentración de oxígeno disuelto (9-12%), seguida de un incremento moderado (12-13%) en la fase de producción de ácido cítrico (Grewal & Kalra, 1995). Durante la fase de crecimiento, cuando el hongo inicia la formación de micelio, la concentración de oxígeno disuelto disminuye, resultando en un aumento de la concentración de CO<sub>2</sub>. Este último, actúa como sustrato para la piruvato carboxilasa, suministrando oxalacetato a la citrato sintasa. Un cultivo con baja concentración de oxígeno disuelto limita el crecimiento, lo cual es crucial para la producción de ácido cítrico, mientras que los cultivos fuertemente aireados aumentan la esporulación, disminuyendo la producción de ácido cítrico (Behera *et al.*, 2021). El papel de una baja aireación es controlar la actividad respiratoria de *A. brasiliensis*, desviando el metabolismo de producción de biomasa hacia la producción de ácido cítrico (Soccol *et al.*, 2006).

#### **2.8.4. Elementos traza**

Los elementos traza, tienen un gran impacto sobre la producción de ácido cítrico, ya que desempeñan roles cruciales como activadores o inhibidores de enzimas esenciales para su acumulación, al ser componentes integrales de dichas enzimas. No obstante, se ha reportado que la FES presenta una notable resistencia a la influencia de los elementos traza en comparación con la FEL (Show *et al.*, 2015). Dentro de los elementos traza que afectan la producción de ácido cítrico se encuentran el magnesio (Mg<sup>2+</sup>), hierro (Fe<sup>2+</sup>), cobre (Cu<sup>2+</sup>), zinc (Zn<sup>2+</sup>) y manganeso (Mn<sup>2+</sup>), por lo tanto, es necesario un estricto control de estos para asegurar una elevada producción de ácido cítrico (Börekçi *et al.*, 2021). Se ha reportado concentraciones de Mn<sup>2+</sup> superiores a 10 mg/L reducen drásticamente el rendimiento de ácido cítrico en un 50%.

La deficiencia de Mn<sup>2+</sup> afecta el anabolismo de *A. niger*, provocando la descomposición de proteínas (donde Mn<sup>2+</sup> es parte estructural), esta proteólisis resulta en una alta concentración intracelular de amonio. Una alta concentración de amonio inhibe enzimas como la fosfofructoquinasa (PFK), esencial en la conversión de glucosa y fructosa en piruvato, ocasionando una alteración sobre el flujo metabólico a través de la glucólisis,

afectando la producción de ácido cítrico (Show *et al.*, 2015). El  $Mn^{2+}$  también ha demostrado ser importante en muchas funciones celulares, especialmente en la formación de pared celular, esporulación y producción de metabolitos secundarios (Max *et al.*, 2010). Por otro lado, el hierro y zinc son componentes estructurales de enzimas implicadas en el metabolismo del hongo, desempeñando un papel fundamental como estabilizador de la estructura celular y organelos, específicamente, el zinc está presente en deshidrogenasas, aldolasas, polimerasas y proteasas (Börekçi *et al.*, 2021); sin embargo, se ha reportado que altos niveles de  $Fe^{2+}$  pueden tener un efecto negativo sobre la producción de ácido cítrico, teniendo una concentración óptima de 1.3 ppm (Behera *et al.*, 2021). El níquel, molibdeno y cobalto son otros elementos traza que también, a concentraciones elevadas ( $>0.5$  ppm) pueden llegar a afectar negativamente la producción de ácido cítrico en *A. niger* (Max *et al.*, 2010; Behera *et al.*, 2021).

A pesar de la extensa exploración llevada a cabo en torno a los parámetros que influyen en la producción de ácido cítrico, los aspectos bioquímicos, genéticos y fisiológicos detrás de la sobreproducción de este metabolito continúan albergando vacíos en lo concerniente a la comprensión de los mecanismos de regulación.

### 2.8.5. Alcoholes

El efecto de la adición de alcoholes sobre la producción de ácido cítrico ha sido estudiado ampliamente; sin embargo, el efecto positivo depende en gran medida de la composición del medio y la cepa utilizada (Behera *et al.*, 2021). Los alcoholes más utilizados son metanol y etanol, debido a los efectos que tiene sobre la actividad enzimática dentro del ciclo de Krebs; algunos autores han reportado que la adición de etanol duplica la actividad de la citrato sintasa y a su vez disminuye la actividad de la aconitasa, resultando en una mayor producción de ácido cítrico (Moyer, 1953). Otros autores, han reportado que el metanol presenta un efecto inhibitorio sobre los elementos traza, concluyendo que la concentración óptima de metanol/etanol, requerida para la producción de ácido cítrico debe estar entre 1% y 5% (Kiel *et al.*, 1981). Adicionalmente, se ha reportado que los alcoholes estimulan la producción de ácido cítrico al afectar el crecimiento y la esporulación debido a los cambios sobre la composición fosfo-lipídica de la membrana celular (Show *et al.*, 2015).

A pesar de esto, el papel que tienen los alcoholes no se conoce completamente, ya que ha sido relacionado con (i) la inhibición de efecto adverso de los elementos traza, (ii) cambios sobre la morfología del micelio provocando variaciones en la composición de los fosfolípidos, (iii) aumento de la permeabilidad de la membrana celular, facilitando la excreción del ácido cítrico y (iv) cierta influencia sobre la actividad enzimática dentro del ciclo de Krebs. Por el contrario, algunos autores han reportado efectos negativos cuando se añadió metanol ya que *A. niger* no tiene la capacidad de metabolizarlo (Max *et al.*, 2010).

Tratando de incrementar el rendimiento de producción de ácido cítrico, se ha incursionado en el uso de procesos de FES, modificando unidades experimentales (Vandenbergue *et al.*, 2004), aireación (Rodrigues *et al.*, 2013) y utilizando mutantes (de Oliveira *et al.*, 2022); sin embargo, los procesos de FES aún no han alcanzado el rendimiento reportado para la FEL.

## 2.9. Fermentación en estado sólido

Mitchell et al. (2006) definen a la fermentación en estado sólido (FES) como la que involucra el crecimiento de microorganismos sobre partículas sólidas húmedas en situaciones en las que los espacios entre las partículas contienen una fase gaseosa continua y un mínimo de agua visible. Aunque puede haber gotas de agua entre las partículas y existan delgadas películas de agua sobre las partículas, la fase acuosa entre partículas es discontinua y la mayoría del espacio interpartícula está ocupado por la fase gaseosa. Además del agua en el sistema, existen varios aspectos importantes que deben ser considerados para el desarrollo de cualquier proceso de FES. Estos incluyen, la selección del microorganismo apropiado, la selección del sustrato, el soporte, entre otros. En la antigüedad, la FES era empleada para la elaboración de masas y quesos fermentados; sin embargo, siguiendo la definición de FES el proceso prototipo es la fermentación de koji, la cual se remonta al año 300 a.C., este proceso se basa en un cereal cocido al vapor (trigo o arroz) inoculado con esporas de *A. oryzae*, dando como resultado una masa de arroz gelatinizada con una actividad enzimática muy alta y utilizado para la producción de sake, salsa de soya y vinagre (Vandenberghe *et al.*, 2020).

Actualmente, los procesos de FES son utilizados para la producción de etanol celulósico, ácido glucónico, enzimas y antibióticos (Vandenberghe *et al.*, 2020; Börekçi *et al.*, 2021); ya que ofrece numerosas ventajas, como por ejemplo, menos pasos de pretratamiento (Show *et al.*, 2015), pocos efluentes a tratar (Vandenberghe *et al.*, 2020), aireación facilitada por los espacios interpartícula del soporte (Rodrigues *et al.*, 2013), entre otros. Sin embargo, el resurgimiento de los procesos de FES se debe al valor agregado que se les da a los residuos agroindustriales, debido al modelo de procesos circulares que se han implementado en la industria (Kumar *et al.*, 2022). El uso de residuos agroindustriales no solo proporciona una alternativa de su uso, sino que también puede servir directamente a la agricultura, para la producción de inoculantes y metabolitos secundarios (Vandenberghe *et al.*, 2020).

## **2.10. Tipos de soportes utilizados en fermentación en estado sólido**

Los soportes utilizados en procesos de FES se clasifican en dos categorías dependiendo de su naturaleza química. El primero y más usado, involucra el uso de residuos agroindustriales. El segundo, incluye a los soportes inertes (Ooijkaas *et al.*, 2000).

Los residuos agroindustriales usados en procesos de 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 puede ser 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). Por otro lado, tenemos a los soportes inertes que 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 microorganismos. Dentro de estos materiales tenemos al cáñamo, espuma de poliuretano (Valdés-Velasco *et al.*, 2022), vermiculita (Vandenberghe *et al.*, 2020) y agrolita (Guerrero-Urrutia *et al.*, 2021). Los soportes inertes presentan varias ventajas sobre los residuos agroindustriales: 1) Se puede diseñar el medio de cultivo, 2) menor dificultad para recuperar los productos y 3) Los balances de masa se realizan con mayor facilidad debido a que la concentración de todos los nutrientes en el medio de producción es conocida y puede ser cuantificada (Kumar *et al.*, 2022). 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 de los metabolitos a obtener (Ooijkaas *et al.*, 2000).

## **2.11. Espuma de poliuretano como modelo de estudio para procesos de FES**

La espuma de poliuretano (EPU) es un material altamente poroso (>70%) e hidrofóbico con una alta área específica ( $300 \text{ cm}^{-1}$ ), presenta la ventaja de tener un alto nivel de

transferencia de oxígeno (López-Pérez & Viniestra-Gonzalez, 2015). La EPU permite incrementar el área específica (relación área-volumen hasta  $300 \text{ cm}^{-1}$ ) respecto a la FEL ( $1 \text{ cm}^{-1}$ ), esta propiedad facilita la dispersión del cultivo (a mayor área específica más espacios libres) maximizando la transferencia de oxígeno respecto a la FEL (López-Pérez & Viniestra-Gonzalez, 2015). Algunos autores, han reportado que la EPU puede ser un modelo útil para la producción de proteínas recombinantes de *Pichia pastoris*, utilizando cubos de EPU con una longitud de aristas de 1 cm; sin embargo, cuando se amontonan más de dos capas de cubos de EPU, el sistema empieza a perder líquido debido a que la fuerza de gravedad (aplastamiento de los cubos) supera la fuerza capilar con la que se retiene el medio de cultivo dentro del polímero (Nuñez-Reyes *et al.*, 2022); por lo tanto, la geometría de la EPU debe ser considerada para la producción de metabolitos, incluyendo al ácido cítrico. Por otro lado, las placas de EPU son una geometría práctica, algunos autores han reportado este modelo de estudio para la producción de ácido cítrico, alcanzando rendimientos superiores a los  $0.5 \text{ Cmol/Cmol}$  sobre la fuente de carbono (Pintado *et al.*, 1998; Mora-Pérez *et al.*, 2023).

## **2.12. Comparación de los procesos de FES y FEL**

La FES presenta ciertas ventajas sobre la FEL, pero a su vez tiene ciertas limitaciones que impiden un estudio más preciso sobre el comportamiento microbiano (Favela-Torres *et al.*, 1998). Esto puede deberse a las diferentes condiciones de cultivo que se establecen en cada una; por ejemplo, los procesos de FEL tienen ventajas relacionadas con el control de condiciones (pH, oxígeno disuelto, temperatura), separación de biomasa (después de la fermentación), mezclado, aireación y escalado; sin embargo, la FES presenta ventajas como menor demanda de energía para la esterilización de medio, menor efecto de inhibición por sustrato y permite aprovechar el uso de residuos agroindustriales (Vandenberghe *et al.*, 2020). Para comprender mejor las diferencias entre FES y FEL, es útil ver qué aspectos difieren (Tabla 3).

**Tabla 3.** Análisis comparativo entre condiciones de FES y FEL

<b>Característica</b>	<b>FEL</b>	<b>FES</b>
<b>Aeración</b>	Limitada por solubilidad del oxígeno, se requieren altos niveles de aire	Fácil aireación y alto intercambio en la superficie aire-sustrato
<b>Agitación</b>	Buena Homogenización	Puede dañar la integridad de los microorganismos
<b>Agua</b>	Altos volúmenes consumidos	Menor contenido de humedad
<b>Calentamiento metabólico</b>	Fácil control de temperatura	Difícil control de temperatura
<b>Condiciones Asépticas</b>	Esterilización por calentamiento y control aséptico	Tratamiento por vapor, no hay condiciones estériles
<b>Contaminación</b>	Riesgos de contaminación por bacterias de cepas individuales	Riesgos de contaminación por un lento crecimiento de hongos
<b>Control de pH y composición del medio</b>	Medición directa, adición de ácido, base y nutrientes (fácil control)	Inusual y difícil ajuste durante el proceso
<b>Efluentes</b>	Altos niveles de efluentes	No se producen efluentes, menor polución
<b>Escalamiento</b>	Equipos industriales disponibles (simple)	Difícil diseño por falta de información (compleja)
<b>Gasto de energía</b>	Alto consumo	Bajo consumo
<b>Inoculación</b>	Fácil inoculación, proceso continuo	Inoculación por esporas, por lote.
<b>Sustrato</b>	Solubles (azúcares simples)	Polímeros insolubles (azúcares complejos)
<b>Volumen de equipo</b>	Altos volúmenes y costos en tecnología	Bajos volúmenes y costos de equipos

A pesar de que la FES presenta ciertas desventajas, esta tiene un enorme potencial para la producción de metabolitos como el ácido cítrico, debido a que se ha reportado que los microorganismos pueden crecer con una alta concentración de sustrato en el medio (Viniestra-Gonzalez & Favela-Torres, 2006; Guerrero-Urrutia *et al.*, 2021), siendo esta una característica fundamental para la producción de ácido cítrico; sin embargo, otros estudios han demostrado que el incremento de la concentración de sustrato en la FES favorece la tasa de producción de CO<sub>2</sub> y la producción total de CO<sub>2</sub> (Lareo *et al.*, 2006). Por lo tanto, la alta mineralización del sustrato en procesos de FES representa una clara desventaja para la producción de ácido cítrico.

#### **2.12.1. Comparación de los procesos de FES y FEL para la producción de ácido cítrico**

La producción de ácido cítrico se puede llevar a cabo con diferentes sustratos en dos tipos de procesos de fermentación, FES y FEL cada uno con ventajas y desventajas; por ejemplo, controlar el pH en procesos de FES es muy difícil, sobre todo cuando los cultivos son estáticos. En condiciones de FES se ha reportado la adición de soluciones concentradas de ácido para mantener el pH (Mora-Pérez *et al.*, 2023); sin embargo, esto es insuficiente cuando el proceso se lleva a cabo a una mayor escala. Adicionalmente, se ha reportado que la FES presenta una notable resistencia a la influencia de los elementos traza en comparación con la FEL (Show *et al.*, 2015). Para comprender mejor las diferencias entre FES y FEL, es útil ver qué aspectos difieren (Tabla 4).

**Tabla 4.** Ventajas y desventajas de la FES y FEL para la producción de ácido cítrico.

Proceso	Ventajas	Desventajas
FES	Menores requisitos energéticos y de costos, uso de residuos agroindustriales de bajo costo, mejor transferencia de oxígeno, menor susceptibilidad a la inhibición por elementos traza, bajo riesgo de contaminación bacteriana, menor generación de residuos.	Dificultad sobre el escalamiento, difícil control de los parámetros del proceso y mayores costos de recuperación del producto.
FEL	Mejores mecanismos de control, menores costos laborales, mayor productividad y rendimiento de producto.	Alto costo del medio de cultivo, sensibilidad a la inhibición por metales traza, generación elevada de aguas residuales.

La selección del método de fermentación para la producción de ácido cítrico está condicionada por la naturaleza del sustrato y el tipo de microorganismo empleado. Cabe destacar que cada uno de estos procesos de fermentación demanda la ejecución de fases específicas, que incluyen la preparación del medio de cultivo, la inoculación del microorganismo y finalmente la recuperación del ácido cítrico (Behera *et al.*, 2021).

### **3. Justificación**

Actualmente, el cultivo de *Aspergillus niger* para producir ácido cítrico se realiza por FEL. Este tipo de cultivo es muy sensible al cambio de la concentración de macronutrientes y micronutrientes en el medio de cultivo, lo que incrementa el costo de tratamiento de materias primas. Por otro lado, la producción de ácido cítrico por procesos de FES es más robusta en términos nutricionales, favorece el crecimiento de *Aspergillus brasiliensis* y permite desarrollar procesos más productivos. Muchos estudios, han intentado aumentar el rendimiento de ácido cítrico en FES; sin embargo, estos procesos son altamente mineralizantes y productores de biomasa; por ende, ninguno ha superado el rendimiento obtenido en FEL. Tradicionalmente la FES utiliza residuos agroindustriales; sin embargo, la heterogeneidad y complejidad de estos provocan problemas operativos relacionados con la composición química del medio y problemas analíticos para la cuantificación de sustrato, biomasa y producto. Por ello una alternativa es el uso de soportes inertes como la EPU, debido a su alta capacidad de retención de agua, permitiendo recuperar ácido cítrico concentrado; ya que no es necesario añadir agentes de extracción como ocurre con el uso de residuos agroindustriales como sustrato. Por lo tanto, el uso de soportes inertes como EPU impregnado con un medio definido en estudios de FES permite diseñar condiciones de cultivo precisas para la producción de ácido cítrico. Dando información sobre la fisiología de *A. brasiliensis* y el alcance que tiene en la producción de metabolitos de interés industrial.

### **4. Hipótesis**

El cambio en la relación de nutrientes en el medio de cultivo permite identificar y optimizar las condiciones de cultivo precisas para aumentar la producción de ácido cítrico de *Aspergillus brasiliensis* cuando se cultiva en EPU.

## **5. Objetivo**

### **5.1. General**

Evaluar el efecto de la composición del medio de cultivo definido sobre la producción de ácido cítrico por *Aspergillus brasiliensis* cuando crece en EPU aprovechando las ventajas de la FES.

### **5.2. Específicos**

1. Diseñar una estrategia experimental que permita evaluar el efecto de la composición del medio de cultivo para la producción de ácido cítrico en FES.
2. Determinar el efecto de la composición del medio de cultivo sobre la producción de ácido cítrico y polioles de *Aspergillus brasiliensis* en FES.

## **6. Materiales y métodos**

### **6.1. Microorganismo**

En este estudio se utilizaron las cepas *Aspergillus brasiliensis* ATCC 9642, previamente conocida como *Aspergillus niger* ATCC 9642 (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2016) y *Aspergillus niger* 10 (Favela-Torres *et al.*, 1998). Las cepas forman parte del cepario de la planta piloto de fermentación en medio sólido de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, donde son conservadas en criotubos (TSC Technical Service Consultants Cat no. TS/73-YM 25) con perlas que contienen una solución hipertónica a -20°C y liofilizadas.

### **6.2. Activación y propagación de *Aspergillus spp.***

A partir de un criotubo, se inocularon 2 perlas por cada tubo de ensayo inclinados con medio de cultivo “YPDA” con la siguiente composición (en g/L): Glucosa 20, peptona de caseína 5, extracto de levadura 5 y agar 10. Los tubos de cultivo se incubaron durante siete días a 30°C. Las esporas producidas se re-suspendieron en 20 mL de Tween 80 estéril al 0.05% (v/v). Posteriormente, se usaron 0.5 mL de la suspensión de esporas por matraz, para inocular tres matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de YPDA. Los matraces se incubaron durante siete días a 30°C. Nuevamente, las esporas se recuperaron con 30 mL de solución de Tween 80 estéril al 0.05% (v/v). La suspensión de esporas se usó como inóculo para los estudios de FES. El tamaño de inóculo fue de  $2.7 \times 10^7$  esporas por gramo de soporte inerte.

### **6.3. Soporte y unidad experimental**

Como soporte inerte se utilizó EPU con una densidad de 20 kg/m<sup>3</sup>. La EPU se cortó en cilindros (peso 0.18 g, diámetro 3.5 cm y altura de 1 cm). La EPU fue sometido a un pretratamiento de lavado: (i) lavado con agua desionizada, (ii) lavado con una solución de HCl al 10% (v/v) durante 10 min y lavado con agua desionizada hasta neutralidad, (iii) lavado con una solución de NaOH al 4% (p/v) durante 10 min y lavado con agua desionizada hasta neutralidad. Finalmente, se secó a 60°C durante 24 h (Tomasini *et al.*, 1997) y se almacenó en bolsas de plástico color negro bien cerradas. Como unidad experimental se utilizaron frascos color ámbar (V: 35 mL, h: 3.6 cm, r: 1.75 cm).

### **6.4. Medio de cultivo para la FES**

Se evaluó la composición del medio de cultivo, partiendo de un medio de referencia en donde se favorece la producción de ácido cítrico y polioles (Sánchez-Soto, 2001). La composición del medio basal es (en g/L): Glucosa 300, NaNO<sub>3</sub> 16.5, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5.5, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.284, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 1.50E-02, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.66E-02, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 8.00E-03 y NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 1E-02. Antes de la esterilización del medio se ajustó el pH con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. La composición exacta del medio se detalla en la sección: Diseño experimental.

### **6.5. Fermentación en estado sólido**

Todos los experimentos se llevaron a cabo a 30 ± 1°C por un periodo máximo de 120 h. Se usaron frascos color ámbar (35 mL) que contenían el cilindro de EPU (EPUc). El EPUc y el medio de cultivo se esterilizaron por separado a 93.1 ± 1°C durante 15 min. Después de enfriar el EPUc y el medio de cultivo a temperatura ambiente, se inoculó el medio de cultivo con la suspensión de esporas y se agregó al EPUc, en una relación de 15 mL de medio por gramo de EPU.

## **6.6. Obtención del extracto celular**

Para cuantificar los metabolitos obtenidos de la FES, se obtuvo un extracto celular. Dicho extracto fue obtenido en cada tiempo de muestreo de la siguiente manera: (I) se tomó un frasco ámbar que contenía el EPUc y se metió al refrigerador durante 15 min, (II) posteriormente se retiró el frasco ámbar del refrigerador, se le adicionaron 20 mL de agua desionizada y se agitó durante 30 s, (III) con un embolo de jeringa se prensó el EPUc, (IV) se vació la fase líquida a un tubo Falcón de 15 mL, (V) en una centrifuga (Beckman Coulter Allegra X-12R) se colocaron los tubos Falcon de 15 mL a 3500 rpm durante 10 min y posteriormente se recuperó el sobrenadante (extracto celular). Se cuantificó pH y la producción de metabolitos a partir del extracto celular; posteriormente, se cuantificó biomasa por gravimetría.

## **6.7. Métodos analíticos**

### **6.7.1. pH**

Durante cada toma de muestra de la FES, se determinó el pH del extracto celular utilizando un potenciómetro Conductronic pH120.

### **6.7.2. Biomasa**

La biomasa se determinó durante cada toma de muestra de la FES, para esto primero se pesó el papel filtro Whatman 41, posteriormente se colocaron a peso constante durante 24 h. El EPUc que quedó dentro del frasco ámbar después de la obtención del extracto celular se colocó sobre un embudo Büchner con su respectivo papel filtro. Para el precipitado (biomasa) que quedó en el tubo Falcon, se lavó con exceso de agua y se filtró nuevamente en el papel filtro que contenía el EPUc. Finalmente, se secó el papel filtro con el retenido a 60 °C por 24 h, el valor de la biomasa se obtuvo por gravimetría.

### 6.7.3. Cuantificación de glucosa y metabolitos extracelulares

Para la cuantificación de glucosa, ácido cítrico, eritrol y glicerol en el extracto celular, se utilizó un sistema HPLC marca Perkin Elmer, utilizando un método isocrático. Usando una columna Aminex HPX-87H de exclusión iónica (BioRad, Hercules, CA, USA) a una temperatura de 60°C, con una fase móvil de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM y un flujo de 0.6 mL/min (Diano *et al.*, 2009). Se utilizó un detector de índice de refracción (LC-30 RI) marca Perkin Elmer.

### 6.8. Determinación del rendimiento

A partir de la cuantificación de la glucosa, metabolitos y biomasa, se determinaron los rendimientos en base Cmol (Ec. 1).

**Ecuación 1.** Para la determinación de rendimiento en base Cmol.

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Metabolito producido (Cmol)}}{\text{Glucosa consumida (Cmol)}}$$

En donde, se supuso que la biomasa tenía una fórmula empírica generalizada de CH<sub>1.8</sub>O<sub>0.55</sub>N<sub>0.25</sub>, misma que ha sido reportada para el estudio de *A. niger* (Papagianni *et al.*, 2007; Popovic, 2019).

### 6.9. Análisis estadístico

Para determinar el efecto de los factores que afectan la producción de ácido cítrico y polioles, se realizó una serie de diseños experimentales. Todos los tratamientos se realizaron por quintuplicado. Los datos experimentales se evaluaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el software estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI. El nivel de significancia se fijó en p<0,05, lo cual indica que las variables fueron significativamente diferentes de cero al 95% de confianza.

## 6.10. Diseño experimental

Los diseños experimentales fueron evaluados mediante una serie de diseños factoriales completos (DFC), fraccionados (DFF). Cada diseño detalla ampliamente los factores evaluados junto con la composición del medio de cultivo. Cada variable fue analizada en dos niveles distintos, representados como (-1, +1).

### 6.10.1. Efecto del microorganismo y la adición de metanol sobre la producción de ácido cítrico

En este primer diseño se planteó un DFC 2<sup>2</sup>, en el cual los factores evaluados fueron (Tabla 5): la cepa de *Aspergillus spp.* utilizada en la fermentación y la concentración de metanol adicionado en el medio de cultivo, dando como resultado 4 tratamientos. Se utilizó el medio basal reportado por Sánchez-Soto (2001) como medio de cultivo. Las variables de respuesta fueron: la biomasa, pH, producción de ácido cítrico, eritrol, glicerol y consumo de glucosa.

**Tabla 5.** Diseño factorial 2<sup>2</sup>, utilizado para determinar el efecto del microorganismo y la adición de metanol sobre la producción de metabolitos. La concentración de metanol (B) está dada en % (v/v).

Factor	Código	Bajo (-1)	Alto (1)
Microorganismo	A	<i>Aspergillus niger</i> 10	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 9642
Metanol	B	0	3

### 6.10.2. Efecto del pH sobre la producción de ácido cítrico

Posteriormente se evaluó el efecto del pH inicial en tres niveles: 3, 4 y 6 en el medio de cultivo. Utilizando *A. brasiliensis* ATCC 9642 y el medio basal reportado por Sánchez-Soto (2001). Teniendo como variables de respuesta a la biomasa, pH, producción de ácido cítrico, glicerol y consumo de glucosa.

### 6.10.3. Efecto de la concentración de glucosa y pH sobre la producción de ácido cítrico

Como tercer diseño se planteó un DFC 2<sup>2</sup> (tabla 6), en el cual los factores evaluados fueron: la concentración inicial de glucosa y el pH del medio de cultivo, dando como resultado 4 tratamientos. Durante este diseño únicamente se modificó la concentración de glucosa del medio basal reportado por Sánchez-Soto (2001). Las variables de respuesta fueron: la biomasa, pH, producción de ácido cítrico, eritrol, glicerol y consumo de glucosa.

**Tabla 6.** Diseño factorial 2<sup>2</sup>, utilizado para determinar el efecto de la concentración de sustrato y pH sobre la producción de metabolitos. La concentración de glucosa (A) esta dada en mg/mL.

Factor	Código	Bajo (-1)	Alto (1)
Glucosa	A	100	200
pH	B	3.5	4.5

#### 6.10.4. Efecto de la composición del medio de cultivo sobre la producción de ácido cítrico

Durante el cuarto diseño se planteó un DFF  $2^{6-2}$  (tabla 7) modificando el medio basal reportado por Sánchez-Soto (2001); adicionalmente, se agregó extracto de levadura al medio y se ajustó el pH a 3.5. Los factores evaluados en este diseño fueron: la concentración de glucosa,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , oligoelementos y extracto de levadura, dando como resultado 16 tratamientos. Las variables de respuesta fueron: la biomasa, pH, producción de ácido cítrico, eritrol, glicerol y consumo de glucosa.

**Tabla 7.** Diseño factorial  $2^{6-2}$ , utilizado para determinar el efecto de la composición del medio de cultivo sobre la producción de metabolitos. La concentración de los factores está dada en mg/mL.

Factor	Código	Bajo (-1)	Alto (1)
Glucosa	A	150	250
$\text{NaNO}_3$	B	16.50	24.75
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	C	5.50	8.25
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	D	0.284	0.426
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	E	1.50E-02	2.25E-02
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		1.66E-02	2.49E-02
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$		8.00E-03	1.20E-02
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		1.00E-02	1.50E-02
Extracto de levadura	F	0.05	0.075

### 6.10.5. Efecto de la concentración de $K_2HPO_4$ , $MgSO_4$ y una solución mineral con glucosa sobre la producción de ácido cítrico

Posteriormente, se planteó un DFC  $2^3$  (tabla 8) en el cual los factores evaluados fueron: la concentración de  $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  y una solución mineral con glucosa (SMCG), dando como resultado 8 tratamientos, los cuales fueron ajustados a un valor inicial de pH de 3.5. Las variables de respuesta fueron: la biomasa, pH, producción de ácido cítrico, eritrol, glicerol y consumo de glucosa.

**Tabla 8.** Diseño factorial  $2^3$ , utilizado para determinar el efecto de la concentración de  $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  y una solución mineral con glucosa sobre la producción de metabolitos. La concentración de los factores está dada en mg/mL.

Factor	Código	Bajo (-1)	Alto (1)
Glucosa		125	150
$NaNO_3$		16.5	16.5
Extracto de levadura		0.1	0.15
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	A	1.50E-02	2.25E-02
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$		1.66E-02	2.49E-02
$MnSO_4 \cdot H_2O$		8.00E-03	1.20E-02
$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$		1.00E-02	1.50E-02
$K_2HPO_4$	B	4.54	5.95
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	C	0.26	0.38

### 6.10.6. Efecto de la concentración de elementos traza y extracto de levadura sobre la producción de ácido cítrico

Para el sexto diseño se planteó un DFC 2<sup>2</sup> (tabla 9), modificando el medio basal reportado por Sánchez-Soto (2001) y ajustado el medio a pH 3.5. Los factores evaluados en este diseño fueron: los elementos traza y el extracto de levadura, dando como resultado 4 tratamientos. Las variables de respuesta fueron: la biomasa, pH, producción de ácido cítrico, eritrol, glicerol y consumo de glucosa.

**Tabla 9.** Diseño factorial 2<sup>2</sup>, utilizado para determinar efecto de la concentración de elementos traza y extracto de levadura sobre la producción de metabolitos. La concentración de los factores está dada en mg/mL.

Factor	Código	Bajo (-1)	Alto (1)
Glucosa		150	150
NaNO <sub>3</sub>		16.5	16.5
Extracto de levadura	A	0.08	0.15
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	B	1.50E-02	2.25E-02
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O		1.66E-02	2.49E-02
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O		8.00E-03	1.20E-02
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O		1.00E-02	1.50E-02
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		5.5	5.5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O		0.43	0.43

## 7. Resultados y discusión

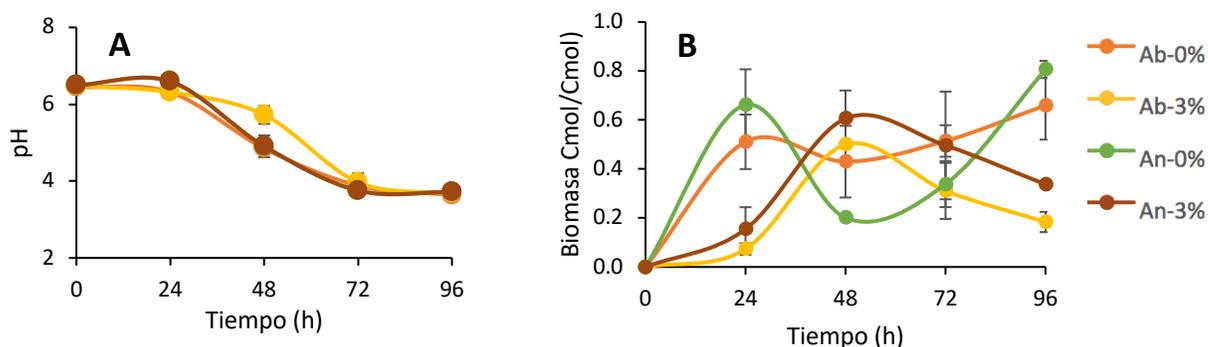
### 7.1. Efecto del microorganismo y la adición de metanol sobre la producción de ácido cítrico

Se ha reportado que la adición de alcoholes como el metanol, etanol, isopropanol en baja concentración (del 1 al 5%) tiene un efecto estimulante sobre la producción de ácido cítrico. La razón exacta de dicho fenómeno aún no es completamente clara; sin embargo, existen varias hipótesis entre las cuales se mencionan: (I) el microorganismo utiliza como fuente de carbono al etanol y metanol, (II) el metanol actúa como inductor de la actividad de la citrato sintasa, (III) simultáneamente reduce la actividad de la aconitasa, (IV) los alcoholes modifican la composición de la membrana afectando su permeabilidad. El aumento en la permeabilidad celular tiene un efecto positivo sobre la secreción de citrato (Alekseev *et al.*, 2015). Adicionalmente, se ha reportado que la adición de metanol y etanol en el medio aumenta notablemente los niveles de tolerancia de oligoelementos como el manganeso, hierro y zinc por encima de los niveles requeridos para crecimiento (Dhillon *et al.*, 2011).

Por otro lado, el aumento de la producción de ácido cítrico se ha logrado mediante la selección de cepas. Las cepas son seleccionadas de acuerdo con ciertas características, como una alta producción y productividad de ácido cítrico (Rodrigues *et al.*, 2013). Tradicionalmente, el ácido cítrico se produce utilizando *A. niger*, debido a su alta capacidad de producción con respecto a otros microorganismos; sin embargo, *A. brasiliensis* antes catalogada como *A. niger* también ha sido reportado con la misma capacidad para producir ácido cítrico (Canada, 2014; Mora-Pérez *et al.*, 2023). Por lo tanto, durante esta etapa se evaluó la influencia de estos factores sobre la producción de ácido cítrico en condiciones de FES. Para esto, se compararon dos cepas de *Aspergillus spp.* con una concentración inicial de metanol (0 y 3%), los experimentos se seleccionaron utilizando un DFC (Tabla 5).

Durante la fermentación, el pH disminuyó de un valor inicial entre 6.5-7 a un valor de 3.5 a las 96 horas de cultivo en todas las condiciones, esto se debe a la síntesis de ácido cítrico y

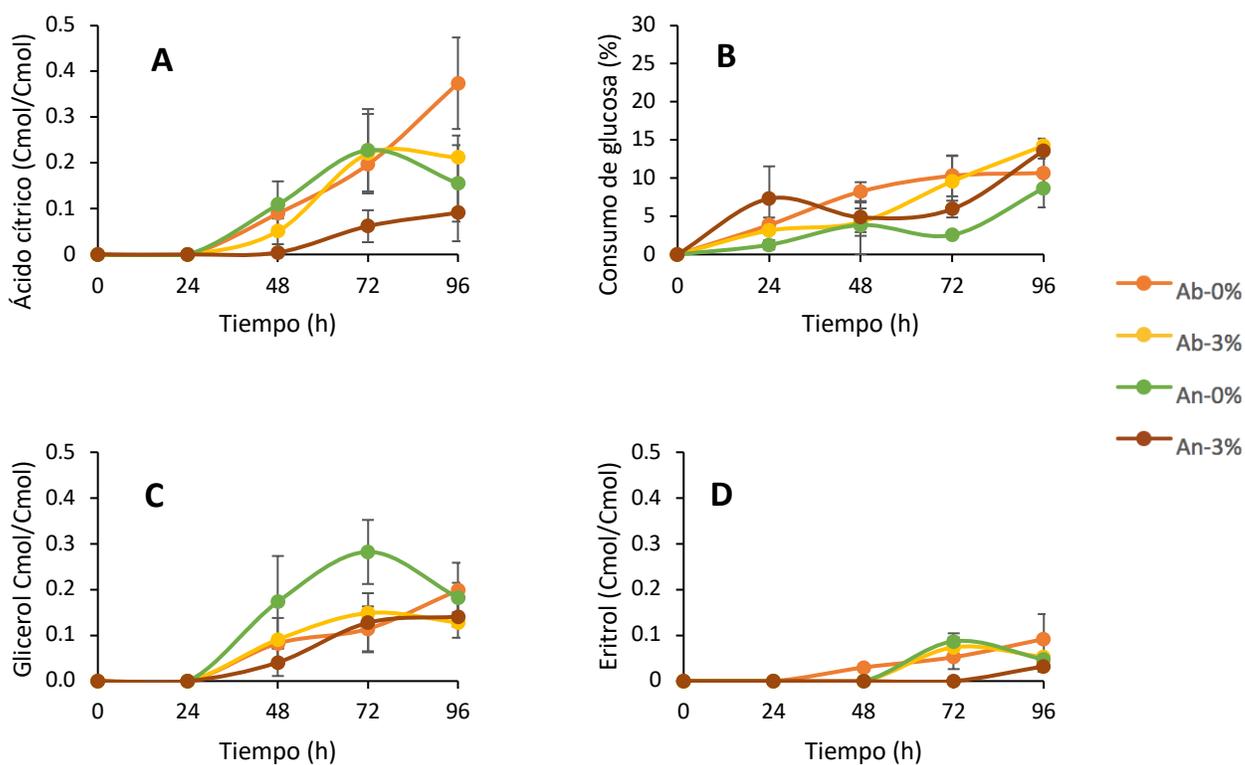
su secreción al medio extracelular. La gráfica 1 muestra que entre las 24 y 72 horas de cultivo, el pH registra una reducción de 2 unidades, este fenómeno concuerda con la tendencia observada en la gráfica 2 (A), la cual muestra un incremento sobre la producción de ácido cítrico durante el mismo intervalo de tiempo. Esta observación, coincide con lo reportado por Soccol et al. (2006), quien reporta que las especies de *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Rhizopus sp.*, frecuentemente producen ácidos orgánicos, ocasionando una rápida acidificación del medio. Los datos de pH y biomasa obtenidos se presentan a continuación.



**Gráfica 1.** Análisis cinético de pH (A) y biomasa (B) de *A. niger* y *A. brasiliensis* en fermentación en estado sólido ante variaciones de microorganismo y adición de metanol.

En relación con la producción de biomasa, se observa que, las condiciones sin la adición de metanol exhiben valores superiores de producción a las 24 horas de cultivo, alcanzando valores a 0.4 Cmol/Cmol. En contraste, en las condiciones que involucran la presencia de metanol, la producción máxima se logra a las 48 horas de cultivo, aproximándose a 0.5 Cmol/Cmol. A pesar de estos resultados, al llegar a las 96 horas de cultivo, se observa que las condiciones sin la adición de metanol presentan valores más elevados, registrando valores superiores a los 0.6 Cmol/Cmol. Estos hallazgos respaldan la conclusión de que, posterior a las 72 horas de cultivo, la adición de metanol ejerce un efecto inhibitorio sobre el crecimiento. Algunos estudios sugieren que alcoholes como metanol, etanol, propanol, entre otros, estimulan la producción de ácido cítrico al afectar el crecimiento y la esporulación de *Aspergillus spp.* debido a cambios en la composición de la membrana celular (Behera et al., 2021; Kubicek & Röhr, 1986). La producción de metabolitos bajo

diferentes condiciones de cultivo resultó ser sustancialmente baja, con valores inferiores a 0.4 Cmol/Cmol (Gráfica 2). La mayor producción de ácido cítrico fue obtenida al utilizar la especie *A. brasiliensis*; sin embargo, se observó una disminución de 0.16 Cmol/Cmol sobre la producción de ácido cítrico al adicionar metanol. En relación a la producción de polioles, se encontró que el glicerol fue producido en mayor concentración que el eritrol, obteniéndose una producción máxima de 0.28 Cmol/Cmol al utilizar *A. niger* a las 72 h de cultivo. Asimismo, se observó un efecto similar en cuanto a la producción de eritrol, donde se obtiene una producción máxima de 0.09 Cmol/Cmol en *A. brasiliensis* a las 96 h de cultivo.

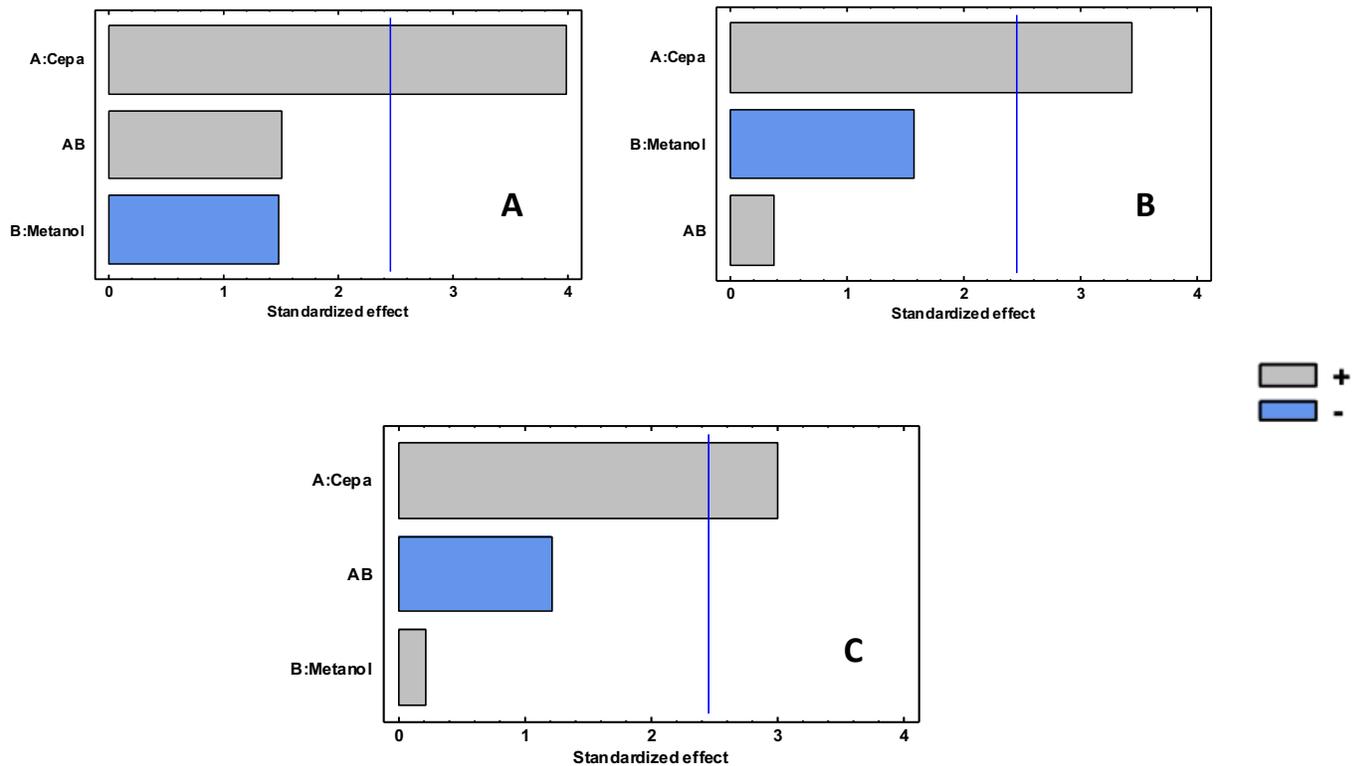


**Gráfica 2.** Análisis cinético de la producción de ácido cítrico (A), consumo de glucosa (B), glicerol (C) y eritrol (D) de *A.niger* y *A. brasiliensis* en fermentación en estado sólido ante variaciones de cepa y adición de metanol al medio.

El consumo de glucosa, muestra un patrón similar en ambas cepas microbianas, caracterizado por un bajo consumo que resulta en valores finales inferiores al 15%. Este fenómeno puede atribuirse a la concentración inicial de glucosa en el medio (300 mg/mL), la cual probablemente inhibe el crecimiento de los microorganismos. Además, la escasa utilización de glucosa podría explicar la producción limitada de ácido cítrico y polioles en el medio. De acuerdo con Favela et al. (1998), el consumo de glucosa por parte de *A.niger* 10 es más eficaz en FES que en FEL; en FES, se alcanza un consumo superior al 50% después de 80 h de cultivo, cuando la glucosa se encuentra en concentraciones de 350 y 450 mg/mL; en contraste, en FEL observan un consumo del 50% a 100 mg/mL y aproximadamente el 20% cuando la concentración es de 200 mg/mL. Por lo tanto, se puede apreciar que las condiciones de FES en EPU son más semejantes a las de FEL de acuerdo a este reporte. Adicionalmente, Diano et al. (2006) reportaron que la elevada concentración de carbono provoca un aumento en la presión osmótica del medio, lo cual puede ocasionar una prolongada fase lag que puede extenderse por más de 40 horas. Este fenómeno podría explicar la falta de un consumo significativo de la glucosa presente en el medio.

### 7.1.1. Validación del diseño experimental

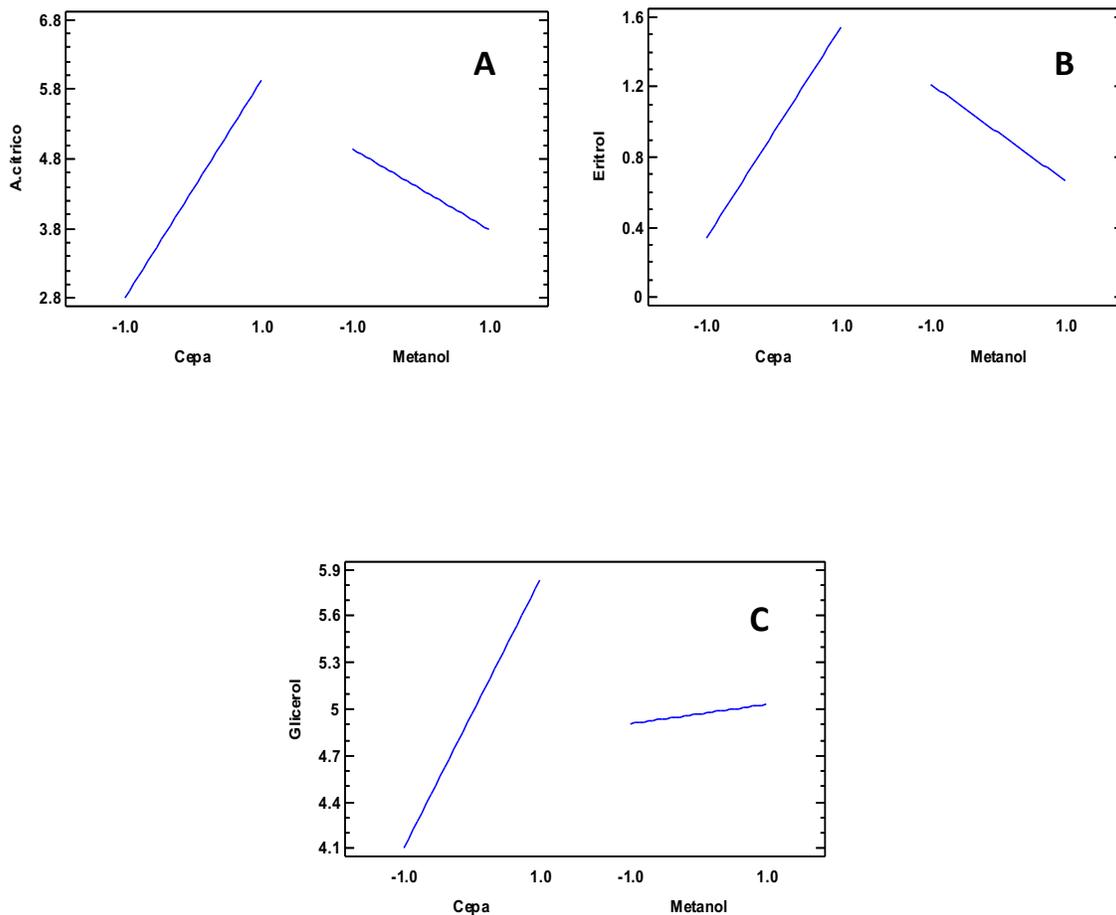
Para el análisis de los datos se emplearon herramientas estadísticas, incluyendo gráficas de Pareto y de factores principales para cada metabolito analizado. En este diseño, se consideraron dos factores: la concentración de metanol en el medio y la cepa utilizada, con dos niveles cada uno, generando un diseño factorial  $2^2$ . La Gráfica 3 presenta los diagramas de Pareto correspondientes a las producciones de ácidos orgánicos y polioles en la FES.



**Gráfica 3.** Diagramas de Pareto para analizar los factores que influyen en la producción de ácido cítrico (A), eritrol (B) y glicerol (C) en cultivo sólido, específicamente en relación con la cepa y la adición de metanol. Para el factor cepa se utiliza el color gris para representar la cepa *A. brasiliensis* y el color azul para *A. niger*. Las barras de color gris representan los efectos positivos sobre la variable de respuesta, mientras que las barras de color azul representan los efectos negativos sobre la misma variable de respuesta. Se ha establecido una línea vertical de color azul para indicar el punto donde los efectos se consideran estadísticamente significativos con un valor de p menor o igual a 0.05.

La cepa fue el único factor que se identificó como estadísticamente significativo en relación con la producción de ácido cítrico, eritrol y glicerol. En particular, la barra de color gris indica

que la cepa *A. brasiliensis* presentó una mayor producción de los metabolitos mencionados. Por otro lado, se determinó que la adición de metanol no tuvo un efecto significativo en la producción de ácido cítrico y polioles, lo que implica que no es necesario agregar metanol para aumentar la producción de estos metabolitos. En el análisis estadístico se incluyen gráficas que representan las interacciones de los efectos principales, lo que permite observar la tendencia en cuanto a la mejor combinación de factores o condiciones de cultivo.



**Gráfica 4.** Gráfica de interacción de los factores principales que afectan la producción de ácido cítrico (A), eritrol (B) y glicerol (C) en cultivo sólido. Se utiliza el valor +1 para representar la cepa *A. brasiliensis* y el valor -1 para *A. niger*. En cuanto al factor metanol, se utiliza el valor +1 para indicar una concentración del 3% (v/v) y el valor -1 para indicar una concentración del 0% (v/v).

En relación a las gráficas de producción de ácido cítrico y eritrol, se puede observar una tendencia similar en la cual se destaca una mayor producción cuando se utiliza la cepa *A. brasiliensis*, mientras que la adición de metanol no parece influir significativamente en la producción de estos metabolitos. En cuanto a la producción de glicerol, se observa que también se favorece cuando se utiliza la cepa *A. brasiliensis*, aunque en este caso la adición de metanol muestra un ligero beneficio en la producción de este metabolito. No obstante, es importante destacar que el diagrama de Pareto demostró que la adición de metanol no tiene un efecto significativo en la producción de glicerol, por lo que esta observación debe ser tomada con precaución. El primer diseño experimental permitió identificar que la cepa *A. brasiliensis* y la ausencia de metanol en el medio de cultivo favorecen la producción de los metabolitos como el ácido cítrico, eritrol y glicerol en cultivo sólido. En todos los casos hay un bajo consumo de fuente carbono, posiblemente debido a la elevada concentración de glucosa o a algún nutriente limitante. Numerosos estudios han indicado que un pH por debajo de 4 es crucial para la producción de ácido cítrico (Max *et al.*, 2010; Show *et al.*, 2015). Basándonos en estas conclusiones, se determinó que es necesario profundizar en el análisis del efecto del pH inicial del medio para obtener las condiciones óptimas para la producción de ácido cítrico.

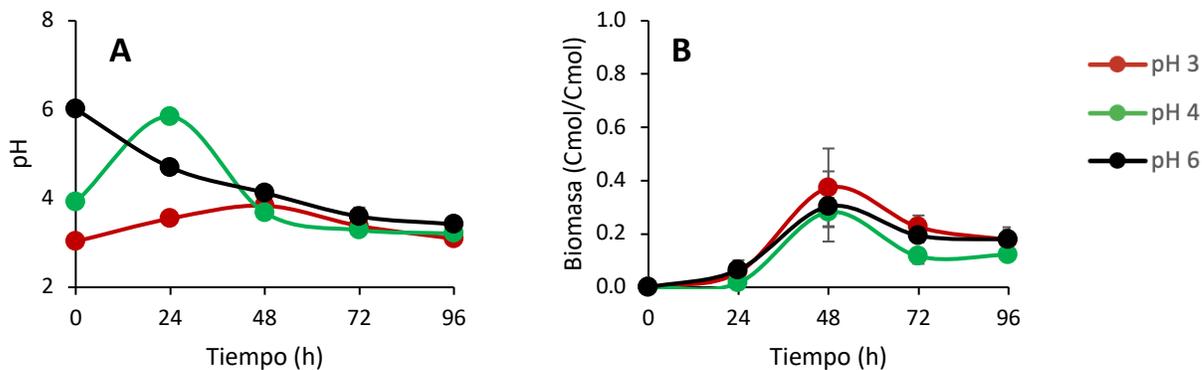
## 7.2. Efecto del pH sobre la producción de ácido cítrico

El control del pH es un factor crítico en la producción de ácido cítrico, donde se ha demostrado que se obtienen los mejores rendimientos en un rango de valor entre 2.5 y 3.5 en medio líquido (Max *et al.*, 2010); sin embargo, este comportamiento aún no ha sido estudiado en profundidad en sistemas de cultivo sólido.

El monitoreo y control del pH en los procesos fermentativos es una tarea compleja, especialmente en cultivos estáticos. El uso de soluciones buffer ha sido una estrategia común para mantener el pH, aunque puede resultar insuficiente a mayor escala. Otra técnica es la adición de una mezcla de fuentes de nitrógeno al medio de cultivo (Raimbault, 1998). Cabe destacar que la variación del pH durante el cultivo depende en gran medida del microorganismo utilizado. Mientras que algunos hongos como *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.* y *Rhizopus spp.* pueden reducir rápidamente el pH a valores inferiores a 3, otros como *Trichoderma spp.*, *Sporotrichum spp.* y *Pleurotus spp.* tienden a mantenerlo estable en un rango entre 4 y 5 (Soccol *et al.*, 2006). Asimismo, el tipo de sustrato también tiene una importante influencia en el pH del cultivo (Raimbault, 1998). En vista de la importancia del pH en la producción de metabolitos, se propuso un diseño experimental para evaluar su efecto en la síntesis de ácido cítrico y polioles. Para tal fin, se planteó la utilización de distintos valores de pH inicial del medio de cultivo: 3, 4 y 6.

Durante el proceso de fermentación, se observó una disminución del pH inicial de 6 a un valor de 4.7 a las 24 horas de cultivo. Por otro lado, los valores de pH iniciales de 3 y 4 aumentaron a 3.5 y 5.8, respectivamente, en el mismo periodo de tiempo; no obstante, disminuyeron después de 48 horas de cultivo, obteniendo un pH final alrededor de 3.5 en todas las condiciones. Estos resultados concuerdan con el estudio realizado por de Oliveira *et al.* (2022), en el cual se observó una disminución del pH después de 48 horas de cultivo al utilizar cáscaras de vainas de cacao como sustrato sólido. Además, se menciona que la producción aumentada de ácido cítrico se alcanza en valores de pH bajos, el cual favorece

la producción de ácido cítrico en lugar de otros ácidos indeseados como el ácido oxálico, que puede interferir en el proceso de recuperación de ácido cítrico. Adicionalmente, los pH bajos minimizan el problema de contaminación por otros microorganismos.

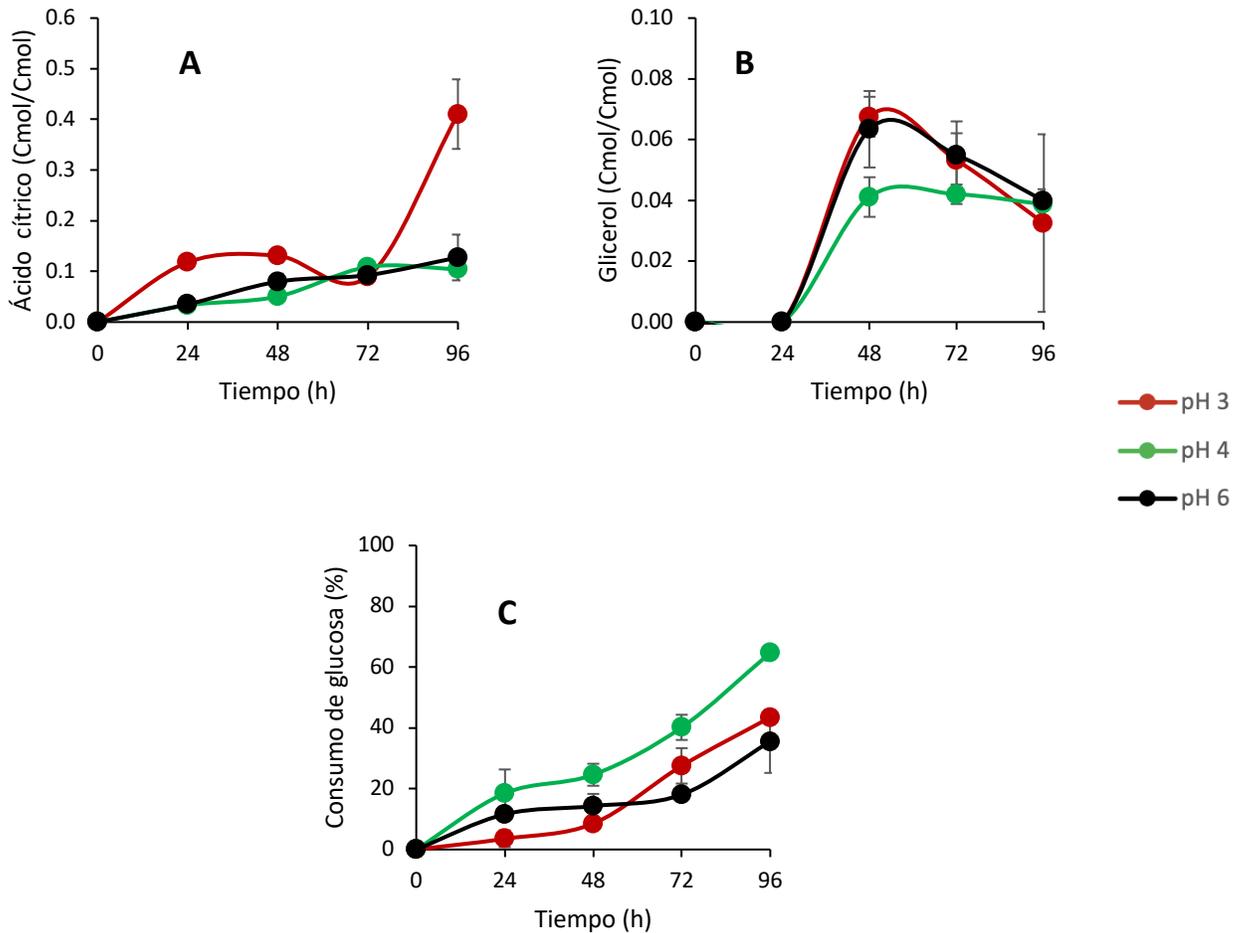


**Gráfica 5.** Análisis cinético de pH (A) y biomasa (B) de *A. brasiliensis* en FES ante variaciones de pH inicial.

En cuanto a la producción de biomasa, se observó una similitud en el comportamiento de todas las condiciones de cultivo. A las 48 horas de cultivo, hubo un incremento en todas las condiciones; no obstante, es importante resaltar que el valor inicial de pH establecido en 3 favoreció la producción de biomasa, alcanzando un valor aproximado de 0.37 Cmol/Cmol. A pesar de este resultado positivo en el periodo inicial, se constata que en todas las condiciones se alcanzó un valor final por debajo de 0.2 Cmol/Cmol a las 96 horas de cultivo. Otros autores han reportado que la producción de ácido cítrico mediante FES a partir de subproductos lignocelulósicos, como cáscaras de naranja y residuos de granada, utilizando diferentes cepas de *A. niger*, puede verse afectada por variaciones en los valores óptimos de pH (Kim *et al.*, 2014; Roukas *et al.*, 2020). Estas variaciones se deben a las diferentes composiciones de los sustratos utilizados para la producción de ácido cítrico. Además, señalan que en el caso de los residuos de cáscara de granada, el crecimiento fúngico no se favorece a valores iniciales de pH bajos debido a la alta concentración de compuestos fenólicos, los cuales pueden inhibir el crecimiento microbiano (Roukas *et al.*, 2020).

En relación a la producción de metabolitos, se puede observar que a pH inicial de 3 se favorece la producción de ácido cítrico, obteniendo un valor de 0.4 Cmol/Cmol, mientras

que un pH inicial de 4 y 6 resultaron en una producción de ácido cítrico de 0.12 y 0.1 Cmol/Cmol, respectivamente. En lo que respecta a la producción de polioles, se observó que no hubo producción de eritrol, siendo el único poliol producido el glicerol con una producción de aproximadamente 0.04 Cmol/Cmol en todas las condiciones.



**Gráfica 6.** Análisis cinético de la producción de ácido cítrico (A), glicerol (B) y consumo de glucosa (C) de *A. brasiliensis* en FES ante variaciones de pH inicial.

La gráfica 6 describe la relación entre el pH inicial del medio de cultivo y el consumo de glucosa en función del tiempo, donde podemos observar que el consumo de glucosa muestra un comportamiento similar; sin embargo, a valores de pH bajo como 3 y 4, se muestra un consumo mayor en lo que respecta a un pH de 6, teniendo valores del 40% y 60% respectivamente, con respecto al 35% a valor de pH 6. La tendencia de consumo observada en este estudio es análoga a la documentada en estudios previos con cultivo

sólido de *A. niger* en resina de amberlita por Gutierrez-Rojas *et al.* (1995) y en melaza de remolacha por Guc *et al.* (2017), lo cual sugiere que las condiciones de FES tienen un impacto significativo en este fenómeno.

Con base en los resultados obtenidos, procederemos a clasificar las distintas etapas del estudio en función del rendimiento máximo alcanzado para el ácido cítrico. El propósito de esta evaluación es discernir el éxito o fracaso de cada etapa propuesta, con el objetivo de identificar las condiciones óptimas para la producción de ácido cítrico por *A. brasiliensis* cuando crece en EPUc impregnado de un medio de cultivo definido. A continuación, se presentan en la tabla 10 los rendimientos más favorables obtenidos en los mismos.

**Tabla 10.** Máximo rendimiento de ácido cítrico en FES por etapa.

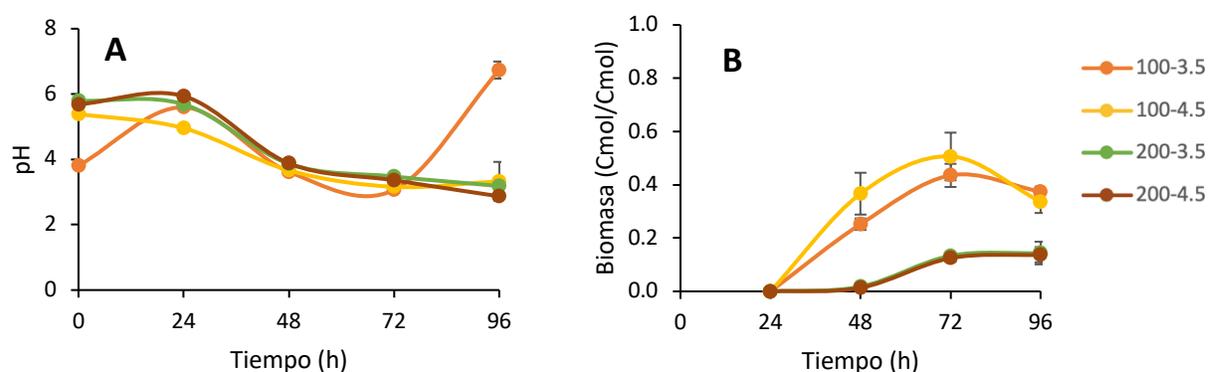
Etapa	Experimento	Ácido cítrico (Cmol/Cmol)
1	Efecto del microorganismo y la adición de metanol sobre la producción de ácido cítrico	0.37
2	Efecto del pH sobre la producción de ácido cítrico	0.41

Se identificó que la producción de ácido cítrico por *A. brasiliensis* se favorece a valores de pH de 3. A partir de esta observación, se ha establecido que el pH inicial del medio debe ajustarse específicamente a este valor. Aunque se observó un incremento en el consumo de glucosa (60%), en comparación del diseño anterior (15%), es necesario aumentar la eficiencia del consumo de fuente de carbono. Con este propósito, se plantea la implementación de un diseño experimental con el fin de investigar el impacto de la concentración inicial de glucosa en un entorno a pH bajo.

### **7.3. Efecto de la concentración de glucosa y pH sobre la producción de ácido cítrico**

El tipo y la concentración del sustrato son factores cruciales en el proceso de producción de ácido cítrico. Los hongos son capaces de metabolizar diversas fuentes de carbono, como hidrocarburos, melazas, etanol, glicerol, galactosa y glucosa, entre otros (Börekçi *et al.*, 2021). Es esencial contar con carbohidratos que sean fermentados rápidamente por el microorganismo para lograr una producción óptima de este metabolito. Se ha observado que el rendimiento de ácido cítrico utilizando glucosa disminuye significativamente por debajo de una concentración de 100 mg/mL y que la síntesis de este metabolito se detiene por completo a una concentración menor a 50 mg/mL (Alekseev *et al.*, 2015). Adicionalmente, en cualquier proceso de FES, el pH del medio es un factor relevante que puede variar en respuesta a la actividad metabólica del microorganismo. En la producción de ácido cítrico, es necesario controlar el pH entre 2.5 y 3.5 para obtener un incremento significativo en el rendimiento del proceso (Max *et al.*, 2010). Esta medida se debe a la secreción de ácidos orgánicos que causan una disminución del pH. El pH del medio de fermentación cambia significativamente durante la producción de ácido cítrico. Al inicio, las esporas requieren un pH > 5 para germinar, y una vez que germinan y el hongo comienza a producir ácido cítrico, el pH del medio naturalmente disminuirá, llegando a un valor alrededor de 2 (Chergui *et al.*, 2021). Para evaluar el efecto de la concentración de sustrato y el pH sobre la producción de ácido cítrico utilizando EPU como soporte, se diseñó un DFC. A pesar de haber realizado ajustes en el rango de pH inicial entre 3.5 y 4.5 en todos los tratamientos, se observó que, en términos generales, los valores de pH comenzaron en 6, con la única excepción del medio con una concentración de 100 mg/mL de glucosa y un pH de 3.5. Esta discrepancia se atribuye al hecho de que, durante el ajuste del pH del medio, se permitió que este alcanzara valores superiores a los ajustados en la etapa anterior. Como resultado de este desajuste, al agregar el medio al EPUc, se produjo un aumento en el pH, alcanzando un valor de 6. Después de 48 horas, el pH disminuyó y alcanzó un valor cercano a 3.8. Estos resultados coinciden con lo informado por Roukas *et al.* (2020), quienes

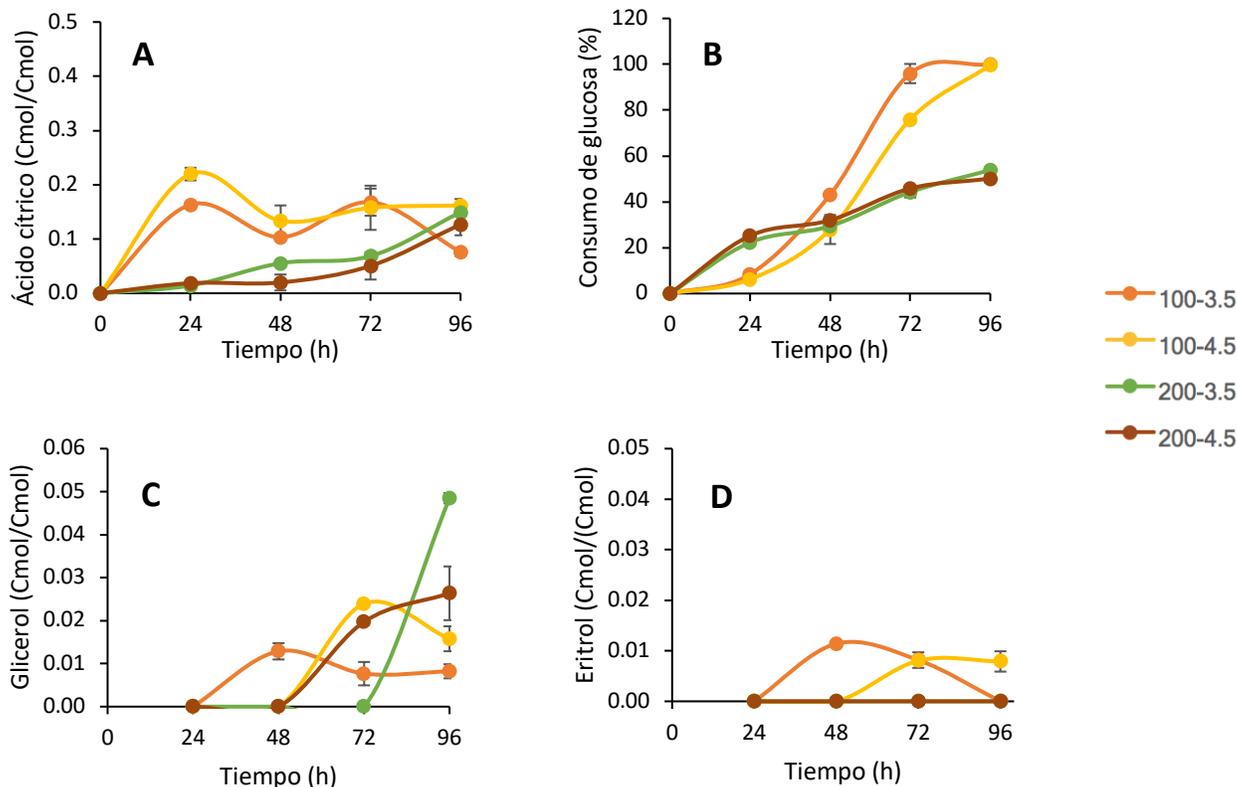
reportaron que en cultivos desarrollados a diferentes valores de pH inicial (4-7), el valor final de pH fluctuó entre 2.8 y 3.5 después de 8 días de fermentación. Además, mencionaron que la producción de ácido cítrico no se favorece en valores de pH bajos debido al uso de cáscara de granada como sustrato, la cual contiene una alta concentración de compuestos fenólicos. Otros autores han establecido que el pH inicial del medio depende del sustrato utilizado. En el caso de medios químicamente definidos, se ha encontrado que el rango óptimo es de 2.5 a 4, mientras que en medios complejos, se ha determinado que un pH inicial de 6 a 7.5 es el más adecuado (Behera *et al.*, 2021; Soccol *et al.*, 2006).



**Gráfica 7.** Análisis cinético de pH (A) y biomasa (B) de *A. brasiliensis* en FES ante variaciones de concentración inicial de sustrato y pH.

En relación con la producción de biomasa, esta experimentó un incremento exponencial a partir de las 24 horas de cultivo. Valores cercanos a 0.4 Cmol/Cmol fueron alcanzados únicamente en las condiciones con una concentración inicial de glucosa de 100 mg/mL. En contraste, bajo concentraciones de 200 mg/mL de glucosa inicial, se registraron valores inferiores de 0.15 Cmol/Cmol. Se destaca que la concentración de glucosa ejerció un efecto negativo sobre la producción de biomasa, observándose una disminución en la producción a medida que se incrementa la concentración inicial de glucosa. Del mismo modo, la producción de ácido cítrico inició después de 24 horas de cultivo, lo cual es consistente con su patrón típico de inicio durante la fase de crecimiento exponencial y alcanzando su máximo en la fase estacionaria (Ozidal & Kurbanoglu, 2019).

El gráfico 8 muestra la producción de ácido cítrico, polioles y el consumo de glucosa en un sistema de FES. Se observa que el ácido cítrico fue el compuesto con la mayor producción en todas las condiciones evaluadas, alcanzando aproximadamente 15 mg/mL, excepto en el cultivo con una concentración de glucosa de 100 mg/mL y un pH de 3.5. Este último caso se caracterizó por el agotamiento completo del sustrato, lo que resultó en el consumo del ácido cítrico después de 72 horas por parte de *A. brasiliensis*. En lo que respecta a la síntesis de glicerol, se observa que a una concentración de glucosa de 100 mg/mL, este se acumula a partir de las 48 horas. Sin embargo, cuando la concentración de glucosa incrementa a 200 mg/mL, la producción de glicerol no se observa hasta 72 horas. Por otro lado, la producción de eritrol únicamente se presenta cuando la concentración de glucosa en el medio de cultivo es de 100 mg/mL. Diversos autores han reportado que el aumento de la concentración de la fuente de carbono da como resultado niveles elevados de glicerol y eritrol extracelular, debido al aumento en la presión osmótica del medio (Diano *et al.*, 2006; Diano *et al.*, 2009). Este patrón observado en la producción de polioles podría ser atribuible al hecho de que *A. brasiliensis* no ha consumido completamente la glucosa. Al analizar el gráfico de producción de glicerol, se evidencia que su aumento es apenas considerable a las 96 horas de cultivo, mostrando un aumento exponencial. Esto podría indicar que el eritrol está próximo a acumularse en ese punto para los cultivos con una concentración de 200 mg/mL de glucosa. Esto demuestra un efecto dual de la presión osmótica y la concentración de carbono en la producción de polioles.



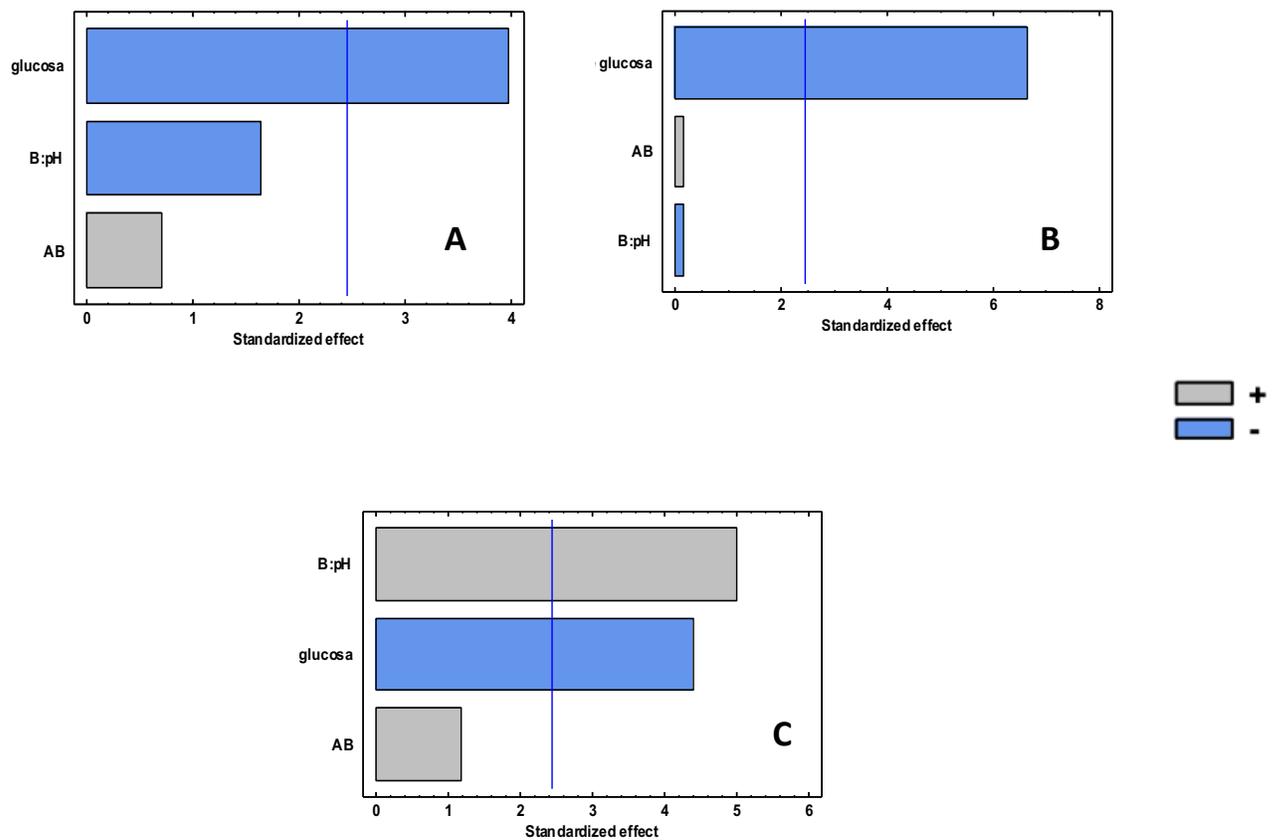
**Gráfica 8.** Análisis cinético de la producción de ácido cítrico (A), consumo de glucosa (B), glicerol (C) y eritrol (D) de *A. brasiliensis* en FES ante variaciones de concentración de glucosa y pH inicial.

En relación al consumo de glucosa, se observó que en los medios con una concentración inicial de glucosa de 100 mg/mL, el sustrato es completamente consumido a partir de las 72 horas de cultivo. Por otro lado, en los medios con una concentración inicial de 200 mg/mL de glucosa, se registró una cantidad remanente de glucosa de alrededor de 100 mg/mL al final del periodo de cultivo. Algunos informes indican que el incremento en la concentración de glucosa potencia la actividad de la enzima 6-fosfo-2-fructoquinasa (Kubicek-Pranz *et al.*, 1990; Torres *et al.*, 1996). Esto, a su vez, provoca la síntesis intracelular de fructosa-2,6-bisfosfato, el cual activa la enzima 6-fosfofructoquinasa (Ruijter *et al.*, 1997). Por consiguiente, un aumento en la concentración de glucosa en el medio de cultivo incrementa el flujo a través de la vía EMP, lo cual resulta en una producción de metabolitos como ácido cítrico, succínico y pirúvico. La influencia positiva de la concentración extracelular de glucosa en la excreción de intermediarios del ciclo de ácido tricarbóxico ha sido reportada en múltiples estudios (Legisa y Kidric, 1989; Papagianni *et al.*, 1999; Torres *et al.*, 1996; Xu

et al., 1989).

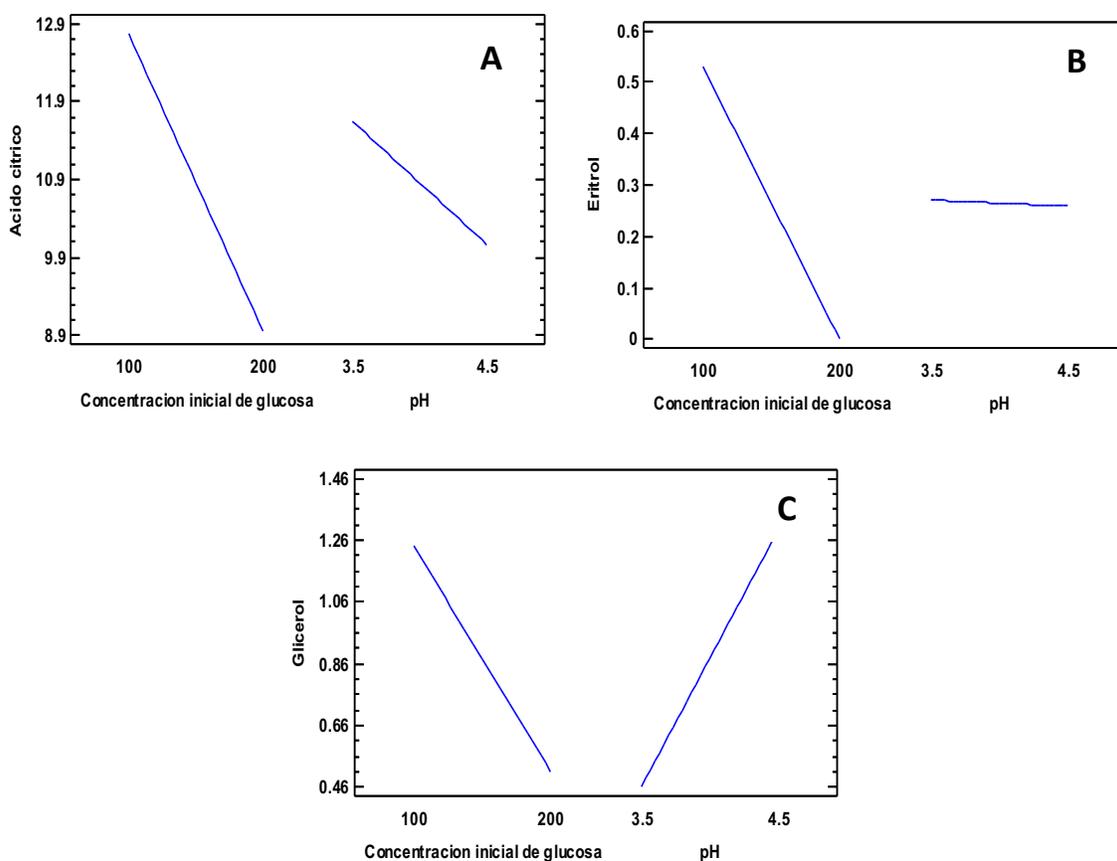
### 7.3.1. Validación del diseño experimental

El software STATGRAPHICS Centurion XVI se empleó para generar la representación gráfica de Pareto y la gráfica de factores principales correspondientes a la producción de cada metabolito. Los factores considerados en este diseño experimental fueron la concentración inicial de glucosa y el pH inicial, los cuales se manipularon a dos niveles cada uno, estableciendo así un diseño factorial 2<sup>2</sup>. La Gráfica 9 exhibe los diagramas de Pareto obtenidos a partir de la producción de ácidos cítrico y polioles en un sistema de FES.



**Gráfica 9.** Diagramas de Pareto para el análisis de los factores que influyen en la producción de ácido cítrico (A), eritrol (B) y glicerol (C), en relación con la concentración inicial de glucosa y pH. Las barras de color gris representan los efectos positivos sobre la variable de respuesta, mientras que las barras de color azul representan los efectos negativos sobre la misma variable de respuesta. Se ha establecido una línea vertical azul para indicar el punto donde los efectos se consideran estadísticamente significativos con un valor de p menor o igual a 0.05.

El análisis de los diagramas de Pareto revela que la concentración inicial de glucosa ejerce un efecto negativo en la producción de ácido cítrico, eritrol y glicerol. Esto indica que un aumento en la concentración de glucosa resulta en una disminución en la producción de estos metabolitos. Por otro lado, el factor pH únicamente afecta la producción de glicerol. Sin embargo, los resultados de este tratamiento no son concluyentes debido a los problemas surgidos al ajustar el pH del medio de cultivo. A continuación, se presentan las gráficas de las interacciones de los efectos principales, las cuales proporcionan una tendencia para identificar la combinación óptima de condiciones de cultivo.



**Gráfica 10.** Gráfica de interacción de los factores principales que afectan la producción de ácido cítrico (A), eritrol (B) y glicerol (C) en cultivo sólido. Los valores de 100 y 200 (mg/mL) corresponden al factor de concentración inicial de glucosa, mientras que 3.5 y 4.5 indican el valor de pH a los cuales se intentó ajustar el medio de cultivo.

Las representaciones gráficas de las interacciones entre los factores principales exhiben una tendencia similar, donde la concentración inicial baja de glucosa (100 mg/mL) favorece la producción de ácido cítrico y polioles. No obstante, en relación al pH, solo se observa un efecto en el ácido cítrico y el glicerol. El ácido cítrico muestra una mayor producción a pH bajo, mientras que el glicerol se favorece a pH alto; sin embargo, al examinar los diagramas de Pareto, se constata que el pH no presenta un impacto significativo, esta discrepancia se atribuye al hecho de que, durante el ajuste del pH del medio, se permitió que este alcanzara valores de 6; en consecuencia, esta observación puede ser descartada.

La concentración del sustrato presenta un efecto adverso en la producción de ácido cítrico en el marco de las condiciones investigadas. Además, debido a las dificultades encontradas en la regulación del pH durante el experimento, no se puede llegar a una conclusión acerca del efecto que este factor ejerce en la producción del ácido cítrico. No obstante, con base en los resultados obtenidos en etapas previas, se puede afirmar que los valores bajos de pH garantizan una producción óptima de ácido cítrico. A continuación, se presentan en la tabla 11 los rendimientos más favorables obtenidos en los mismos.

**Tabla 11.** Máximo rendimiento de ácido cítrico en FES por etapa.

Etapa	Experimento	Ácido cítrico (Cmol/Cmol)
1	Efecto del microorganismo y la adición de metanol sobre la producción de ácido cítrico	0.37
2	Efecto del pH sobre la producción de ácido cítrico	0.41
3	Efecto de la concentración de glucosa y pH sobre la producción de ácido cítrico	0.15

A partir de estas conclusiones, el siguiente paso consistió en realizar un análisis exhaustivo del efecto de la composición del medio de cultivo utilizando una concentración de sustrato en el rango de 150 a 250 mg/mL de glucosa, manteniendo un valor de pH bajo. Es

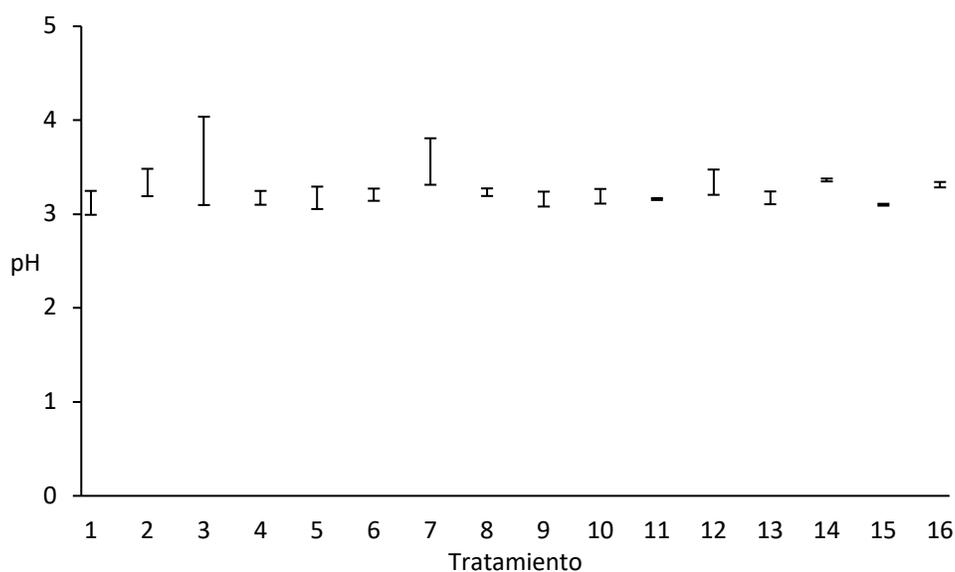
fundamental destacar que la producción de metabolitos denota la cuantificación de los productos generados. No obstante, en el marco de esta investigación, se busca cuantificar la cantidad de carbono empleado en la producción de cada metabolito, con el fin de obtener una visión más amplia sobre el metabolismo de *A. brasiliensis*. Adicionalmente, realizamos una modificación en el tiempo de fermentación, extendiéndolo a 120 horas, debido a que la producción de metabolitos parece encontrarse después de las 96 horas.

#### **7.4. Efecto de la composición del medio de cultivo sobre la producción de ácido cítrico**

Estudios realizados durante varias décadas han demostrado que el carbono, nitrógeno, fósforo, magnesio, elementos traza y alcoholes afectan directamente el rendimiento de los ácidos orgánicos y polioles (Max *et al.*, 2010; Show *et al.*, 2015). Particularmente, el tipo y la concentración de la fuente de carbono son uno de los parámetros más importantes para la producción exitosa de ácido cítrico; algunos autores reportan una producción de 30 a 40 g/L de ácido cítrico, incluso si todos los demás compuestos del medio de cultivo están lejos de las condiciones óptimas (Alekseev *et al.*, 2015). En contraste, cuando la concentración de la fuente de carbono es inferior a 50 g/L, el ácido cítrico no se acumula, incluso si los demás parámetros corresponden a su valor óptimo (Kubicek *et al.*, 1986; Xu *et al.*, 1989). Sin embargo, el efecto producido por la concentración y el tipo de fuente de carbono no se limita a la regulación del flujo glicolítico. Por ejemplo, una alta concentración de la fuente de carbono en el medio induce la síntesis de permeasas en *A. niger* (Torres *et al.*, 1996). Por lo tanto, el impacto del tipo y la concentración de la fuente de carbono en la producción de ácido cítrico depende más de la influencia de la actividad metabólica de *Aspergillus spp.* (Alekseev *et al.*, 2015). Para ello, se evaluó la influencia de la composición del medio de cultivo sobre el rendimiento de ácido cítrico y polioles durante el crecimiento de *A. brasiliensis* en condiciones de FES, utilizando un diseño factorial fraccionado (DFF). En donde, se probaron dos medios de cultivo con diferente concentración de glucosa (factor

A),  $\text{NaNO}_3$  (factor B),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (factor C),  $\text{MgSO}_4$  (factor D), solución mineral (SM) basada en  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (factor E) y extracto de levadura (factor F).

El pH inicial de la fermentación se estableció en aproximadamente 3.5. En la gráfica 11, al concluir la fermentación, se observó un pH cercano a 3 para todas las condiciones, lo cual indica la producción de ácidos orgánicos, en particular, ácido cítrico (Reena *et al.*, 2022).



**Gráfica 11.** Análisis de pH final de *A. brasiliensis* en FES ante variaciones de la composición del medio de cultivo.

De acuerdo a la tabla 12, los rendimientos más alto de ácido cítrico se obtuvieron en los tratamientos con baja concentración de glucosa (150 g/L) y altos valores de extracto de levadura (0.08 g/L), alcanzando un valor máximo de 0.54 Cmol/Cmol. Kuforiji *et al.* (2010) y Pintado *et al.* (1998) han reportado rendimientos máximos de ácido cítrico de 0.45 Cmol/Cmol y 0.52 Cmol/Cmol, respectivamente. Por otro lado, los tratamientos con una alta concentración de glucosa (250 g/L) permiten obtener un rendimiento máximo de ácido cítrico de 0.15 Cmol/Cmol. Investigaciones previas han demostrado que el incremento en

la concentración de glucosa en el medio de cultivo (de 300 a 400 g/L) disminuye la producción de ácido cítrico en condiciones de FES (Gutiérrez-Rojas *et al.*, 1995).

Con respecto a la producción de biomasa, esta fue similar en todos los tratamientos, siendo inferior a 0.35 Cmol/Cmol, excepto en el tratamiento 15 (0.41 Cmol/Cmol); sin embargo, debemos tener en cuenta que el consumo de glucosa en este tratamiento fue solo del 37%. Se ha informado en promedio, un rendimiento de biomasa de *A. niger* bajo condiciones de FES con valores cercanos a 0.31 Cmol/Cmol (Leangon *et al.*, 1999). En este trabajo, se obtuvieron rendimientos de biomasa considerables utilizando NaNO<sub>3</sub> como fuente de nitrógeno; en contraste, ensayos sin limitación de nitrógeno (C/N=24.5) producen un mayor rendimiento de biomasa (Gutiérrez-Rojas *et al.*, 1995). Adicionalmente, el uso de NaNO<sub>3</sub> como fuente de nitrógeno implica el consumo de dos moles de NADPH para reducir un mol de nitrato. Este cofactor se produce principalmente en la vía de las pentosas fosfato (PP). Una vez que la glucosa-6-fosfato ingresa a la vía de las pentosas fosfato, las enzimas glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa reducen dos moléculas de NADP. Poulsen *et al.* (2005) mostró evidencia de la actividad de tres enzimas pertenecientes a la vía de las pentosas fosfato cuando se utiliza nitrato como fuente de nitrógeno en el medio; las enzimas reportadas fueron glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa y transcetolasa; en consecuencia, la producción de eritrol en este trabajo podría ser el resultado del nitrato como fuente de nitrógeno, ya que los precursores para su síntesis son intermediarios en la vía de las pentosas fosfato. Bajo las condiciones estudiadas, los polioles representaron aproximadamente el 10% del carbono consumido, y la relación entre el eritrol y el glicerol depende del flujo de carbono en la vía de la glucólisis (EMP) y la vía de las PP (Diano *et al.*, 2006). Las codificaciones asignadas a cada factor en la tabla 12 han sido previamente detalladas en la tabla 7.

**Tabla 12.** Balance de carbono en Cmol por Cmol de glucosa consumida

Tratamiento	Factor						Variables de respuesta				
	A	B	C	D	E	F	Ácido cítrico (Cmol/Cmol)	Biomasa (Cmol/Cmol)	Eritrol (Cmol/Cmol)	Glicerol (Cmol/Cmol)	Consumo de glucosa (%)
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0.13 ± 0.11	0.23 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.07 ± 0.02	95.15 ± 5.84
2	1	-1	-1	-1	1	-1	0.15 ± 0.08	0.28 ± 0.08	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.04	57.20 ± 8.19
3	-1	1	-1	-1	1	1	0.40 ± 0.05	0.28 ± 0.02	0.02 ± 0.00	0.06 ± 0.01	95.54 ± 0.61
4	1	1	-1	-1	-1	1	0.10 ± 0.03	0.35 ± 0.04	0.01 ± 0.00	0.05 ± 0.00	36.83 ± 0.64
5	-1	-1	1	-1	1	1	0.50 ± 0.04	0.25 ± 0.04	0.03 ± 0.00	0.06 ± 0.01	87.87 ± 7.13
6	1	-1	1	-1	-1	1	0.09 ± 0.01	0.32 ± 0.11	0.02 ± 0.01	0.05 ± 0.04	30.97 ± 8.52
7	-1	1	1	-1	-1	-1	0.41 ± 0.03	0.29 ± 0.01	0.03 ± 0.00	0.07 ± 0.00	97.91 ± 1.62
8	1	1	1	-1	1	-1	0.06 ± 0.02	0.25 ± 0.06	0.01 ± 0.00	0.04 ± 0.00	49.41 ± 4.74
9	-1	-1	-1	1	-1	1	0.54 ± 0.00	0.27 ± 0.00	0.03 ± 0.01	0.05 ± 0.00	90.49 ± 6.89
10	1	-1	-1	1	1	1	0.09 ± 0.04	0.28 ± 0.04	0.01 ± 0.01	0.04 ± 0.01	31.6 ± 6.55
11	-1	1	-1	1	1	-1	0.47 ± 0.02	0.26 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.08 ± 0.01	87.8 ± 10.10
12	1	1	-1	1	-1	-1	0.04 ± 0.01	0.22 ± 0.05	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.01	56.24 ± 1.07
13	-1	-1	1	1	1	-1	0.37 ± 0.07	0.25 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.06 ± 0.00	89.93 ± 5.48
14	1	-1	1	1	-1	-1	0.04 ± 0.02	0.29 ± 0.05	0.01 ± 0.00	0.03 ± 0.01	40.95 ± 5.69
15	-1	1	1	1	-1	1	0.49 ± 0.02	0.41 ± 0.08	0.04 ± 0.01	0.1 ± 0.00	37.67 ± 8.13
16	1	1	1	1	1	1	0.04 ± 0.01	0.18 ± 0.02	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.01	57.83 ± 4.57

El consumo de glucosa fue mayor en los tratamientos con una baja concentración de fuente de carbono, alrededor del 90%, con excepción del tratamiento 15. Varios estudios han mostrado la presencia de azúcares residuales después de 288 horas de incubación en condiciones de FES (Roukas & Kotzekidou., 2020); esto probablemente significa que las condiciones de heterogeneidad en el medio contribuyen a un menor consumo de glucosa.

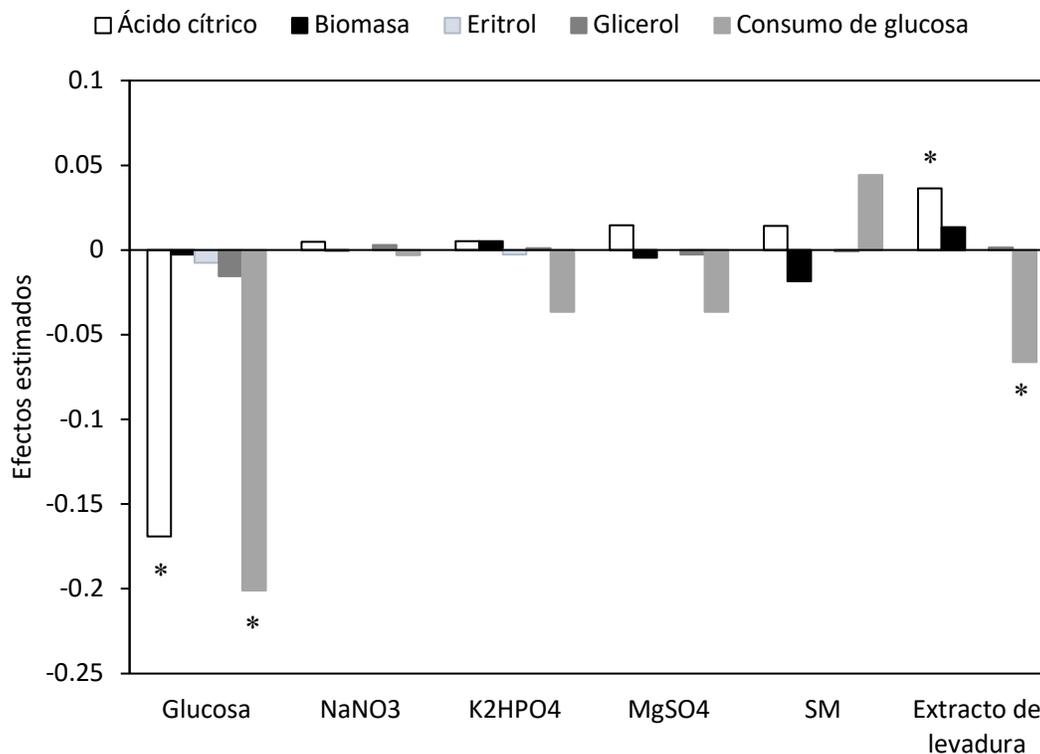
El uso de EPUc tiene la ventaja de poder exprimirlo debido a que es un material elástico y poroso, lo que facilita la extracción de ácido cítrico, polioles y biomasa. López-Pérez y Viniegra-González (2015) informaron sobre un sistema con cubos de EPU con una longitud de aristas de 1 cm; sin embargo, mencionaron que el caldo se escurre cuando se apilan debido a que la gravedad supera las fuerzas de capilaridad que mantienen el líquido en el polímero. Un sistema similar propuesto por Pintado *et al.* (1998), con partículas cilíndricas

de EPU (con un diámetro y altura de 0.6 cm), informó un rendimiento similar de ácido cítrico (0.52 Cmol/Cmol). Por ello, parece que la geometría de la EPU es un factor importante a considerar para la producción de metabolitos como el ácido cítrico y los polioles.

#### **7.4.1. Validación del diseño experimental**

De acuerdo con los resultados presentados en la Gráfica 12, se observa que únicamente la glucosa y extracto de levadura muestran un efecto estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) tanto en el rendimiento de ácido cítrico como en el consumo de glucosa; sin embargo, es importante destacar que solo el extracto de levadura (Factor F) ejerce un efecto positivo sobre la producción de ácido cítrico.

Un estudio previo realizado por Xu *et al.* (1989) demuestra que cultivos que utilizan glucosa como fuente de carbono, alcanzan un rendimiento máximo de ácido cítrico a una concentración de glucosa del 7.5% (p/v). Más allá de esta concentración, se observa una disminución drástica en el rendimiento de ácido cítrico. Este patrón de comportamiento concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio, lo cual demuestra que la concentración de glucosa ejerce un efecto importante sobre la producción de ácido cítrico por parte de *A. brasiliensis*.



**Gráfica 12.** Efectos estimados obtenidos a partir del DFC en el rendimiento de ácido cítrico, biomasa, eritrol, glicerol y consumo de glucosa, de acuerdo con los resultados experimentales (\*el efecto es significativo al 95% de nivel de confianza). El efecto del factor glucosa en el consumo de glucosa fue dividido entre cien. SM representa la solución mineral.

Torres *et al.* (1996), reporta que una alta concentración de azúcar en el medio de cultivo induce la síntesis de permeasas por parte de *A. niger*, lo que resulta en un aumento en la absorción de carbono. En contraste, se observa un efecto negativo sobre el consumo de glucosa debido al incremento en la concentración inicial de glucosa (de 150 a 250 g/L). de Oliveira *et al.* (2022) reporta un comportamiento similar, donde a las 120 horas de fermentación en condiciones de FES, aproximadamente el 50% de los azúcares totales se mantenían sin consumir. Por otro lado, se observa un efecto positivo sobre el rendimiento de ácido cítrico con el incremento en la concentración de extracto de levadura; es probable, que *A. brasiliensis* requiere de algún factor nutricional complejo para poder producir ácido cítrico. En el rango evaluado, los factores B a E no tienen un efecto significativo en la

producción de metabolitos. A continuación, se presentan en la tabla 13 los rendimientos más favorables obtenidos en los mismos.

**Tabla 13.** Máximo rendimiento de ácido cítrico en FES por etapa.

Etapa	Experimento	Ácido cítrico (Cmol/Cmol)
1	Efecto del microorganismo y la adición de metanol sobre la producción de ácido cítrico	0.37
2	Efecto del pH sobre la producción de ácido cítrico	0.41
3	Efecto de la concentración de glucosa y pH sobre la producción de ácido cítrico	0.15
4	Efecto de la composición del medio de cultivo sobre la producción de ácido cítrico	0.54

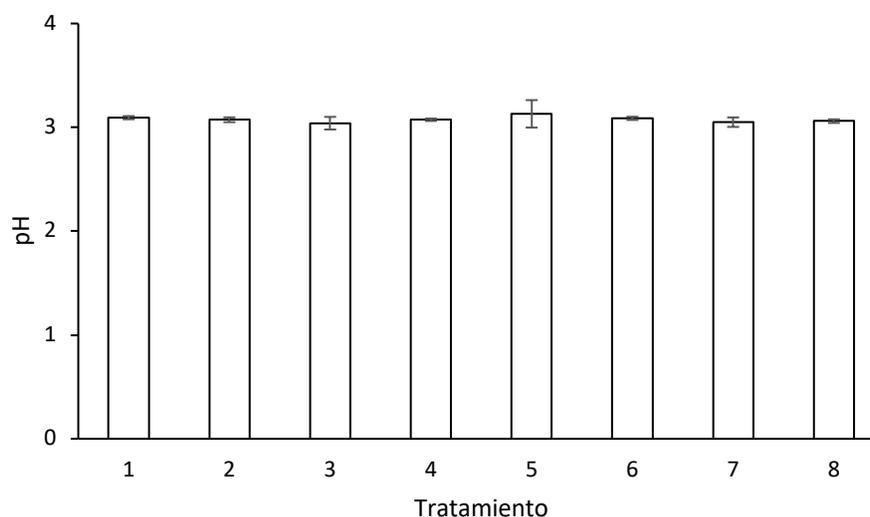
Los resultados obtenidos del DFF muestran que las mejores condiciones para la producción de ácido cítrico (0.54 Cmol/Cmol) son: (I) una baja concentración inicial de glucosa y, (II) una alta concentración de extracto de levadura. Para aumentar el consumo de glucosa sin afectar negativamente el rendimiento de producción de ácido cítrico, se disminuyó la concentración de glucosa (más alta 150 g/L) y se aumentó el extracto de levadura (100%). La falta de efecto significativo ( $p > 0.05$ ) de los demás nutrientes en el rendimiento de ácido cítrico y polioles podría atribuirse a la influencia excepcionalmente alta de la glucosa. Por consiguiente, nos centramos en la evaluación de los factores que, a pesar de no manifestar un efecto significativo, desempeñan un papel crucial en la producción de ácido cítrico y polioles. Para llevar a cabo esto, se evaluó el efecto de la solución mineral (elementos traza) que contiene glucosa,  $K_2HPO_4$  y  $MgSO_4$  mediante un diseño factorial.

## 7.5. Efecto de la concentración de $K_2HPO_4$ , $MgSO_4$ y una solución mineral con glucosa sobre la producción de ácido cítrico

La producción de ácido cítrico es un proceso altamente dependiente del tipo y concentración de la fuente de carbono, limitación de oxígeno, concentraciones subóptimas de fosfato y magnesio, elementos traza y otros factores relevantes (Diano *et al.*, 2009; Guilherme *et al.*, 2008; Ozdal & Kurbanoglu, 2019). Varios investigadores han evaluado el impacto de la concentración de la fuente de carbono, nitrógeno, fósforo, magnesio y elementos traza con respecto a algunos aspectos metabólicos y regulatorios asociados con la producción de ácido cítrico y otros metabolitos por *A. niger* (Behera *et al.*, 2021; Max *et al.*, 2010). Se ha observado que niveles bajos de fosfato y magnesio tienen un efecto positivo en la producción de ácido cítrico (Ozdal & Kurbanoglu, 2019). Por otro lado, un exceso de fosfato incrementa la actividad metabólica, lo cual se refleja en un aumento en la producción de  $CO_2$ , relacionado directamente con la tasa de crecimiento (Mostafa *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2002). Además, un incremento en la concentración de glucosa en el medio de cultivo estimula la producción de polioles, específicamente eritrol y glicerol (Diano *et al.*, 2009). Tomando en consideración estas observaciones, se llevó a cabo una evaluación de la influencia de una solución mineral que contiene glucosa,  $K_2HPO_4$  y  $MgSO_4$  en la producción de metabolitos durante el crecimiento de *A. brasiliensis* en EPUc, con este propósito, se implementó un diseño factorial (DF). En donde, se realizaron pruebas utilizando dos medios de cultivo con diferente concentración de una solución mineral que contiene glucosa (SMCG), basada en  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $MnSO_4 \cdot H_2O$ ,  $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ ,  $NaNO_3$ , extracto de levadura y glucosa (factor A),  $K_2HPO_4$  (factor B) y  $MgSO_4$  (factor C).

El valor de pH inicial de la fermentación se estableció en  $3.5 \pm 0.2$ . La gráfica 13, evidencia la reducción de pH, con la obtención de valores aproximados a 3 para todos los tratamientos a las 120 horas de cultivo. Diversos estudios previos han señalado que rangos de pH inicial entre 2.5 y 4 favorecen la producción de ácido cítrico en medios químicamente definidos utilizando sustratos inertes. En contraste, se ha observado que el uso de residuos

agroindustriales como sustratos para la fermentación en estado sólido (FES) se ve beneficiado con un pH inicial en el rango de 6 a 7.5 (Jernejc *et al.*, 1982; Behera *et al.*, 2021).



**Gráfica 13.** Análisis de pH de *A. brasiliensis* en condiciones de FES ante variaciones de la concentración de  $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4$  y una solución mineral con glucosa.

Para este diseño experimental, la alta concentración de glucosa en el medio (150 g/L) tiene un impacto positivo sobre el rendimiento de ácido cítrico, el aparente aumento en la biosíntesis de citrato puede deberse a un aumento en la actividad del flujo glucolítico (Alekseev *et al.*, 2015); sin embargo, la concentración de ácido cítrico puede afectar la actividad de las enzimas reguladoras de la ruta EMP, por ejemplo la fosfofructoquinasa, que es inhibida por el citrato a concentraciones fisiológicas de 1 a 5 mM (Habison *et al.*, 1983). Un aumento en la concentración de la fuente de carbono se acompaña de un aumento en la concentración de fructosa 2,6-bifosfato, que es un activador de la fosfofructoquinasa (Kubicek-Pranz *et al.*, 1990). Por lo general, la producción de ácido cítrico se lleva a cabo a una alta concentración inicial de la fuente de carbono, lo que provoca un efecto de choque osmótico en *Aspergillus spp.*, para contrarrestar este efecto se produce eritrol y glicerol, que actúan como metabolitos osmorreguladores (Diano *et al.*, 2006). Dicho efecto puede observarse a mayor concentración de glucosa en este estudio o dicho en otras palabras, mayor concentración de sustrato es igual a mayor producción de polioles; sin embargo, la

producción de polioles no superará el 15% de la glucosa consumida en todas las condiciones. Diano et al. (2006) describieron que el eritrol se produce como un compuesto de almacenamiento de carbono cuando el flujo a través de la vía de la PP supera la necesidad de ribulosa-5-fosfato para la síntesis de biomasa, mientras que el eritritol y el glicerol participan en la osmorregulación. Los altos niveles de eritrol y glicerol obtenidos en el medio con alta concentración de glucosa están relacionados con el flujo de carbono a través de las vías EMP y PP (Diano *et al.*, 2009). Finalmente, la alta concentración de glucosa en el medio (150 g/L) tiene un efecto negativo en el consumo de glucosa en el medio. La alta concentración de glucosa en el medio puede inducir la síntesis de permeasas con baja afinidad, lo que conduce a un aumento en la absorción de carbono; sin embargo, la actividad de las permeasas disminuye a pH bajo y es inhibida por una alta concentración de ácido cítrico (Torres *et al.*, 1996). El alto rendimiento de ácido cítrico en el medio con alta concentración de glucosa puede provocar una disminución en el consumo de glucosa. En relación al extracto de levadura, en los tratamientos con una alta concentración (>0.1 mg/mL), se observa que este continúa ejerciendo un efecto positivo en la producción de ácido cítrico, manteniendo la misma tendencia que en la etapa anterior.

**Tabla 14.** Balance de carbono en Cmol por Cmol de glucosa consumida

Tratamiento	Factor			Variables de respuesta				
	A	B	C	Ácido cítrico (Cmol/Cmol)	Biomasa (Cmol/Cmol)	Eritrol (Cmol/Cmol)	Glicerol (Cmol/Cmol)	Consumo de glucosa (%)
1	-1	-1	-1	0.54 ± 0.16	0.12 ± 0.04	0.03 ± 0.01	0.08 ± 0.01	74.16 ± 5.83
2	1	-1	-1	0.62 ± 0.13	0.15 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.07 ± 0.00	56.46 ± 5.89
3	-1	1	-1	0.22 ± 0.04	0.05 ± 0.02	0.02 ± 0.00	0.04 ± 0.01	81.65 ± 1.59
4	1	1	-1	0.42 ± 0.04	0.09 ± 0.04	0.03 ± 0.00	0.06 ± 0.00	53.62 ± 4.06
5	-1	-1	1	0.24 ± 0.04	0.09 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.04 ± 0.01	79.57 ± 0.27
6	1	-1	1	0.31 ± 0.05	0.08 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01	67.48 ± 3.44
7	-1	1	1	0.17 ± 0.09	0.04 ± 0.03	0.00 ± 0.00	0.03 ± 0.01	80.83 ± 2.71
8	1	1	1	0.43 ± 0.18	0.10 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.07 ± 0.03	61.83 ± 6.03

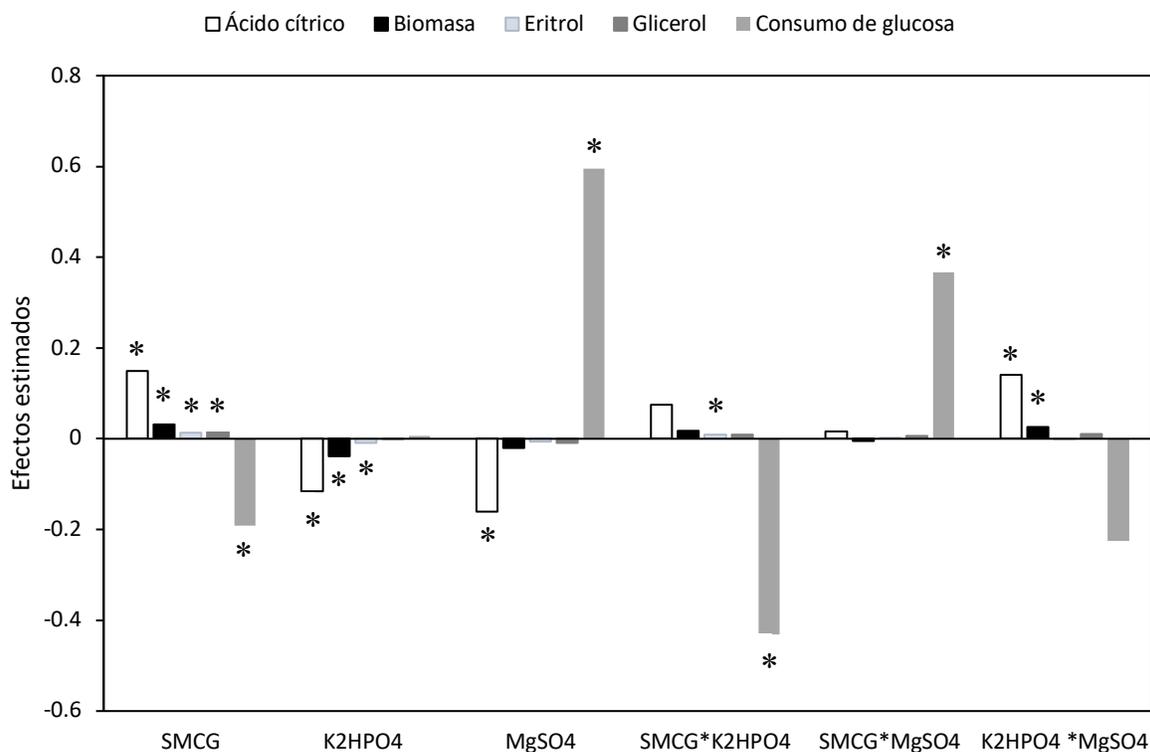
El rendimiento de ácido cítrico fue mayor en los tratamientos con baja concentración de  $K_2HPO_4$  (4.54 g/L) y  $MgSO_4$  (0.26 g/L); efectos similares han sido reportados por Max et al. (2010) y Mostafa et al. (2012). Estos autores reportaron que la limitación de fósforo podría tener un efecto positivo en el rendimiento de ácido cítrico, mientras que una alta concentración de fósforo conduce a una disminución en la respiración microbiana en forma de  $CO_2$ , lo que a su vez se relaciona con un menor uso de los azúcares disponibles en el cultivo. Además, el fósforo se metaboliza como fosfato y la limitación de este ion cuando el nitrógeno no está limitado conduce a la formación de ácido cítrico (Kubicek *et al.*, 1977). El fosfato se utiliza para la generación de energía, generalmente en forma de ATP; esta molécula regula enzimas en las vías de la EMP y el ciclo de Krebs. La limitación de ATP puede causar la inhibición del crecimiento desviando el flujo del carbono hacia la formación de ácido cítrico. Además, Ozdal & Kurbanoglu (2019) informaron que la producción de ácido cítrico (utilizando melaza y peptona proveniente de plumas de pollo) se produce a 0.15 g/L en presencia de  $K_2HPO_4$  y sin  $MgSO_4$ . Un aumento adicional en la concentración de  $MgSO_4$  reduce gradualmente el rendimiento de ácido cítrico, de 0.62 a 0.17 (Cmol/Cmol) sobre el rendimiento de ácido cítrico. La alta concentración de iones de magnesio posiblemente inhibe a la citrato sintasa, lo que resulta en una disminución sobre el rendimiento de ácido cítrico (Ikram-ul *et al.*, 2004). También se informó que varias enzimas como la hexoquinasa y la glucoquinasa, son inhibidas por el citrato debido a la quelación con  $Mg^{2+}$  (Papagianni *et al.*, 2007). El efecto del magnesio con iones de sulfato lleva a una disminución en el consumo de glucosa debido a la acción de las enzimas requeridas para el crecimiento fúngico y la producción de ácido cítrico (Mostafa *et al.*, 2012).

Se ha reportado ampliamente el rendimiento de ácido cítrico por *A. niger* utilizando glucosa como fuente de carbono (Adeoye *et al.*, 2015); sin embargo, el rendimiento de ácido cítrico logrado en el presente estudio con *A. brasiliensis* (0.62 Cmol/Cmol) es mucho mayor que los informados previamente en FES (0.30 Cmol/Cmol) (Papagianni *et al.*, 2004; Perwitasari *et al.*, 2021; Steiger *et al.*, 2019; Upton *et al.*, 2017). El cultivo de *A. brasiliensis* en EPUC parece ser el más adecuado para la producción de ácido cítrico y polioles. Un resultado

similar fue reportado por Lee et al. (1989), quienes utilizaron un biorreactor de columna de burbujeo con cubos de EPU (0.2 cm); sin embargo, el rendimiento fue inferior (0.44 Cmol/Cmol) al obtenido en este estudio, teniendo en cuenta este hecho el control del medio de cultivo es un factor crítico a considerar.

### 7.5.1. Validación del diseño experimental

De acuerdo a la gráfica 14, todos los factores evaluados tienen un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) sobre el rendimiento de ácido cítrico; sin embargo, solo el factor A tiene una influencia positiva. Este comportamiento se debe principalmente al aumento de la concentración de glucosa. Börekçi et al. (2021) informaron que el rendimiento de ácido cítrico disminuye significativamente cuando la concentración de glucosa está por debajo de 100 g/L. Además, Papagianni et al. (1999) demostraron que una concentración inicial de glucosa de 130 g/L permite una alta producción de ácido cítrico con *A. niger* en FEL; y afirmaron que el efecto de la alta concentración de glucosa afecta la fisiología del hongo, afectando a su vez a la tasa específica de formación del producto siendo sensible a niveles elevados de glucosa.



**Gráfica 14.** Efectos estimados obtenidos a partir del DFF en el rendimiento de ácido cítrico, biomasa, eritrol, glicerol y consumo de glucosa, de acuerdo con los resultados experimentales (\*el efecto es significativo al 95% de nivel de confianza). SMCG representa la solución mineral que contiene glucosa.

Por otro lado, el rendimiento de biomasa fue positivamente afectado por la SMCG y la interacción de  $K_2HPO_4 * MgSO_4$ ; sin embargo, el  $K_2HPO_4$  presenta un efecto negativo. En cuanto al rendimiento de eritrol y glicerol, la SMCG y la interacción de  $SMCG * K_2HPO_4$  tienen un efecto positivo; no obstante, solo  $K_2HPO_4$  por sí solo tiene un efecto negativo. Diano et al. (2006), reportaron que bajo condiciones de cultivo similares (100 g/L de glucosa) el rendimiento de eritrol y glicerol fue de 0.01 y 0.08 (Cmol/Cmol) respectivamente, mismos que concuerdan con lo reportado; representando el 10% del carbono consumido. Adicionalmente, la SMCG,  $MgSO_4$  y las interacciones entre  $SMCG * MgSO_4$  y  $SMCG * K_2HPO_4$  afectan el consumo de glucosa; no obstante, es claro que el  $MgSO_4$  lo favorece, mientras que la SMCG lo afecta de manera negativa. Algunos autores han reportado patrones similares del  $K_2HPO_4$  y  $MgSO_4$  sobre la producción de ácido cítrico y polioles; donde, consideran que el  $K_2HPO_4$  actúa como un agente promotor del crecimiento y tampón que mantiene los valores de pH, por lo tanto, se debe usar una cantidad razonable para mantener el pH dentro del rango que favorezca la producción de ácido cítrico (Lofty et al., 2007; Ali et al., 2012). Por otro lado, el  $MgSO_4$  se considera esencial y este afecta la tasa de consumo de carbono mediante la acción de múltiples de enzimas, requeridas tanto para el crecimiento fúngico como para la producción de ácido cítrico (Mostafa et al., 2012).

Se ha reportado que los elementos traza tienen un efecto negativo en la producción de ácido cítrico y polioles, ya que actúan como activadores de ciertas enzimas; por esta razón, en procesos de FEL, se encuentran en concentraciones pequeñas o ni siquiera se agregan. Por lo tanto, se logra una producción elevada de ácido cítrico solo si hay un control riguroso de la disponibilidad de elementos traza (Bizukojc et al., 2004; Soccol et al., 2006); sin embargo, esta etapa no muestra claramente el posible efecto de la concentración de micronutrientes sobre la producción de los metabolitos analizados, debido a que dentro del

diseño experimental no se plantean como un factor aparte. Varios autores han informado que el rendimiento obtenido en condiciones de FES es superior al obtenido en FEL (Show *et al.*, 2015), argumentando que la presencia de elementos traza no afecta la producción de ácido cítrico en FES como lo hace bajo condiciones de FEL. Por lo tanto, no se requiere un tratamiento del sustrato para el control de elementos traza (Soccol *et al.*, 2006; Dhillon *et al.*, 2011; Börekçi *et al.*, 2021). A continuación, se presentan en la tabla 15 los rendimientos más favorables obtenidos en los mismos.

**Tabla 15.** Máximo rendimiento de ácido cítrico en FES por etapa.

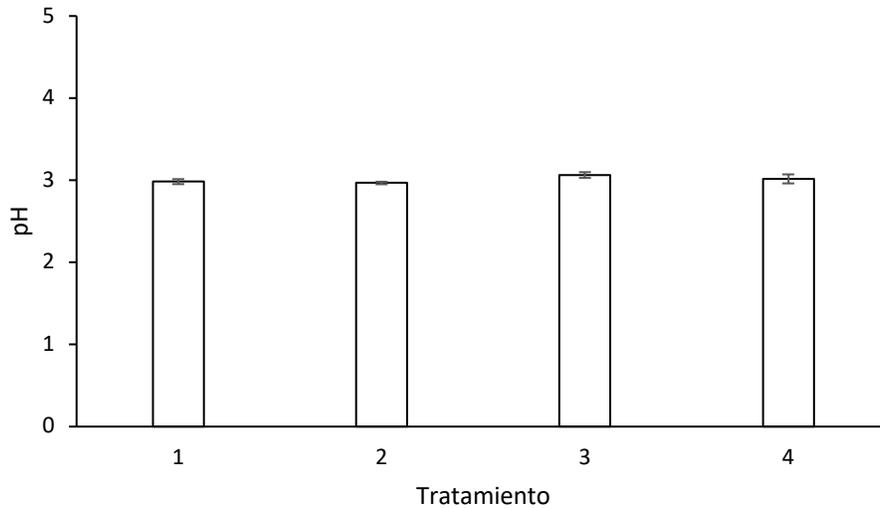
Etapa	Experimento	Ácido cítrico (Cmol/Cmol)
1	Efecto del microorganismo y la adición de metanol sobre la producción de ácido cítrico	0.37
2	Efecto del pH sobre la producción de ácido cítrico	0.41
3	Efecto de la concentración de glucosa y pH sobre la producción de ácido cítrico	0.15
4	Efecto de la composición del medio de cultivo sobre la producción de ácido cítrico	0.54
5	Efecto de la concentración de $K_2HPO_4$ , $MgSO_4$ y una solución mineral con glucosa sobre la producción de ácido cítrico	0.62

Los resultados obtenidos del DFC muestran que las mejores condiciones para la producción de ácido cítrico (0.62 Cmol/Cmol) son: (I) una alta concentración inicial de SMCG, (II) una baja concentración inicial de  $K_2HPO_4$  y (III) una baja concentración inicial de  $MgSO_4$ . Con el fin de aumentar el consumo de glucosa sin tener un efecto negativo sobre el rendimiento de ácido cítrico, la concentración de glucosa inicial se mantuvo fija (150 g/L) y el  $MgSO_4$  se aumentó ligeramente (13%) con respecto a la concentración más alta. Por lo que la siguiente etapa se enfocó en evaluar el efecto de los elementos traza junto con el extracto de levadura evaluado en el cuarto diseño experimental mediante el uso de un diseño factorial  $2^2$ .

## 7.6. Efecto de la concentración de elementos traza y extracto de levadura sobre la producción de ácido cítrico

Los elementos traza ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ , entre otros) tienen un papel muy importante sobre la regulación de la producción de ácido cítrico (Kubicek *et al.*, 1985). Elementos traza como el hierro, zinc y molibdeno son componentes integrales de algunas enzimas; por ejemplo, la producción de ácido cítrico disminuye en presencia de  $\text{Fe}^{3+}$ , ya que es un activador y componente de la aconitasa, por esa razón no se analiza su efecto dentro de este estudio. Por otro lado, el zinc está presente es un componente de enzimas como las deshidrogenasas, aldolasas, polimerasas y proteasas. Por lo tanto, es crucial considerar el control riguroso de la disponibilidad de elementos traza (Börekçi *et al.*, 2021); sin embargo, varios autores afirman que la presencia de elementos traza en condiciones de FES no afecta negativamente la producción de ácido cítrico (Soccol *et al.*, 2006; Dhillon *et al.*, 2011; Show *et al.*, 2015). Etapas anteriores mostraron que el extracto de levadura aumenta la producción de ácido cítrico pero disminuye el consumo de glucosa. Por lo tanto, esta etapa se encarga de evaluar el efecto de los elementos traza en una solución mineral (SM) basada en  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (factor A) y extracto de levadura (factor B) en el medio de cultivo, manteniendo constante la concentración de glucosa,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

El valor de pH inicial se estableció en  $3.5 \pm 0.2$ . La gráfica 15, evidencia la reducción de pH, con la obtención de valores aproximados a 3 para todos los tratamientos a las 120 horas de cultivo. A bajo pH, la formación de productos no deseados como ácido oxálico y glucónico se inhibe, disminuyendo la posibilidad de contaminación por parte de otros microorganismos, de esta manera se facilita la recuperación del ácido cítrico (Behera *et al.*, 2021).



**Gráfica 15.** Análisis de pH de *A. brasiliensis* en condiciones de FES ante variaciones de la concentración de los elementos traza y extracto de levadura.

De acuerdo a la tabla 16, la elevada concentración de elementos traza tiene un efecto negativo sobre el rendimiento de ácido cítrico. Dentro de las condiciones estudiadas, es necesario controlar la concentración de zinc, cobre, manganeso y magnesio para potenciar la producción de ácido cítrico (Soccol *et al.*, 2006). Se ha reportado que el zinc es un estabilizador de la estructura celular y de los orgánulos, su deficiencia conlleva a la degradación de las mitocondrias y ribosomas (Finogenova *et al.*, 2002). Además, el zinc contribuye a la regulación enzimática del CAT, dando como resultado un rendimiento elevado de ácido cítrico (de Oliveira *et al.*, 2022). En cuanto al cobre, un exceso de iones de cobre en el medio se asocia con un aumento sobre el rendimiento de ácido cítrico; adicionalmente, el cobre contrarresta el efecto adverso de manganeso y hierro (Anastassiadis *et al.*, 2008). La carencia de manganeso afecta el anabolismo de *A. niger*, generando una elevada concentración intracelular de amonio debido a la degradación de proteínas, lo cual contrasta con la inhibición de la EMP y producción de ácido cítrico (Show *et al.*, 2015). Además, se ha reportado que el, manganeso provoca la inhibición de ciertas enzimas en el ciclo anaeróbico y en el CAT, con excepción de la citrato sintasa, resultando en una sobreproducción de ácido cítrico (Grewal & Kalra, 1995). El magnesio actúa como cofactor en reacciones enzimáticas celulares (Anastassiadis *et al.*, 2008); otros estudios, han

evidenciado que el magnesio es un metal involucrado en la producción de ácido cítrico y el crecimiento (Börekçi *et al.*, 2021). La interdependencia de los elementos traza debe ser considerada dado que es esencial para la producción de ácido cítrico, por lo tanto se requiere un control riguroso sobre su concentración en condiciones de FES.

**Tabla 16.** Balance de carbono en Cmol por Cmol de glucosa consumida

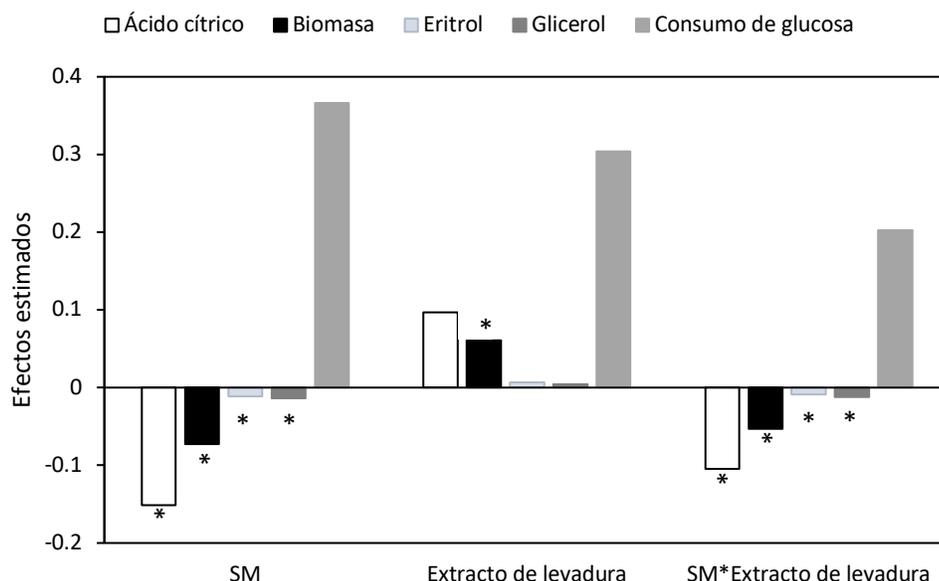
Tratamiento	Factores		Variables de respuesta				
	A	B	Ácido cítrico (Cmol/Cmol)	Biomasa (Cmol/Cmol)	Eritrol (Cmol/Cmol)	Glicerol (Cmol/Cmol)	Consumo de glucosa (%)
1	-1	-1	0.35 ± 0.07	0.08 ± 0.03	0.03 ± 0.01	0.06 ± 0.01	67.80 ± 9.02
2	-1	1	0.56 ± 0.07	0.19 ± 0.02	0.04 ± 0.00	0.07 ± 0.01	66.39 ± 1.50
3	1	-1	0.31 ± 0.13	0.06 ± 0.05	0.03 ± 0.01	0.06 ± 0.02	68.43 ± 2.41
4	1	1	0.30 ± 0.14	0.07 ± 0.05	0.02 ± 0.01	0.05 ± 0.01	73.50 ± 5.77

Del mismo modo, la elevada concentración de elementos traza tiene un efecto negativo sobre los polioles y biomasa. Los polioles representan en 10% del carbono consumido manteniéndose con respecto a la etapa previa; por otro lado, el rendimiento de biomasa aumenta considerablemente, representando un 19% del carbono disponible. Es probable que el crecimiento (biomasa) favorezca la producción de ácido cítrico. Xie *et al.*, (2005) identificaron un efecto similar en el rendimiento de biomasa, donde el rendimiento de ácido cítrico aumentó, y el crecimiento se mantuvo constante para todos los tratamientos en condiciones de FES utilizando un soporte complejo. A partir de estos resultados, se plantea que la producción de eritrol y la ausencia en la producción de otros polioles y azúcares se deba a la baja actividad de la vía PP en comparación con la demanda celular de los intermediarios (Röhr *et al.*, 1987). El glicerol se produce por medio de dos vías: una a través de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD y la glicerol-3-fosfatasa, y otra a través de la DHAP fosfatasa y la glicerol deshidrogenasa dependiente de NADP, el flujo de ambas vías depende de la actividad fosfatasa. Diano *et al.*, (2006) reportaron que el flujo anabólico provoca la activación de la glicerol deshidrogenasa dependiente de NADP; por lo que asumimos, que el aumento del flujo catabólico genera un menor rendimiento de

glicerol, concluyendo finalmente que la producción de glicerol se explica por la alta presión osmótica en la FES.

### 7.6.1. Validación del diseño experimental

De acuerdo a la gráfica 16, la SM tiene un efecto negativo sobre la producción de ácido cítrico, polioles y biomasa. Kubicek *et al.*, (1977) demostraron que la actividad específica de las enzimas del CAT se ve afectada cuando hay iones de manganeso en el medio, estos iones tienen especial efecto en enzimas como la citrato sintasa, lo que contribuye a la acidogénesis. El extracto de levadura solo tiene efecto positivo sobre la biomasa, probablemente se deba al aporte de vitaminas, aminoácidos, entre otros.



**Gráfica 16.** Efectos estimados obtenidos a partir del DFC sobre el rendimiento de ácido cítrico, biomasa, eritrol, glicerol y consumo de glucosa, de acuerdo con los resultados experimentales (\*el efecto es significativo al 95% de nivel de confianza). SMCG representa la solución mineral.

El efecto de la interacción (SM\*extracto de levadura) sobre el rendimiento de metabolitos puede indicar cuales son las mejores condiciones para obtener en este caso el mejor rendimiento de metabolitos dentro DFC. El mejor tratamiento fue el medio con una baja concentración de elementos traza ( $1.50E-02$  g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  /L) y un alta concentración de extracto de levadura (0.15 g/L) para todos los metabolitos. Por otro lado, el consumo de

glucosa no se ve afectado por la concentración de elementos traza y extracto de levadura utilizadas. Un estudio similar sobre el efecto de los elementos traza sobre el ácido cítrico muestra que el ácido cítrico y el rendimiento de biomasa son similares a los reportados en este estudio a los 10 días de fermentación; por otro lado, la glucosa se consume por completo después de 20 días (Guilherme *et al.*, 2008). El DFC confirma que los elementos traza afectan el rendimiento sobre ácido cítrico, polioles y biomasa; en contraste, con otros autores que han afirmado que estos no tienen un efecto significativo en procesos de FES (Show *et al.*, 2015; Börekçi *et al.*, 2021 ). Esto debido principalmente a la limitación en la disponibilidad de nutrientes en los procesos de FES, provocado por la transferencia de calor y oxígeno (Sangsurasak *et al.*, 1995). La PGI, crucial en el proceso de regulación de la

En la búsqueda de justificar la consistente predominancia de ácido cítrico sobre los polioles dentro de la FES, se destaca la participación de la fosfoglucoisomerasa (PGI). Esta enzima cataliza la isomerización de G6P a fructosa-6-fosfato (F6P), representando la segunda reacción dentro de la vía EMP. La PGI, crucial en la regulación de este proceso, se ve inhibida por la presencia de eritrosa-4-fosfato (E4P), esta enzima es responsable de la producción de eritrol (Ruijter *et al.*, 1999), por lo que asumimos que un flujo glucolítico elevado hacia la producción de ácido cítrico conlleva una marcada disminución en la actividad de la vía PP, resultando en una menor producción de polioles. A continuación, se presentan en la tabla 17 los rendimientos más favorables obtenidos en los mismos.

**Tabla 17.** Máximo rendimiento de ácido cítrico en FES por etapa.

Etapa	Experimento	Ácido cítrico (Cmol/Cmol)
1	Efecto del microorganismo y la adición de metanol sobre la producción de ácido cítrico	0.37
2	Efecto del pH sobre la producción de ácido cítrico	0.41
3	Efecto de la concentración de glucosa y pH sobre la producción de ácido cítrico	0.15
4	Efecto de la composición del medio de cultivo sobre la producción de ácido cítrico	0.54
5	Efecto de la concentración de $K_2HPO_4$ , $MgSO_4$ y una solución mineral con glucosa sobre la producción de ácido cítrico	0.62
6	Efecto de la concentración de elementos traza y extracto de levadura sobre la producción de ácido cítrico	0.56

Los resultados obtenidos del DFC muestran que las mejores condiciones para la producción de ácido cítrico (0.56 Cmol/Cmol) son: (I) una baja concentración de SM y (II) una alta concentración de extracto de levadura. Esto indica que el aumento de los elementos traza tiene un efecto negativo sobre el rendimiento de los metabolitos analizados (ácido cítrico, biomasa, polioles) mientras que el extracto de levadura solo presentó efecto sobre el crecimiento (biomasa).

## 8. Conclusión

Un enfoque estadístico basado en diseños factoriales permitió obtener un rendimiento de producción de ácido cítrico superior al reportado hasta ahora para FES. Representando hasta el 62% del carbono consumido por *A. brasiliensis* en un medio de cultivo definido impregnado en EPU, revelando variaciones en el comportamiento del metabolismo de polioles en distintas condiciones ambientales. Estas variaciones se atribuyen a la compleja regulación del ácido cítrico y polioles, que cumplen diversas funciones. La ausencia de metanol en el medio ha demostrado tener un impacto positivo en la producción de ácido cítrico. Asimismo, al igual que en FEL, se ha demostrado que el pH tiene un papel fundamental, con una mayor producción observada a valores de pH de 3. Por otro lado, la concentración hipertónica de glucosa en el medio (>150 mg/mL) tiene un efecto adverso en la producción de ácido cítrico en FES, con un impacto negativo también en su consumo.

La limitación de fósforo, por otro lado, muestra tener un efecto positivo sobre la producción de ácido cítrico, mientras que una concentración elevada de magnesio se traduce en un mayor consumo de glucosa. El extracto de levadura, una solución derivada de células autolizadas, se caracteriza por su alta concentración de vitaminas, aminoácidos y otros factores de crecimiento. La adición de extracto de levadura promueve la producción de ácido cítrico.

Dentro de las condiciones estudiadas en FES, se determinó que los cationes divalentes ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Mo}^{2+}$ ) pueden ser tolerados en concentraciones mayores que en FEL, aunque a niveles elevados pueden ejercer una influencia negativa en la producción de ácido cítrico, polioles y biomasa. Es crucial señalar que la influencia específica de estos elementos traza no pudo evaluarse completamente, ya que se consideraron como un único factor y no se pudo visualizar el efecto individual de cada uno de estos. Adicionalmente, el uso de EPU en forma de placa permitió explotar las ventajas de la FES en un soporte inerte con una alta capacidad de retención de agua, alcanzando hasta 15 veces su peso y con la posibilidad de incrementar hasta 60 veces su peso. Esta característica promisoría abre nuevas perspectivas

para aumentar la productividad de proceso y la producción de productos de alto valor agregado. Finalmente, es relevante señalar que el modelo de estudio en EPU se comporta de manera muy similar a la FEL para la producción de ácido cítrico.

## 9. Perspectivas

Basándonos en las condiciones óptimas de cultivo en este estudio, se proponen las siguientes perspectivas para investigaciones futuras:

- Analizar el impacto individual de los cationes divalentes ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Mo}^{2+}$ ) en la producción de ácido cítrico, con el objetivo de comprender mejor cómo influyen en los procesos de FES.
- Implementar un diseño de superficie de respuesta para optimizar el proceso de producción de ácido cítrico. Esto permitirá identificar las condiciones ideales de cultivo que maximicen la producción de manera eficiente.
- Realizar una comparación entre las condiciones óptimas encontradas para la producción de ácido cítrico en FES y las mismas en FEL. El objetivo es determinar las diferencias entre ambos sistemas y comprender por qué muestran similitudes sobre la producción de ácido cítrico.

## 10. Bibliografía

1. Adeoye A. O., Lateef A. & Gueguim-Kana E. B. 2015. Optimization of citric acid production using a mutant strain of *Aspergillus niger* on cassava peel substrate. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 4(4): 568-574. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.08.004>.
2. Alekseev K. V., Dubina M.V. & Komov V. P. 2015. Metabolic characteristics of citric acid synthesis by the fungus *Aspergillus niger*. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 51(9): 857-865. <https://doi.org/10.1134/S0003683815090021>.
3. Ali, H. K. Q., DAUD, M. Z. M., & Al-Azzawi, Z. 2012. Economic benefit from the optimization of citric acid production from rice straw through Plackett-Burman design and central composite design. *Turkish Journal of Engineering and Environmental Sciences*, 36(1), 81-93. <https://doi.org/10.3906/muh-1101-8>.
4. Anastassiadis S, Morgunov IG, Kamzolova SV, Finogenova TV. 2008. Citric acid production patent review. *Recent Patents on Biotechnology*. 2:107–123.
5. Barrios-Gonzalez, J., & Mejia, A. (1996). Production of secondary metabolites by solid state fermentation. *Biotechnology Annual Review*(2), 85-121.
6. Behera B. C., Mishra R. & Mohapatra S. 2021. Microbial citric acid: Production, properties, application, and future perspectives. *Food Frontiers*. 2(1): 62-76. <https://doi.org/10.1002/fft2.66>.
7. 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(12), 2261-2268. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.11.017>.
8. Bloomberg, A., Adler, L. (1992). *Advances in Microbial Physiology*. 33: 145-212.
9. Börekçi B. S., Kaban G. & Kaya M. 2021. Citric acid production of yeasts: An overview. *The EuroBiotech Journal*. 5(2): 79-91. <https://doi.org/10.2478/ebtj-2021-0012>.
10. Campanhol, B. S., Silveira, G. C., Castro, M. C., Ceccato-Antonini, S. R., & Bastos, R. G. (2019). Effect of the nutrient solution in the microbial production of citric

acid from sugarcane bagasse and vinasse. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 19, 101147.

11. Canada, E. (2014). Draft Screening Assessment for *Aspergillus awawori* ATCC 22342 and *Aspergillus brasiliensis* ATCC 9642. *Draft Screening Assessment* , 7-9.
12. Chergui, D., Akretche-Kelfat, S., Lamoudi, L., Al-Rshaidat, M., Boudjelal, F., & Ait-Amar, H. (2021). Optimization of citric acid production by *Aspergillus niger* using two downgraded Algerian date varieties. *Saudi journal of biological sciences*, 28(12), 7134-7141.
13. Currie, J. (1917). The Citric acid fermentation of *Aspergillus niger*. *J. Biol. Chem*(31), 15-37.
14. David H., Åkesson M. & Nielsen J. 2003. Reconstruction of the central carbon metabolism of *Aspergillus niger*. *European Journal of Biochemistry*. 270(21): 4243-4253. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03798.x>.
15. de Oliveira P. Z., de Souza Vandenberghe L. P., Rodrigues C., de Melo Pereira G. V. & Soccol C. R. 2022. Exploring cocoa pod husks as a potential substrate for citric acid production by solid-state fermentation using *Aspergillus niger* mutant strain. *Process Biochemistry*. 113: 107-112. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.12.020>.
16. Dhillon G. S., Brar S. K., Verma M. & Tyagi R. D. 2011. Enhanced solid-state citric acid bio-production using apple pomace waste through surface response methodology. *Journal of Applied Microbiology*. 110(4): 1045-1055. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04962.x>.
17. Diano A., Bekker-Jensen S., Dynesen J. & Nielsen J. 2006. Polyol synthesis in *Aspergillus niger*: Influence of oxygen availability, carbon and nitrogen sources on the metabolism. *Biotechnology and Bioengineering*. 94(5): 899-908. <https://doi.org/10.1002/bit.20915>.
18. 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(5): 956-965. <https://doi.org/10.1002/bit.22329>.
19. Dijkema C, Kester HCM, Visser J. 1985. <sup>13</sup>C NMR studies of carbon metabolisation in the hyphal fungus *Aspergillus nidulans*. *Proc Nat Acad Sci USA* 82:14–18.
  20. Favela-Torres, E., Cordova-Lopez, J., García-Rivero, M., & Gutiérrez-Rojas, M. (1998). Kinetics of growth of *Aspergillus niger* during submerged, agar surface and solid state fermentations. *Process Biochemistry*, 33(2), 103-107.
  21. Finogenova, T., Kamzolova, S., Dedyukhina, E., Shishkanova, N., Il'Chenko, A., Morgunov, I., ... & Sokolov, A. (2002). Biosynthesis of citric and isocitric acids from ethanol by mutant *Yarrowia lipolytica* N 1 under continuous cultivation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, 493-500.
  22. G. J. G. Ruijter and Jaap Visser. Carbon repression in *Aspergilli*. *FEMS Microbiol Lett*, 151: 103–114, 1997.
  23. Grewal H, Kalra K. 1995. Fungal production of citric acid. *Biotechnol Adv*. 13:209–234.
  24. Guc, S., & Erkmen, O. (2017). Citric acid production from nontreated beet molasses by a novel *Aspergillus niger* strain: effects of pH, sugar and ingredients. *J Food Microbiol Saf Hyg* 2: 122. of mold and production of citric acid. This finding is an agreement with the observations of Pessoa et al.[11, 12] and Haq et al.[12].  
Medium Type Ingredients (g/L)\* Mg N P Zn Fe Mn Cu, 3.
  25. Guerrero-Urrutia, C., Volke-Sepulveda, T., Figueroa-Martinez, F., & Favela-Torres, E. (2021). Solid-state fermentation enhances inulinase and invertase production by *Aspergillus brasiliensis*. *Process Biochemistry*, 108, 169-175.
  26. Guilherme A. A., Pinto G. A. S. & Rodrigues S. 2008. Optimization of trace metals concentration on citric acid production by *Aspergillus niger* NRRL 2001. *Food and Bioprocess Technology*. 1(3): 246-253. <https://doi.org/10.1007/s11947-007-0009-y>.

27. Gutiérrez-Rojas M., Cordova J., Auria R., Revah S. & Favela-Torres E. 1995. Citric acid and polyols production by *Aspergillus niger* at high glucose concentration in solid state fermentation on inert support. *Biotechnology Letters*. 17(2): 219-224. <https://doi.org/10.1007/BF00127992>.
28. Habison A, Kubicek CP, Rohr M. 1983. Partial purification and regulatory properties of phosphofructokinase from *Aspergillus niger*. *Biochem J*. 209:669–676.
29. Hohmann S. 2002. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 66(2): 300-372. <https://doi.org/10.1128/membr.66.2.300-372.2002>.
30. Hondmann, D.H.A. & Visser, J. (1994) Carbon metabolism. In *Aspergillus: 50 Years on* (Martinelli, S.D. & Kinghorn, J.R., eds), pp. 61–139. Elsevier Science B, V., Amsterdam.
31. Hossain, M., Brooks, J. D., & Maddox, I. S. (1983). Production of citric acid from whey permeate by fermentation using *Aspergillus niger*. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 18, 161–168.
32. Ikram-ul H, Ali S, Qadeer M, Iqbal J. 2004. Citric acid production by selected mutants of *Aspergillus niger* from cane molasses. *Bioresour Technol*. 93:125–130.
33. Jernejc, K., Cimerman, A., & Perdih, A. (1982). Citric acid production in chemically defined media by *Aspergillus niger*. *European journal of applied microbiology and biotechnology*, 14, 29-33.
34. Karaffa , L., & Kubicek, C. (2003). *Aspergillus niger* citric acid accumulation: do we understand this well working black box? *Appl Microbiol Biotechnol*, 61(3), 189-196.
35. Karaffa, L., & Kubicek, C. P. (2019). Citric acid and itaconic acid accumulation: variations of the same story?. *Applied microbiology and biotechnology*, 103, 2889-2902.

36. Kiel H, Guvrien R, Henis Y (1981) Citric acid fermentation by *Aspergillus niger* on low sugar concentrations and cotton waste. *Appl Environ Microbiol* 42:1-4
37. Kim JW (2014) Optimization of fermentation conditions for the production of citric acid by *Aspergillus niger* NRRL 567 grown on agricultural byproducts. *Korean Chem Eng Res* 52:402–406
38. Kubicek CP, Röhr M. 1977. Influence of manganese on enzyme synthesis and citric acid accumulation in *Aspergillus niger*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnol-ogy*. 4:167–175.
39. Kubicek-Pranz, E. M., Mozelt, M., Röhr, M., & Kubicek, C. P. (1990). Changes in the concentration of fructose 2, 6-bisphosphate in *Aspergillus niger* during stimulation of acidogenesis by elevated sucrose concentration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1033(3), 250-255.
40. Kubicek, C. (1985). Aconitase and citric fermentation by *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microbiol.*(5), 1136-1138.
41. Kubicek, C. P., & Röhr, M. 1986. Citric acid production, *CRC Crit. Rev. Biotechnol.*, 3, 331-373. <https://doi.org/10.3109/07388558509150788>.
42. Kuforiji O. O., Kuboye A. O. & Odunfa S. A. 2010. Orange and pineapple wastes as potential substrates for citric acid production. *International Journal of Plant Biology*. 1(1): e4. <https://doi.org/10.4081/pb.2010.e4>.
43. Kumar, P., & Dubey, K. K. (2019). Citric acid cycle regulation: Back bone for secondary metabolite production. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 165-181). Elsevier.
44. Kumar, V., Sharma, N., Umesh, M., Selvaraj, M., Al-Shehri, B. M., Chakraborty, P., ... & Maitra, S. S. (2022). Emerging challenges for the agroindustrial food waste utilization: A review on food waste biorefinery. *Bioresource Technology*, 127790.
45. Lareo C., Sposito A., Bossio A. and Volpe D. 2006. Characterization of growth and sporulation of *Mucor bacilliformis* in solid state fermentation on an inert support. *Enzyme and Microbial Technology*, 38 (3):391–399.

46. Leangon, S., Maddox, I. S., & Brooks, J. D. (1999). Influence of the glycolytic rate on production of citric acid and oxalic acid by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15, 493-495.
47. Lee, Y. H., Lee, C. W., & Chang, H. N. (1989). Citric acid production by *Aspergillus niger* immobilized on polyurethane foam. *Applied microbiology and biotechnology*, 30, 141-143.
48. Legisa, M. (1988). Citrate regulation of the change in carbohydrate degradation during the initial phase of the citric acid production by *Aspergillus niger*. *Enzyme Microbiol. Technol.*(10), 33-36.
49. Legisa, M. & Kidric, I. (1989). Initiation of citric acid accumulation in the early stages of *Aspergillus niger* growth. *Appl Microbiol Biotechnol*31, 453-457.
50. Legisa, M., & Matthey. (1989). Initiation of citric acid accumulation in the early stages of *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 453-457.
51. Lewis D. H. & Smith D. C. 1967. Sugar alcohols (polyols) in fungi and green plants. I. Distribution, physiology and metabolism. *The New Phytologist*. 66(2): 143-184.
52. Liaud, N., Ginies, C., Navarro, D., Fabre, N., Crapart, S., Gimbert, I.H.-, Levasseur, A., Raouche, S., Sigoillot, J.-C., 2014. Exploring fungal biodiversity: organic acid production by 66 strains of filamentous fungi. *Fungal Biol. Biotechnol.* 1, 1. <https://doi.org/10.1186/s40694-014-0001-z>.
53. López-Pérez M. & Viniestra-González G. 2015. Production of protein and metabolites by yeast grown in solid state fermentation: present status and perspectives. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 91(5): 1224-1231. <https://doi.org/10.1002/jctb.4819>.
54. Lotfy, W. A., Ghanem, K. M., & El-Helow, E. R. 2007. Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate: II. Optimization of process parameters through statistical experimental designs. *Bioresource technology*, 98(18), 3470-3477. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.11.032>.

55. Majumder L., Khalil I., Munshi M. K., Alam K., Rashid H. O., Begum R. & Alam N. 2010. Citric acid production by *Aspergillus niger* using molasses and pumpkin as substrates. *European Journal of Biological Sciences*. 2(1): 1-8.
56. Max, B., Salgado, J. M., Rodríguez, N., Cortés, S., Converti, A., & Domínguez, J. M. (2010). Biotechnological production of citric acid. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 862–875.
57. Meijer, S., Panagiotou, G., Olsson, L., & Nielsen, J. (2007). Physiological Characterization of Xylose Metabolism in *Aspergillus niger* Under Oxygen-Limited Conditions. *Biotechnology and Bioengineering*(2), 462-474.
58. Meixener, O. (1985). Effect of manganese deficiency on plasma membrane lipid composition and glucose uptake in *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiol. Lett*(26), 271-274.
59. Mitchell, D., Berovi, M., & Krieger, N. (2006). Solid-State Fermentation Bioreactor Fundamentals: Introduction and Overview. En D. Mitchell, *Solid-State Fermentation Bioreactors* (págs. 1-2). Alemania: Springer.
60. Mora-Pérez, C., Viniestra-González, G., Olivares-Hernández, R., & Favela-Torres, E. (2023) High citric acid production in solid-state fermentation by *Aspergillus brasiliensis* on polyurethane foam. *Mexican Journal of Biotechnology* 2023, 8(4):90-109
61. Mores, S., de Souza Vandenberghe, L. P., Júnior, A. I. M., de Carvalho, J. C., de Mello, A. F. M., Pandey, A., & Soccol, C. R. (2021). Citric acid bioproduction and downstream processing: Status, opportunities, and challenges. *Bioresource Technology*, 320, 124426.
62. Mostafa, Y.S., Alamri, S.A. 2012. Optimization of date syrup for enhancement of the production of citric acid using immobilized cells of *Aspergillus niger*. *Saudi. J. Biol. Sci.* 19(2), 241–246. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.01.004>.
63. Moyer, A. J. (1953). Effect of Alcohols on the Mycological Production of Citric Acid in Surface and Submerged Culture: I. Nature of the Alcohol Effect. *Applied Microbiology*, 1, 1–7.

64. Núñez-Reyes D. E., Favela-Torres E., Viniestra-González G. & López-Pérez M. 2022. Physical and geometrical considerations on the growth of *Pichia pastoris* in polyurethane foam slabs. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 21(1): Bio2595-Bio2595. <https://doi.org/10.24275/rmiq/Bio2595>.
65. Ooijkaas, L. (2000). Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. *Elsevier Science*(18), 356-360.
66. Ozdal M. & Kurbanoglu E. B. 2019. Citric acid production by *Aspergillus niger* from agro-industrial by-products: Molasses and chicken feather peptone. *Waste and Biomass Valorization*. 10(3): 631-640. <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0240-y>.
67. Papagianni, M. (2007). Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnology Advances*(25), 244-263.
68. Papagianni, M., & Mattey, M. (2004). Physiological aspects of free and immobilized *Aspergillus niger* cultures producing citric acid under various glucose concentrations. *Process Biochemistry*, 39(12), 1963-1970.
69. Papagianni, M., Mattey, M., & Kristiansen, B. (1999). The influence of glucose concentration on citric acid production and morphology of *Aspergillus niger* in batch and culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 25(8-9), 710-717.
70. Perwitasari, U., Agustina, N. T., Pangestu, R., Amanah, S., Saputra, H., Andriani, A., ... & Habibi, M. S. 2021. Cacao pod husk for citric acid production under solid state fermentation using response surface method. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-9. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01690-9>.
71. Pintado J., Torrado A., González M. P. & Murado M. A. 1998. Optimization of nutrient concentration for citric acid production by solid-state culture of *Aspergillus niger* on polyurethane foams. *Enzyme and Microbial Technology*. 23(1-2): 149-156. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(98\)00042-8](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(98)00042-8).

72. Popovic, M. (2019). Thermodynamic properties of microorganisms: determination and analysis of enthalpy, entropy, and Gibbs free energy of biomass, cells and colonies of 32 microorganism species. *Heliyon*, 5(6).
73. Poulsen, L. (2012). Regulatory processes in *Aspergillus niger*. 1-271.
74. Poulsen R, Nohr J, Douthwaite S, Hansen LV, Iversen JJ, Visser J, Ruijter GJ. 2005. Increased NADPH concentration obtained by metabolic engineering of the pentose phosphate pathway in *Aspergillus niger*. *FEBS J* 272:1313 – 1325.
75. Raimbault, M. (1998). General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronical Journal of Biotechnology*(1), 3-5.
76. Reena R., Sindhu R., Balakumaran P. A., Pandey A., Awasthi M. K. & Binod P. 2022. Insight into citric acid: A versatile organic acid. *Fuel*. 327: 125181. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.125181>.
77. Rodrigues C., Vandenberghe L. P., Sturm W., Dergint D. E., Spier M. R., de Carvalho J. C. & Soccol C. R. 2013. Effect of forced aeration on citric acid production by *Aspergillus sp.* mutants in SSF. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 29(12): 2317-2324. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1397-y>.
78. Röhr, M., Kubicek, C. P., Zehentgruber, O., & Orthofer, R. (1987). Accumulation and partial re-consumption of polyols during citric acid fermentation by *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 27, 235-239.
79. Roukas, T., & Kotzekidou, P. (2020). Pomegranate peel waste: a new substrate for citric acid production by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation under non-aseptic conditions. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(12), 13105-13113.
80. Ruijter G. J., Bax M., Patel H., Flitter S. J., van de Vondervoort P. J., de Vries R. P., vanKuyk P. A. & Visser J. 2003. Mannitol is required for stress tolerance in *Aspergillus niger* conidiospores. *Eukaryotic cell*. 2(4): 690-698. <https://doi.org/10.1128/ec.2.4.690-698.2003>.

81. Ruijter, G. J., van de Vondervoort, P. J., & Visser, J. (1999). Oxalic acid production by *Aspergillus niger*: An oxalate-non-producing mutant produces citric acid at pH 5 and in the presence of manganese. *Microbiology*, 145, 2569–2576.
82. 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.
83. Sangsurasak P, Mitchell D. 1995. The investigation of transient multidimensional heat transfer in solid state fermentation. *Chem Eng J/Biochem Eng J*. 60:199–204.
84. Show P. L., Oladele K. O., Siew Q. Y., Aziz Zakry F. A., Lan J. C. W. & Ling T. C. 2015. Overview of citric acid production from *Aspergillus niger*. *Frontiers in Life Science*. 8(3): 271-283. <https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1033653>.
85. Soccol C. R., Vandenberghe L. P., Rodrigues C. & Pandey A. 2006. New perspectives for citric acid production and application. *Food Technology and Biotechnology*. 44(2): 141-149.
86. Steiger, M. G., Rassinger, A., Mattanovich, D., & Sauer, M. 2019. Engineering of the citrate exporter protein enables high citric acid production in *Aspergillus niger*. *Metabolic engineering*, 52, 224-231. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.12.004>.
87. Tomasini A., Fajardo C. & Barrios-González J. 1997. Gibberellic acid production using different solid-state fermentation systems. *World Journal Microbiology and Biotechnology*. 13: 203–206. <https://doi.org/10.1023/A:1018545932104>
88. Torres N. V., Riol-Cimas J. M., Wolschek M. & Kubicek C. P. 1996. Glucose transport by *Aspergillus niger*: the low-affinity carrier is only formed during growth on high glucose concentrations. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 44(6): 790-794. <https://doi.org/10.1007/BF00178620>.
89. Troiano, D., Orsat, V., & Dumont, M. J. (2020). Status of filamentous fungi in integrated biorefineries. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 117, 109472.

90. Upton, D. J., McQueen-Mason, S. J., & Wood, A. J. 2017. An accurate description of *Aspergillus niger* organic acid batch fermentation through dynamic metabolic modelling. *Biotechnology for biofuels*, 10(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0950-6>.
91. Valdés-Velasco, L. M., Favela-Torres, E., Théâtre, A., Arguelles-Arias, A., Saucedo-Castañeda, J. G., & Jacques, P. (2022). Relationship between lipopeptide biosurfactant and primary metabolite production by *Bacillus* strains in solid-state and submerged fermentation. *Bioresource Technology*, 345, 126556.
92. 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(2): 175-178. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00107-8](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00107-8).
93. Vandenberghe LP, Soccol CR, Pandey A, Lebeault J-M. 1999. Microbial production of citric acid. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 42:263–276.
94. Vandenberghe, L. P., Pandey, A., Carvalho, J. C., Letti, L. A., Woiciechowski, A. L., Karp, S. G., ... & Soccol, C. R. (2020). Solid-state fermentation technology and innovation for the production of agricultural and animal feed bioproducts. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 1, 142-165.
95. Vandenbergue, 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.
96. Varga, J., Kocsube, S., Toth, B., Frisvad, J. C., Perrone, G., Susca, A & Samson, R. A. (2007). *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriata black *Aspergillus* species with world-wide distribution. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(8), 1925-1932.
97. Viniegra-González, G., & Favela-Torres, E. (2006). Why Solid-State Fermentation Seems to be Resistant to Catabolite Repression? *Food Technol. Biotechnol.*(3), 397-406.
98. Voet, D. (2007). *Fundamentos de bioquímica*. Nueva York: Panamericana.

99. Volke-Sepúlveda, T., Salgado-Bautista, D., Bergmann, C., Wells, L., Gutiérrez-Sanchez, G., & Favela-Torres, E. (2016). Secretomic Insight into Glucose Metabolism of *Aspergillus brasiliensis* in Solid-State Fermentation. *J. Proteome Res.*(15), 3856–3871.
100. Wikandari, R., Hasniah, N., & Taherzadeh, M. J. (2022). The role of filamentous fungi in advancing the development of a sustainable circular bioeconomy. *Bioresource Technology*, 345, 126531.
101. Xie, G., & west, T. P. (2006). Citric acid production by *Aspergillus niger* on wet corn distillers grain. *Letters in Applied Microbiology*, 43, 269–273.
102. Xu, D. B., Madrid, C. P., Röhr, M., & Kubicek, C. P. (1989). The influence of type and concentration of the carbon source on production of citric acid by *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 30, 553-558.
103. Yin X, Shin H, Li J, Du G, Liu L, Chen J (2017) Comparative genomics and transcriptome analysis of *Aspergillus niger* and metabolic engineering for citrate production. *Sci Rep* 7:41040. <https://doi.org/10.1038/srep41040>
104. Zhang, A., & Roehr, M. 2002. Effects of varied phosphorus concentrations on citric acid fermentation by *Aspergillus niger*. *Acta biotechnologica*, 22(3-4), 383-389.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00286

Matrícula: 2163802535

Producción de ácido cítrico por *Aspergillus brasiliensis* en fermentación en estado sólido.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 19 del mes de abril del año 2024 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. HECTOR BERNARDO ESCALONA BUENDIA
- DR. GERARDO DIAZ GODINEZ
- DRA. MAYOLA GARCIA RIVERO
- DR. ROBERTO OLIVARES HERNANDEZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

DE: CHRISTIAN JESUS MORA PEREZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

## APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



CHRISTIAN JESUS MORA PEREZ  
ALUMNO

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

DR. HECTOR BERNARDO ESCALONA  
BUENDIA

VOCAL

DR. GERARDO DIAZ GODINEZ

VOCAL

DRA. MAYOLA GARCIA RIVERO

SECRETARIO

DR. ROBERTO OLIVARES HERNANDEZ